

Andreas Christmann

**Zur bakteriellen Oberflächenpräsentation
kombinatorischer Peptidbibliotheken und deren
Anwendung auf Fragestellungen der Immunologie,
Molekularbiologie und der Molekularen Medizin**



Cuvillier Verlag Göttingen

Zur bakteriellen Oberflächenpräsentation
kombinatorischer Peptidbibliotheken
und deren Anwendung auf Fragestellungen der
Immunologie, Molekularbiologie
und der Molekularen Medizin

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

Vorgelegt von
Andreas Christmann
aus Göttingen

Göttingen den 24.03.2003

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2003
ISBN 3-86537-052-7

D7

Referent: PD Dr. Harald Kolmar
Korreferent: PD Dr. Wilfried Kramer

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Mai 2003

⊕ CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2004
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-052-7

1. <u>EINLEITUNG</u>	1
1.1 ANTIKÖRPER-ANTIGEN WECHSELWIRKUNGEN	2
1.2 HERSTELLUNG UND ISOLIERUNG VON POLYPEPTIDEN MIT VORGEgebenEN INTERAKTIONSEIGENSCHAFTEN.....	3
1.2.1 Anforderungen an ein strukturelles Grundgerüst für <i>Protein Engineering</i>	5
1.2.2 Die Familie der Cystinknoten Proteine.....	5
1.2.2.1 Der Trypsininhibitor EETI-II aus <i>Ecballium elaterium</i>	6
1.3 GENOTYP-PHÄNOTYP KOPPLUNG.....	7
1.3.1 <i>Phage Display</i>	8
1.3.2 Zelloberflächenpräsentation.....	9
1.3.3 Das Intimin Protein von enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> Zellen als Membranverankerungsdomäne für Peptide und Proteine	11
1.4 ZIELSETZUNG	13
2. <u>MATERIAL</u>	15
2.1 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME.....	15
2.2 BAKTERIOPHAGE.....	15
2.3 VEKTOREN	16
2.4 VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE.....	17
2.5 DNA-LÄNGENSTANDARDS	18
2.6 PROTEINE UND ENZYME	18
2.7 CHEMIKALIEN.....	19
2.8 SONSTIGE MATERIALIEN UND GERÄTE	21
2.9 MEDIEN	24
2.10 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	25
3. <u>METHODEN</u>	30
3.1 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	30
3.1.1 Stammhaltung und Vermehrung von <i>E. coli</i>	30
3.1.2 Bestimmung der Zelldichte.....	30
3.1.3 Präparation von elektrokompenten <i>E. coli</i> Zellen	30
3.1.4 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	31
3.1.5 Induktion von Bakterienkulturen	31
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	31
3.2.1 Fällung von DNA.....	31
3.2.1.1 Fällung von DNA mit Ethanol.....	31
3.2.1.2 Fällung von DNA mit Isopropanol	31
3.2.2 Extraktion von DNA mit Phenol, Phenol/Chloroform, Chloroform.....	32
3.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	32

3.2.4	Acrylamidgelelektrophorese von DNA-Fragmenten	32
3.2.5	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	32
3.2.6	Reinigung von DNA aus Acrylamidgelen	33
3.2.7	Auftrennung von DNA in Sucrosegradienten	33
3.2.7.1	Reinigung eines gespaltenen Vektors mit Gefriergradienten.....	33
3.2.7.2	Reinigung eines gespaltenen Vektors mit gegossenen Gradienten.....	33
3.2.8	Bestimmung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen.....	33
3.2.9	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels alkalischer Lyse.....	34
3.2.9.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	34
3.2.9.2	Midipräparation von Plasmid-DNA	34
3.2.10	Spaltung von DNA mittels Restriktions-Endonukleasen	34
3.2.11	Hydrodynamisches Spalten von DNA	35
3.2.12	Partieller Verdau von DNA mit DNaseI	35
3.2.13	Auffüllen von überhängenden DNA-Enden.....	36
3.2.14	Enzymatische Dephosphorylierung von DNA-Enden	36
3.2.15	Enzymatische Phosphorylierung von 5'-DNA Enden	36
3.2.16	Ligation von DNA	36
3.2.17	Hybridisierung von Oligonukleotiden	37
3.2.18	Amplifikation von DNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	37
3.2.19	Kolonie-PCR-Durchmusterung.....	37
3.2.20	Aufreinigung von <i>PCR</i> -Produkten mittels des <i>NucleotrapCR Kits</i>	38
3.2.21	Sequenzierung von DNA	38
3.3	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	39
3.3.1	Präparation von periplasmatischen Proteinen aus <i>E. coli</i>	39
3.3.2	Zellaufschluß von <i>E. coli</i> Bakterien.....	40
3.3.3	Dialyse von Proteinen	40
3.3.4	Reinigung von Proteinen mittels immobilisierter Metallionen Affinitäts- chromatographie (IMAC)	41
3.3.5	Reinigung von Proteinen mittels Ionen Austauschchromatographie	41
3.3.6	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid Gelen (SDS-PAGE).....	42
3.3.7	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (<i>Western Blot</i>) und immuno- chemischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	42
3.3.8	Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen.....	43
3.3.9	Einkonzentrierung und Lagerung von gereinigten Proteinen	43
3.4	METHODEN ZUR EVOLUTIVEN ANREICHERUNG VON BAKTERIEN, DIE PEPTIDE ZU EINER FUNKTIONSABFRAGE AUF IHRER OBERFLÄCHE PRÄSENTIEREN	44
3.4.1	Induktion der Synthese von Intimin Fusionsproteinen	44
3.4.2	Fluoreszenzmarkierung von <i>E. coli</i> Zellen	44
3.4.3	Markierung von <i>E. coli</i> Zellen mit paramagnetischen Partikeln.....	45
3.4.4	Mikroskopische Analyse von fluoreszenzmarkierten Bakterien.....	45
3.4.5	Analyse von Bakterienzellen mit dem Durchflußcytometer	46
3.4.6	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)	46
3.4.7	Magnetische Zellsortierung.....	46
3.5	BINDUNGSSTUDIEN MITTELS PLASMONRESONANZ (BIACORE).....	47

4.	<u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</u>	49
4.1	KARTIERUNG LINEARER EPITOPE DURCH BAKTERIELLE OBERFLÄCHEN-PRÄSENTATION GENBASIERTER PEPTIDE	49
4.1.1	Generelle Vorgehensweise.....	49
4.1.2	Kartierung von η -Lactamase Epitopen	53
4.1.2.1	Allgemeine Vorbemerkungen zu η -Lactamasen.....	53
4.1.2.2	Konstruktion einer η -Lactamase Fragmentbibliothek und Bestimmung linearer Epitope.....	55
4.1.3	Kartierung von CSFV-E ^{rns} Epitopen	60
4.1.3.1	Allgemeine Vorbemerkungen zum CSF-Virus.....	60
4.1.3.2	Konstruktion und Durchmusterung einer CSFV-E ^{rns} Peptidbibliothek.....	62
4.1.3.2.1	Isolierung von CSFV-E ^{rns} Peptid-Fragmenten, die mit monoklonalen Antikörpern interagieren	63
4.1.3.2.2	Isolierung von CSFV-E ^{rns} Peptid-Fragmenten, die mit einem polyklonalen Kaninchenserum interagieren	67
4.1.4	Isolation monospezifischer Antikörper mit epitopräsentierenden Bakterien als Reinigungsmatrix.....	71
4.1.5	Durchmusterung großer Proteomabschnitte nach antigenen Determinanten.....	77
4.1.5.1	Vorbemerkungen zum Immunoprofiling eines variablen Genomabschnitts von pathogenen <i>P. aeruginosa</i> Bakterien	77
4.1.5.2	Erzeugung von PAGI-2 (C) Fragmentbibliotheken	81
4.1.5.3	Durchmusterung der PAGI-2(C) Fragmentbibliotheken	82
4.1.6	Diskussion der Epitopkartierungen.....	86
4.2	ERZEUGUNG UND ISOLIERUNG NICHT NATÜRLICHER INTERAKTIONSPARTNER	92
4.2.1	Allgemeine Vorgehensweise.....	92
4.2.2	Erzeugung von randomisierten Peptidbibliotheken	95
4.2.3	Allgemeine Überlegungen zur Wahl eines geeigneten Zielproteins, für das aus den Peptidbibliotheken Interaktionspartner isoliert werden sollten	98
4.2.4	Klonierung und Expression des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>pcrv</i> -Gens in <i>Escherichia coli</i> Bakterien	102
4.2.5	Durchmusterung der Mikroprotein/Peptid Bibliotheken nach Molekülen mit definierten Bindungseigenschaften	106
4.2.6	Analyse der isolierten Peptide PhycoA, PC9A und des Mikroproteins Strep1.....	118
4.2.6.1	Durchflußcytometrische Analysen der Peptide PhycoA und PC9A sowie davon abgeleiteter Varianten	118
4.2.6.2	Bindungsstudien der isolierten Peptide PhycoA, PC9A und des Mikroproteins Strep1 mittels Oberflächen Plasmonresonanz.....	121
4.2.7	Diskussion der Isolierung von Peptiden mit neuen Bindungseigenschaften.....	125
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	128
6.	<u>LITERATUR.....</u>	130

7. ANHANG	144
7.1 DNA-SEQUENZEN DER ISOLIERTEN η-LACTAMASE KLONE	144
7.2 DNA-SEQUENZEN DER ISOLIERTEN CSFV-E^{RNS} KLONE.....	145
7.2.1 Sequenzen die nach Anreicherung mit dem mAb #22 erhalten wurden	145
7.2.2 Sequenzen die nach Anreicherung mit dem mAb #24/16 erhalten wurden.....	146
7.2.3 Sequenzen die nach der Anreicherung mit dem polyklonalen Serum erhalten wurden.....	148
7.3 SEQUENZEN DER ISOLIERTEN PMS1 KLONE	149
7.4 SEQUENZEN DER ISOLIERTEN PAGI2(C) KLONE	149
7.5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	152
7.6 DANKSAGUNG	155
7.7 LEBENSLAUF	156

1. Einleitung

Die ungeheure Vielfalt des Lebens, wie wir sie heute vorfinden, ist Ausdruck der Anpassung an verschiedenste ökologische Nischen. Jedoch findet diese Vielfalt bei erster Betrachtung keine Entsprechung auf molekularer Ebene. Allen lebenden Zellen ist gemein, dass die genetische Information auf der Ebene von Nukleinsäuren organisiert ist und durch den Prozess der Transkription und der Translation ausgedrückt wird. Die Endprodukte dieser zwei Prozesse, die Proteine, sind der Hauptbestandteil der Zellen. Ihre räumlich-strukturelle Ausdehnung und ihre chemischen Eigenschaften befähigen sie zu unterschiedlichsten Aufgaben wie z.B. Reaktionskatalysen, Speicherung und Transport von Stoffen, zellstrukturegebenden Funktionen oder der Regulation ihrer eigenen Synthese. Die Abfolge der Grundbausteine der Proteine, der Aminosäuren, wird durch die Sequenzabfolge der Basen in der DNA festgelegt. Seitdem in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts große Anstrengungen unternommen wurden, Hochdurchsatz DNA-Sequenzierautomaten zu entwickeln (Übersicht bei Meldrum, 2000), ist die Zahl der auf Basenabfolge entschlüsselten Genome enorm angestiegen (Sterky und Lundeberg, 2000). Dies gipfelte in der Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms (Venter *et al.*, 2001; International Human Genome Consortium, 2001). Diese Fülle von neu hinzugewonnenen Informationen erfordert die Entwicklung von neuen bioinformatischen Methoden, um die Daten einzuordnen (eine Übersicht findet sich bei Dandekar und Sauerborn, 2002). Insbesondere in der pharmakologischen Forschung werden große Hoffnungen auf neue Erkenntnisse, die aus den Genomsequenzen abgeleitet werden können, gesetzt (Ashton *et al.*, 2002). So lassen sich durch Sequenzvergleiche krankheitsrelevante Gene identifizieren und genetische Ursachen oder Prädispositionen für Krankheiten festmachen. Allerdings ist zum tieferen Verständnis zellulärer Prozesse das alleinige Wissen über die Aminosäureabfolge der beteiligten Proteine nicht hinreichend. Sämtliche Prozesse des Lebens unterliegen physikalischen Gesetzen und werden durch die Interaktion von Molekülen gesteuert. Diese Interaktionen finden an den Oberflächen dieser Biomoleküle statt und setzen in der Regel eine geordnete Raumstruktur der interagierenden Komponenten voraus. Ziel der molekularbiologischen Forschung ist es, diese Wechselwirkungen im atomaren Detail zu verstehen und zu modulieren. Diese Arbeit will einen methodischen Beitrag dazu leisten, Wechselwirkungen zwischen Peptiden und Proteinen durch Anwendung eines evolutiven Ansatzes zu studieren und auf Fragestellungen der Immunbiologie, Biotechnologie und molekularer Medizin anzuwenden.

Die nachfolgenden Abschnitte sollen einen einführenden Überblick zu immunologischen Fragestellungen von Protein-Protein Interaktionen geben (Abschnitt 1.1), Konzepte, Möglichkeiten und Grenzen der Modulation biomolekularer Wechselwirkungen aufzeigen (Abschnitt 1.2) und die gegenwärtig technischen Möglichkeiten ausloten, um Zugang zu Proteinen zu erhalten, die vorgegebenen Ansprüchen an die Bindung eines Zielproteins genügen (Abschnitt 1.3).

1.1 Antikörper-Antigen Wechselwirkungen

Ein typisches Beispiel für spezifische Interaktionen zwischen Proteinen ist die Bindung von Antikörpern an Antigene. Das Immunsystem der Vertebraten hat im wesentlichen zwei zentrale Aufgaben. Es dient zur spezifischen Abwehr von Fremdstoffen wie z.B. Viren oder Bakterien. Weiterhin dient es zur Eliminierung von veränderten körpereigenen Strukturen wie infizierten Zellen (s.o.) oder Tumorzellen (Kleining und Sitte, 1992). Für diese Aufgabe ist es speziell ausgerüstet mit den T-Lymphozyten und den B-Lymphozyten sowie den membrangebundenen und löslichen Produkten der B-Lymphozyten, den Antikörpern. Fremdmoleküle sind Antigene, die vom Immunsystem als solche erkannt werden. Dazu dienen hauptsächlich die T-Zellrezeptoren auf den T-Lymphozyten und die membranständigen oder löslichen Antikörper der B-Lymphozyten. Nahezu jede in den Organismus eindringende Fremdzelle bzw. jedes Makromolekül wird vom Immunsystem als solches erkannt und wenn möglich ausgeschaltet. Die Antikörper, die daran einen entscheidenden Anteil haben, sind aus zwei leichten und zwei schweren durch Disulfidbrücken verknüpften Ketten aufgebaut. Jede der Ketten besitzt eine variable Domäne mit drei hypervariablen Schleifen. Diese hypervariablen Bereiche sind für die spezifische Erkennung der Fremdmoleküle verantwortlich (Roitt, 1991). Dabei wird von den Immunglobulinen nicht das gesamte Makromolekül als Fremdstoff erkannt, sondern nur eine kleine Teilstruktur, das Epitop. Dieses Epitop wird von der Bindungsregion des Immunglobulins, dem Paratop, gebunden. Jedes Paratop bindet hoch spezifisch und selektiv nur eine antigene Determinante eines Makromoleküls. Da ein Makromolekül mehrere solcher antigenen Determinanten (Epitope) auf seiner Oberfläche besitzt, werden als Reaktion auf das Eindringen dieses Makromoleküls viele B-Zellen und ebenso viele Immunglobuline induziert.

Die Kenntnisse über solche antigenen Determinanten können von großer Bedeutung sein. Aus ihnen lassen sich vielfältigste Informationen ableiten. So können sie dafür benutzt werden, neue effektivere Impfstoffe gegen pathogene Viren, Bakterien oder Eukaryonten zu entwickeln (Langedijk *et al.*, 2001; van Oirschot, 1999). Sind die antigenen Determinanten nicht bekannt, so muss das gesamte Antigen zur Immunisierung verwendet werden (z.B. abgeschwächte Lebendimpfstoffe). Ebenso kann bei Kenntnis der Epitope eine Infektion effektiv durch immunochemische Verfahren nachgewiesen werden, möglicherweise sogar zwischen unterschiedlichen Stämmen eines Pathogens unterschieden werden (sofern unterschiedliche Epitope bekannt sind). Dies wiederum könnte zu einer gezielteren und dadurch effizienteren Therapie führen. Weiterhin ließen sich durch die Bestimmung von Autoantigenen neue Therapien bei Autoimmunkrankheiten entwickeln (Mennuni *et al.*, 1997).

Um solche antigenen Determinanten oder Epitope zu kartieren, werden in der Regel Peptidbibliotheken benutzt. Dazu wurden verschiedene Verfahren etabliert. Besonders häufig wird dabei auf chemische Synthesen zurückgegriffen. Das zu untersuchende Antigen wird dabei in geordneten, sich überlappenden, Peptiden auf einer festen Matrix synthetisiert. Anschließend kann nach Inkubation der Peptide mit den entsprechenden Antikörpern ein immunochemischer Nachweis des oder die Peptide nachweisen, die von den Antikörpern gebunden werden (eine Übersicht findet

sich bei Geysen *et al.*, 1984 und bei Reineke *et al.*, 1999). Oft werden auch evolutive Anreicherungsmethoden angewendet. Am häufigsten wird dabei das *Phage Display* (vergl. 1.3.1) Verfahren benutzt. Dabei wird die für das Antigen kodierende DNA fragmentiert und diese Fragmente werden dann in den Sequenzkontext eines Phagenhüllproteins gesetzt. Anschließend werden die *Phagen*, die ein Epitop präsentieren, von den entsprechenden Antikörpern gebunden und können angereichert werden. Die Sequenz des Epitops wird dann indirekt durch Sequenzierung der *Phagen*-DNA bestimmt. Als Beispiele hierfür seien die Bestimmung eines autoimmun-Epitopes, das bei der Typ1 Diabetes relevant ist (Farilla *et al.*, 2002, vergl. auch Abschnitt 1.3.1), sowie die Kartierung von Hepatitis C-Virus Epitopen (Pereboeva *et al.*, 1998 und 2000) genannt. Weiterhin konnten einzelne Epitope erfolgreich auf Bakterienzellen präsentiert und durch die entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden (vergl. Abschnitt 1.3.2).

1.2 Herstellung und Isolierung von Polypeptiden mit vorgegebenen Interaktionseigenschaften

Im Lauf der Evolution hat die Natur viele funktionell verschiedene Proteine geschaffen. Durch iterative Runden von Mutation und Selektion sind hochspezielle und präzise Werkzeuge der Zellen entstanden, die sich untereinander durch unterschiedlichste Interaktionen beeinflussen. Wenn dieses natürliche Wechselspiel zwischen den Makromolekülen aus irgendwelchen Anlässen gestört ist, hat dies für das betroffene Individuum oft fatale Folgen. So führt die Typ1 Diabetes, eine Autoimmunerkrankung, durch Fehlsteuerung des Immunsystems zur Zerstörung der β -Zellen der Langerhansschen Inseln im endokrinen Pankreas. In diesen Inseln wird das Insulin, ein Peptidhormon, das an den membranständigen Insulinrezeptor bindet, gebildet. Aufgrund dieser Wechselwirkung wird eine Signalkaskade induziert, die zur vermehrten Protein-, Glycogen- und Speicherfettsynthese führt. Durch diese vermehrte Synthese wird der Blutzuckerspiegel gesenkt und reguliert. Dass diese Regulation tatsächlich durch die Interaktion von Insulin mit der Zellmembran zusammenhängt, konnte bereits 1969 nachgewiesen werden (Cuatrecasas, 1969). Sofern aufgrund der Zerstörung der β -Zellen der Langerhansschen Inseln kein Insulin gebildet wird, erfolgt keine Regulation des Blutzuckerspiegels und es kommt zur Erkrankung. In diesem Fall ist es notwendig, die Interaktion durch Gabe von Insulin gezielt herbeizuführen. Die Regulation wird somit von außen durch Einbringen des natürlichen Interaktionspartners gesteuert. Es gibt allerdings auch wünschenswerte regulatorische Interaktionen zwischen Molekülen, für die es keine natürlichen Bindungspartner in dem jeweiligen Organismus gibt. So kann man beispielsweise die Signalweiterleitung in den Nervenbahnen durch Zugabe von Stoffen unterbrechen, die Ionenkanäle blockieren (Übersicht bei Miljanich und Ramachandran, 1995). Stoffe, die diese Funktion erfüllen, können aus der Natur isoliert werden. So finden sich in den Venomen von Meeresschnecken Peptide, die solche schmerzrelevanten Kanäle blockieren (Übersicht bei Olivera *et al.*, 1994). Nicht für jedes medizinisch, molekularbiologisch oder biotechnologisch interessante Zielprotein wird man mit

vertretbarem Aufwand einen natürlichen Modulator finden. Aus diesem Grund wird häufig versucht, die gewünschte Funktion, in den oben beschriebenen Beispielen die Fähigkeit zur Interaktion eines Moleküls mit einem vorgegebenen Protein, *de novo* zu erzeugen. Dabei kommen, sofern man proteinbasierte Interaktionspartner sucht, zwei vom konzeptionellen Ansatz her unterschiedliche Verfahren zum Einsatz: Erstens das rationale *protein design* und zweitens das evolutive *Protein Engineering*. Bei dem erstgenannten wird ausgehend von einer dreidimensionalen Kristallstruktur des Zielproteins und des potentiellen Interaktionspartners mittels computerunterstütztem molekularem Modellieren versucht, durch gezielte Austausche in der Aminosäuresequenz des Interaktionspartners, die gewünschte Funktion auf die Ausgangsstruktur zu übertragen. Anschließend werden die Vorhersagen experimentell überprüft. Durch die enormen Fortschritte in der Computertechnik, insbesondere durch schnellere Rechenleistungen, Parallelisierung von Rechenaufgaben und den Einsatz neuer Algorithmen zur Simulation von Moleküldynamik und -faltung, werden die Vorhersagen aller Voraussicht nach immer genauer (eine Übersicht geben Street und Mayo, 1999). Nach wie vor wird die gewünschte Funktionalität allerdings in der Regel nicht bei der ersten Vorhersage erreicht, sondern es müssen vielmehr iterative Näherungsschritte unternommen werden. Somit wird in aufeinanderfolgenden Durchläufen durch einen Zyklus aus Vorhersage und experimenteller Überprüfung die gewünschte Funktion des Ausgangsproteins optimiert.

Ein Problem des rationalen *Protein Engineerings* ist die Voraussetzung der genauen Kenntnis der Strukturen beider Interaktionspartner. Sind diese Informationen nicht vorhanden, so kann keine Optimierung vorgenommen werden. Es gibt aber häufig für Moleküle, für die ein Interaktionspartner gesucht wird, keine verlässlichen Strukturdaten. Weiterhin sind die Vorhersagen über Konsequenzen von Aminosäureaustauschen auf die Tertiärstruktur nur begrenzt möglich, da der Faltungsmechanismus der Proteine nicht hinreichend verstanden ist. Im Extremfall kann der Austausch einer einzigen Aminosäure zum Kollabieren der gesamten Struktur führen.

Einen konzeptionell anderen Ansatz verfolgt die zweitgenannte Methode, das evolutive *Protein Engineering*. Hierbei wird versucht, ein breites Repertoire an möglichen Interaktionsmolekülen herzustellen, die dann anschließend einer Durchmusterung unterzogen werden. Bei dieser Durchmusterung sollen dann solche Varianten isoliert werden, die die gewünschten Eigenschaften aufweisen. In der Regel werden bei solchen Verfahren die Varianten in Organismen, die als Synthesemaschinen dienen, hergestellt. Die Variation der einzelnen Moleküle wird meistens zuvor auf DNA-Ebene mittels PCR-Techniken erreicht. Sofern die gewünschte Eigenschaft die Bindung an ein vorgegebenes Zielmolekül ist (z.B. ein Ionenkanal, s.o.) ist es häufig ausreichend, die Veränderungen der Gensequenz auf bestimmte Regionen zu beschränken. Oft wird nur eine einzige Schleife, die für die Interaktion mit dem vorgegebenen Protein gedacht ist, verändert. Es bietet sich daher an, diese Veränderungen mit randomisierten Oligonukleotiden einzuführen. Nach der Klonierung der varianten Gene und deren Expression steht eine Sammlung von Molekülen mit unterschiedlichsten Eigenschaften zur Verfügung. Die Suche nach demjenigen Molekül, das die gewünschte Eigenschaft - z.B. die Blockierung eines

Ionenkanals - besitzt, kann auf unterschiedliche Weise geschehen. Der Vorteil eines solchen Verfahrens ist, dass die erzeugte Molekülbibliothek auf unterschiedlichste Funktionen hin getestet werden kann. Ist die Bibliothek - aufgrund ihres strukturellen Grundgerüsts (s.u.) - besonders geeignet, Bindemoleküle zu enthalten, die mit Ionenkanälen interagieren, so kann man aus ihr spezifische Bindemoleküle gegen viele unterschiedliche Kanäle isolieren. Die technische Schwierigkeit dieses evolutiven Ansatzes liegt darin, aus einer sehr großen Sammlung von Kandidatenmolekülen diejenigen wenigen in die Hand zu bekommen, die den vorgegebenen Ansprüchen an die Bindung eines Zielproteins genügen.

1.2.1 Anforderungen an ein strukturelles Grundgerüst für *Protein Engineering*

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Proteingrundgerüsten (*scaffold's*) wie Antikörperfragmente, Helixbündelproteine oder Lipocaline eingesetzt, von denen durch Variation oberflächenexponierter Reste Molekülbibliotheken hergestellt werden können (Übersicht bei Skerra, 2000). Soll einem solchen Grundgerüst eine neue Funktion zugewiesen werden, ist es immer von Vorteil, die Struktur und die natürliche Funktion zu kennen, um Anhaltspunkte über mögliche zu variierende Bereiche zu erlangen. Weiterhin sind an solche rahmengebende Proteine gewisse Ansprüche bezüglich der Faltungsstabilität zu stellen. Vorzugsweise sollte sich die lokal beschränkte Veränderung der Aminosäuresequenz nicht auf die Faltung des Moleküls und seine Stabilität auswirken. Soweit möglich, ist es von Nutzen, solche Proteine als Grundgerüst zu wählen, deren natürliche Funktion der gesuchten ähnlich ist. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, mit wenigen Aminosäureaustauschen die gewünschte Eigenschaft einzuführen. Ein ideales Grundgerüst sollte aus Gründen der experimentellen Überschaubarkeit möglichst klein und als Modulator biomolekularer Wechselwirkungen gut charakterisiert sein.

1.2.2 Die Familie der Cystinknoten Proteine

Eine interessante Klasse von Proteinen, die die oben genannten Anforderungen erfüllen, ist die Familie der Cystinknotenproteine. Diese sehr kleinen Proteine von nur wenigen Dutzend Aminosäuren Länge kommen in der Natur häufig vor und interagieren mit einer Vielzahl verschiedener Zielproteine. So werden einige Wachstumsfaktoren, wie NGF, TGF η und PDGF zu dieser Klasse gezählt. Diese Peptidhormone erkennen Rezeptoren auf der Zelloberfläche und lösen durch Andocken an diese, wie schon das oben beschriebene Insulin, eine Signalweiterleitung aus (eine Übersicht findet sich bei McDonald und Hendrickson, 1993). Weiterhin gehören zu dieser Klasse die oben erwähnten Conotoxine und Proteinaseinhibitoren. Allen Vertretern dieser Klasse ist die Verknüpfung der Hauptkette durch mindestens drei Disulfidbrücken gemeinsam. Bei den Vertretern der Proteaseinhibitoren und der Neurotoxine ist die Verknüpfung von sechs Cysteinresten charakteristisch. Es wird ein Ring aus zwei Cysteinbrücken zwischen den Resten C#1-C#4 und C#2-C#5 gebildet (die Nummerierung der Reste gibt die Reihenfolge in der Hauptkette an). Anschließend wird dieser Ring von einer dritten Disulfidbrücke (C#3-C#6) durchzogen. Bei den zuvor oben genannten Wachstumsfaktoren wird der Ring durch

Verknüpfung von C#2-C#5 und C#3-C#6 gebildet und dieser wird von der Bindung C#1-C#4 durchspannt (s. Abb. 1.1).

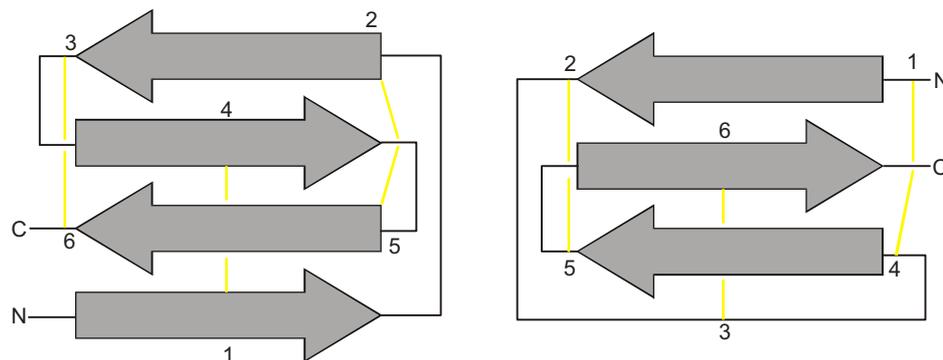


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Disulfidverknüpfung bei den Wachstumsfaktoren (links) und den Proteaseinhibitoren (rechts). Die Cysteine sind gemäß ihrer Lage in der Primärsequenz nummeriert, die Disulfidbrücken sind als gelbe Striche dargestellt, die η-Stränge sind als Pfeile und die sie verbindenden Schleifen als Striche symbolisiert.

Die Verknüpfung durch mindestens drei Disulfidbrücken verleiht den Polypeptiden eine hohe Rigidität und Stabilität (s.u.). Durch Vergleiche unterschiedlicher Vertreter wurde festgestellt, dass trotz unterschiedlichen Ursprungs und unterschiedlicher Primärsequenz große strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen unterschiedlichen Vertretern der Klasse bestehen (Pallaghy *et al.*, 1994). Allen ist ein peripherer η-Strang (I), eine Verbindungsregion bestehend aus einer Schleife oder einer 3_{10} Helix, einem weiteren peripheren η-Strang (II) und einem zentralen η-Strang (III) gemein. Diese Anordnung der Sekundärelemente ist bei unterschiedlicher Funktion, Herkunft und Aminosäuresequenz der Cystinknotenproteine immer gleich. Daher kann man von einer sehr hohen Toleranz gegenüber Aminosäureaustauschen ausgehen, ohne dass die Faltung beeinflusst wird. Diese Klasse würde somit die Anforderungen an ein strukturelles Grundgerüst für evolutives *Protein Engineering* erfüllen, sofern die gesuchte Funktion die Bindung an Zielmoleküle ist.

1.2.2.1 Der Trypsininhibitor EETI-II aus *Ecballium elaterium*

Die kleinsten bekannten Proteaseinhibitoren aus der Klasse der Cystinknotenproteine gehören zur Familie der *Squash*-Inhibitoren. Sie werden, wie der Name sagt, in Kürbisgewächsen gefunden. So konnten aus dem Samen von *Ecballium elaterium* drei Trypsininhibitoren EETI-I, EETI-II und EETI-III (steht für *Ecballium elaterium* Trypsininhibitor) isoliert und die Sequenz der Hauptkomponente EETI-II bestimmt werden (Favel *et al.*, 1989). Die Struktur des Moleküls wurde durch 2D-NMR Analysen gelöst (Heitz *et al.*, 1989; Chiche *et al.*, 1989). Die Struktur des 28 Aminosäuren langen Peptids ist nahezu identisch mit der von anderen Vertretern dieser Klasse: Es wird ein Ring – bestehend aus zwei Disulfidbrücken - gebildet, der von einer dritten durchspannt wird (s.o.). Die Anordnung der Disulfidbrücken und die Struktur des Proteins ist in Abb. 1.2 dargestellt.

Die Sekundärelemente umfassen die drei η-Stränge (Aminosäuren 8-10, 20-22 und 26-28) und eine 3_{10} Helix (Aminosäuren 12-15). Die Schleife zwischen den Cysteinen #2 und #9 ist für die Interaktion mit dem natürlichen Bindungspartner Trypsin

verantwortlich (Nielsen *et al.*, 1994). Das Arginin an Position #4 steht dabei in Kontakt mit dem Serin #194 aus dem aktiven Zentrum der Protease. Durch diesen Kontakt wird das aktive Zentrum des Enzyms blockiert.

Eine Neufunktionalisierung des Proteins könnte dadurch erfolgen, dass Aminosäurereste der Inhibitorschleife zufallsmäßig durch andere Reste ersetzt werden (Christmann *et al.*, 1999). Unter Beibehaltung der Rumpfsequenz entsteht ein Cystinknotenprotein Repertoire, das Varianten enthält, die Bindungseigenschaften zu einer Vielzahl vorgegebener Proteine aufweisen könnten. Die Durchmusterung im Hochdurchsatz sollte dann Mikroproteine mit neuen Bindungseigenschaften liefern.

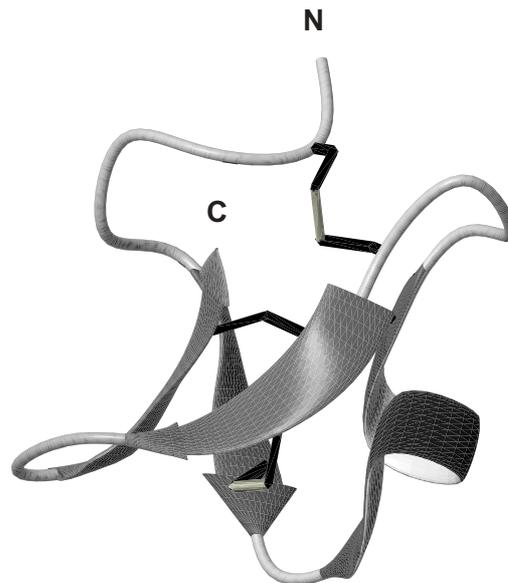


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Trypsininhibitors EETI-II. Die drei η -Stränge sind als Pfeile dargestellt, die drei Disulfidbrücken sind als schwarze Striche eingezeichnet und die Termini sind angegeben.

1.3 Genotyp-Phänotyp Kopplung

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Verfahren etabliert, um Protein/Protein Interaktionspartner aus einer zufallsmäßig erzeugten Sammlung von Kandidatenmolekülen isolieren zu können. Bei allen bisher beschriebenen Verfahren ist es notwendig, über mehrere iterative Runden von Anreicherungen den oder die gewünschten Interaktionspartner aus einer großen Sammlung von möglichen Liganden herauszufischen. In der Regel ist es von Vorteil, die charakteristischen Merkmale der Moleküle aus der Bibliothek, die durchmustert wird, mit ihrer korrespondierenden DNA-Sequenz in die nächste Anreicherungsrunde zu übertragen und dabei eine Phänotyp/Genotyp Kopplung auszunutzen.

Ein Beispiel für eine solche Phänotyp/Genotyp Kopplung ist die *Peptides-on-Plasmid* Technik (Cull *et al.*, 1992). Dabei werden die zu durchmusternden Proteinvarianten als Fusionsproteine mit der DNA-Bindedomäne des Lac-Repressors produziert. Durch Bindung des Repressors an die korrespondierende Sequenz des Plasmids werden Proteinvarianten mit ihrer kodierenden Sequenz verknüpft. Heute gebräuchlicher sind Verfahren, bei denen die Bibliotheken auf selbstreplizierenden Trägern – Organismen oder, über den Umweg einer Wirtszelle, Phagen – für eine Abfrage der Eigenschaften präsentiert werden. Auf diese Verfahren, das *Phage Display* und die Zelloberflächenpräsentation von Peptiden und Proteinen soll in den folgenden Abschnitten näher eingegangen werden.

1.3.1 *Phage Display*

Bei diesem Verfahren werden die zu durchmusternden Proteine oder Peptide auf der Oberfläche von Bakteriophagen verankert, die in ihrem Genom die DNA-Sequenz der präsentierten Variante tragen. Durch die Präsentation auf den Phagenpartikeln lassen sich die Eigenschaften der Varianten abfragen. Die Präsentation erfolgt durch die Fusion eines Gens, das für ein Protein der Phagenhülle kodiert, mit dem Gen kodierend für das zu präsentierende Protein. Die Expression des Hüllgens führt zu einem bipartiten Fusionsprotein aus dem Hüllprotein des Bakteriophagen und dem auf seine Eigenschaften zu untersuchenden Protein. Durch den Einbau des Strukturproteins in die Phagenhülle wird das Protein/Peptid auf der Phagenoberfläche präsentiert. Am häufigsten werden filamentöse nicht lytische Phagen (M13, f1 oder fd) benutzt, aber auch ζ -Phagen können eingesetzt werden (Sternberg und Hoess, 1995). Filamentöse Phagen eignen sich aufgrund ihres relativ kleinen Genoms, der Stabilität ihrer infektiösen Partikel (Virionen) und ihrer Akkumulation in hohen Titern hervorragend zum *Phage Display*. Die Infektiösität der Virionen wird durch die Fusion des zu präsentierenden Proteins/Peptids häufig nicht beeinflusst (Smith, 1985).

Die Isolierung von Phagen-exponierten Bindeproteinen oder -Peptiden erfolgt mittels Immobilisierung des Zielproteins an einer festen Matrix und anschließender Zugabe der Phagenbibliothek. Liganden für das Zielprotein binden an den gekoppelten Interaktionspartner und werden so durch Sorption aus der Lösung entfernt. Durch Elution der gebundenen Phagen z.B. durch einen pH-Schock sowie Reinfektion von Bakterien mit diesen Virionen erfolgt eine Anreicherung von Phagenpartikeln, die einen Liganden für das jeweilige Zielprotein binden.

Phage Display wird häufig für die Isolierung von Antikörperfragmenten verwendet (eine Übersicht findet sich bei Pini und Bracci, 2000; Hoogenboom, 2002). So wurden ausgehend von cDNA Bibliotheken Immunglobulinfragmente mit Bindungskonstanten von 10^5 - 10^7 M^{-1} isoliert (Griffiths *et al.*, 1993; Marks *et al.*, 1993). *Phage Display* eignet sich aber nicht nur für die Isolierung von scF_v-Fragmenten, sondern auch für eine Vielzahl anderer Molekülvarianten (Adda *et al.*, 2002). So konnten z.B. aus einer auf der Cellulosebindedomäne aus dem *T. reesei* basierenden Peptidbibliothek Moleküle isoliert werden, die mit alkalischer Phosphatase interagierten (Smith *et al.*, 1998). Es kann aber auch zur Identifizierung von natürlichen Interaktionspartnern eingesetzt werden. So wurde ein für die Differenzierung von Osteoblasten essentielles Protein durch Anreicherung mit *Phage Display* isoliert (Sheu *et al.*, 2002). Ebenso wurde das

Phage Display erfolgreich zur Bestimmung von Epitopsequenzen eingesetzt (vergl. Abschnitt 4.1).

1.3.2 Zelloberflächenpräsentation

Ein anderer Weg, die Kopplung von Genotyp und Phänotyp zu erreichen, ist die Präsentation von Peptiden oder Proteinen auf lebenden Organismen. Dabei wird der Umweg über einen Phagen vermieden. Als Organismen werden Bakterien, aber auch Eukaryonten, verwendet. So hat sich beispielsweise die Oberflächenpräsentation auf Hefezellen in den letzten Jahren für die Isolierung von Bindeproteinen gut bewährt (Übersicht bei Schreuder *et al.*, 1996). Durch Fusion einer scF_V Fragmentbibliothek an das Aga2p (die Adhäsionsuntereinheit des ζ-Agglutinis) wurden Antikörperfragmente isoliert, die eine dreifach geringere Antigen-Dissoziationskonstante besaßen (Boder und Wittrup, 1997). Ebenso konnten durch Präsentation von scF_V Fragmenten auf Hefezellen spezifische Binder für die V η 8 Region des humanen T-Zellrezeptors gefunden werden (Kieke *et al.*, 1997). Aus einer scF_V Bibliothek konnte durch Hefedisplay ein Fluoreszeinbindemolekül isoliert werden, das einen K_d von 48 fM und eine langsamere Dissoziationskinetik als der Komplex zwischen Streptavidin und Biotin aufwies (Boder *et al.*, 2000).

Das Präsentieren von Proteinen und Peptiden auf Hefezellen hat sich als eine erfolgreiche Strategie der Phänotyp/Genotyp Kopplung erwiesen, um Liganden für ein vorgegebenes Molekül zu isolieren. Allerdings ist die Größe der zu durchmusternden Bibliotheken durch die niedrige Transformationseffizienz von Hefen stark eingeschränkt. Der Nachteil, dass die Ausgangsbibliotheken, die durchmustert werden können, kleiner als beim *Phage Display* sind, kann teilweise dadurch kompensiert werden, dass in Hefe genetische Diversität auch durch Kreuzung und Rekombination erzeugt werden kann.

Eine noch breitere Anwendung finden Bakterien bei der Zelloberflächenpräsentation von Proteinen oder Peptiden. In der Literatur finden sich Beispiele für die Verwendung sowohl Gram-positiver als auch Gram-negativer Arten. So konnten auf *Staphylococcus xylosus* und *Staphylococcus carnosus* Proteine durch Fusion mit SpaA (*Staphylococcus aureus* Protein A) präsentiert werden (Hansson *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 1993, 1995; Samuelson *et al.*, 1995; Robert *et al.*, 1996). Durch die Fusion an *Staphylococcus aureus* Fibronectin Bindeprotein B (FnBPB) konnten Enzyme auf der Oberfläche von *S. carnosus* verankert werden (Strauss und Götz, 1996). Eine ausführlichere Übersicht über die verschiedenen Display Verfahren in Gram-positiven Zellen findet sich bei Hansson *et al.*, 2001.

Die Verwendung von Gram-positiven Bakterien ist aber ebenso wie die Verwendung von Hefezellen mit dem Nachteil behaftet, dass die Transformationseffizienz gering ist. So lassen sich durch Transformation mit 1 μ g DNA 10⁶ *Staphylococcus carnosus* Transformanten erzeugen (Götz, 1990). Die Erzeugung sehr großer Bibliotheken, wie sie für gewöhnlich im *Protein Engineering* eingesetzt werden, ist daher äußerst aufwendig. Bei Anwendungen, bei denen nicht so viele Primärtransformanten benötigt werden, ist die Präsentation von Proteinen oder Peptiden auf Gram-positiven Bakterien eine Alternative zum *Phage Display*. Insbesondere wird angedacht, solche Bakterien als Lebendimpfstoffe einzusetzen. So

konnten im Blut oral infizierter Mäuse Antikörper nachgewiesen werden, die gegen ein präsentiertes Epitop gerichtet waren (Nguyen *et al.*, 1995).

Am weitesten verbreitet ist die Zelloberflächenpräsentation auf *Escherichia coli* Bakterien. Da es sich um die gleichen Bakterien handelt wie die, die in der Regel beim *Phage Display* verwendet werden, sind auch die Grenzen bezüglich der durch Transformation erreichbaren Größe der Bibliotheken vergleichbar. So können durch Transformation von 1 µg Plasmid-DNA mehr als 10^9 Transformanten erzeugt werden (Dower *et al.*, 1988), etwa um den Faktor 1000 mehr als bei Hefezellen oder Gram-positiven Bakterien.

Als Verankerung auf der Zelloberfläche werden häufig Proteine der äußeren Membran benutzt. So konnten in eine Schleife von LamB (einem Porin) Peptide inseriert (Charbit *et al.*, 1986 und 1988) und rekombinante Zellen, die über diese Peptide Metallionen binden, identifiziert werden (Brown, 1992; Sousa *et al.*, 1996). Ebenso wurden zwei Bereiche in PhoE gefunden, die sich für die Insertion von Peptiden eignen (Agterberg *et al.*, 1990a) und somit die Präsentation von Peptiden ermöglichen (Agterberg *et al.*, 1990b; Janssen *et al.*, 1994). Bei der Verwendung von Porinen als Trägerprotein spielt jedoch die Länge der präsentierten Peptide eine kritische Rolle. So beeinflusst die Insertion von Peptiden von mehr als 50 Aminosäuren die Faltung und die Einbettung von Porinen in die äußere Membran. Zusätzlich haben Porine den Nachteil, dass die Termini der Proteine zum Periplasma weisen, sich also auf der Innenseite der äußeren Membran befinden. Somit ist lediglich die Insertion von Peptiden in Schleifenregionen möglich, eine terminale Fusion eines ganzen Proteins ist jedoch nicht möglich. Eine Lösung dieses Problems war die Verwendung eines bipartiten Fusionsproteins aus den ersten 9 Aminosäuren des Lpp (Braunschies Lippoprotein) und einem verkürzten OmpA Protein. Das C-terminal an das OmpA Protein gekoppelte Passagierprotein wird dann auf der Zelloberfläche präsentiert. Auf diese Weise konnten η-Lactamase, Antikörperfragmente und Proteaseinhibitoren auf der bakteriellen Zelloberfläche präsentiert werden (Francisco *et al.*, 1992; Daugherty *et al.*, 1999; Christmann *et al.*, 1999).

Auch die Klasse der Autotransporter (Übersicht über diese Proteine bei Henderson *et al.*, 1989) wurde erfolgreich für die Präsentation von Peptiden und Proteinen auf der Oberfläche von Bakterien genutzt. Ein solcher Autotransporter ist die der IgA-Protease des humanpathogenen Bakteriums *Neisseria gonorrhoeae*. Die C-termiale Domäne der Protease faltet in der äußeren Membran und bildet dort eine Pore, durch die die N-terminale Proteasedomäne nach außen durchgezogen wird. Dort spaltet sich die Proteasedomäne autoproteolytisch ab und wird ins Medium freigesetzt (Klauser *et al.*, 1993). Dieser Mechanismus funktioniert auch in *E. coli* und *S. typhimurium* (Klauser 1990, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass das CtxB (Cholera Toxin B [Lockman und Kaper, 1983]) durch Fusion an die IgA-η Untereinheit auf *E. coli* und *S. typhimurium* Zellen präsentiert wird (Klauser *et al.*, 1990; 1992). Der Transport von CtxB durch die äußere Membran ist vom Faltungsstatus des Proteins abhängig. Ein Membrantransport findet nur statt, wenn die Ausbildung einer Disulfidbrücke im Protein unterdrückt wird (Jose *et al.*, 1996).

Ein weiterer Vertreter der Autotransporter, der für die Präsentation von Peptiden und Proteinen auf Bakterien verwendet wird, ist der *E. coli* Autotransporter AIDA. Dieser Transporter funktioniert im Prinzip wie die η -Untereinheit der IgA-Protease. Durch genetische Fusion an den AIDA Transporter ließen sich CtxB (Maurer *et al.*, 1997), Epitope (Koniczny *et al.*, 2000) und η -Lactamase (Lattemann *et al.*, 2000) präsentieren.

Eine weitere Möglichkeit, Proteine oder Peptide auf der Zelloberfläche zu verankern, bieten die Fimbrien oder ähnliche Zellanhängsel. So konnten Peptide in die Pili FimH (Pallesen *et al.*, 1995) und PapA (Steidler *et al.*, 1993) inseriert werden. Häufig werden auch Peptide in eine variable Domäne der Hauptkomponente der Flagellen FliC inseriert. Dadurch entsteht keine Defizienz der Flagellenassemblierung oder der Funktion (Westerlund-Wikstrom *et al.*, 1997).

Ein generelles Problem bei der Präsentation von Fremdproteinen auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen ist die mit der Überproduktion des Membrananker-Passagierproteinhybrids einhergehende eingeschränkte Überlebensfähigkeit produzierender Zellen, die eine stabile Vermehrung großer molekularer Repertoires membranverankerter Passagierproteine nahezu unmöglich machte (Daugherty *et al.*, 1999). Für die in dieser Arbeit beschriebenen Studien zu Protein-Protein Interaktionen wurde daher auf ein neues Verfahren zurückgegriffen, das auf der Verwendung des Intiminproteins als Membrananker beruht.

1.3.3 Das Intimin Protein von enteropathogenen *Escherichia coli* Zellen als Membranverankerungsdomäne für Peptide und Proteine

Pathogene Bakterien verfügen im Gegensatz zu nicht pathogenen über ein weiteres Protein Sekretionssystem, die sogenannte Typ III Sekretion. Gene, deren Produkte an diesem Translokationsmechanismus beteiligt sind, liegen im Genom oder auf einem Plasmid zusammenhängend auf sogenannten Pathogenitätsinseln. Zusätzlich zu den an der Translokation beteiligten Proteinen werden von diesen Geninseln die sekretierten Pathogenitätsfaktoren kodiert (vergl. Abschnitt 4.2, und als Übersicht Hueck *et al.*, 1998).

Die Pathogenität von enteropathogenen und enterohemoragischen *E. coli* Bakterien (EPEC/EHEC) setzt die Anwesenheit einer solchen Pathogenitätsinsel voraus. Im Laufe der Infektion werden unterschiedliche Effektorproteine von den Bakterien in die Darmepithelzellen über das Typ III Sekretionssystem geschleust. Die Bedingung für diesen Vorgang ist ein enger Kontakt zwischen den Bakterien und den Epithelzellen. (Frankel *et al.*, 1998). Dieser enge Kontakt zwischen der eukaryontischen Zielzelle und den Bakterien wird durch die Bindung des auf der äußeren Bakterienmembran lokalisierten Intimins (steht für *intimate attachment*) an seinen auf der Eukaryontenzelle lokalisierten Rezeptor Tir bewerkstelligt. Beide Proteine werden von einer Typ III Pathogenitätsinsel kodiert. Der Rezeptor Tir wird vermutlich über EspA Filamente in die Eukaryontenzelle geschleust (Delahay *et al.*, 1999). Dort wird der Rezeptor phosphoryliert und in der Membran verankert (Rosenshine *et al.*, 1996). Somit stellen die Bakterien beide Komponenten, die für die Bindung erforderlich sind, bereit. Das Intimin gehört zur Klasse der bakteriellen Adhesine (Phillips *et al.*, 2000) und setzt sich aus einer Membrandomäne, drei daran anschließenden immunglobulinähnlichen Domänen (D0-D2) und einer lectinähnlichen Domäne (D3) zusammen. Die Struktur

der für die Bindung verantwortlichen Domäne wurde mittels NMR geklärt (Kelly *et al.*, 1999). Später wurde die Struktur der drei äußeren Domänen einzeln sowie im Komplex mit Tir durch Röntgenkristallographie aufgeklärt (Luo *et al.*, 2000). Die Struktur der membranständigen Domäne ist noch nicht bekannt. Die Bindung zum Rezeptor erfolgt über die lectinähnliche Domäne D3 (s. Abb. 1.3).

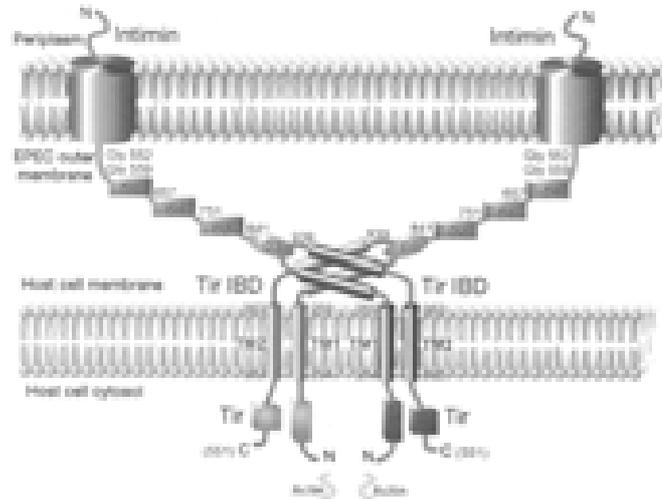


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Bindung von *E. coli* Bakterien an Darmepithelzellen. Die Bindung erfolgt über die endständige Domäne D3 des Intimins an den Tir-Rezeptor. *Periplasm*, Periplasmatischer Raum, *EPEC outer membrane*, äußere Membran des EPEC Bakteriums; D0-D3, Extrazelluläre Domänen des Intimins; Tir, Tir-Rezeptor; *Host cell membrane*, Membran der Epithelzelle; TM1/TM2, Transmembranregion des Tir-Rezeptors; *Host cell cytosol*, Cytosol der Epithelzelle; Actin, Aktinfilament. (Abb. aus Luo *et al.*, 2000).

Aufgrund seiner strukturellen und funktionellen Eigenschaften scheint das Intimin als Träger für die Exposition von Fusionsproteinen auf der Zelloberfläche besonders gut geeignet. Zum einen besitzt es gegenüber den Porinen einen freien Carboxyterminus, der zum extrazellulären Medium weist und dadurch die C-terminale Fusion einer Passagierdomäne zulässt. Diese Passagierdomäne wird ebenso wie die immunglobulinähnlichen Domänen zum extrazellulären Medium exponiert. Zum anderen ist Intimin ein natürliches *E. coli* Protein, so dass Einschränkungen der Vitalität durch Überproduktion eines Intimin-Passagier-Fusionsproteins möglicherweise in geringerem Umfang zu erwarten sind, als dies bei Verwendung von Fremdproteinen als Membrananker möglicherweise der Fall ist. Zusätzlich verfügt das Intimin über mehrere Domänen, die ins Medium hineinreichen, so dass das präsentierte Protein/Peptid in größerem Abstand zur Membran steht. Eine Einschränkung der Wechselwirkung mit einem Zielprotein durch sterische Hinderung der äußeren Bakterienmembran wird somit unwahrscheinlicher. Zur Präsentation von Proteinen wurde ein verkürztes Intimin (die Domänen D3 und D2 wurden genetisch entfernt) eingesetzt (Wentzel *et al.*, 2001; Christmann *et al.*, 2001). Bei diesem System werden die korrespondierenden Genabschnitte der zu präsentierenden Peptide oder Proteine genetisch an das 3'-Ende dieses verkürzten - durch einen separaten Promotor regulierbares - Intimin Gen fusioniert. Durch Induktion der Genexpression entsteht ein bipartites Fusionsprotein bestehend aus dem verkürzten Intimin und dem

Peptid/Protein. Durch Verankerung des Intimins in der äußeren Bakterienmembran wird das Peptid/Protein auf der Zelloberfläche exponiert (Wentzel *et al.*, 2001) und damit einer Funktionsabfrage zugänglich gemacht (s. Abb. 1.4).

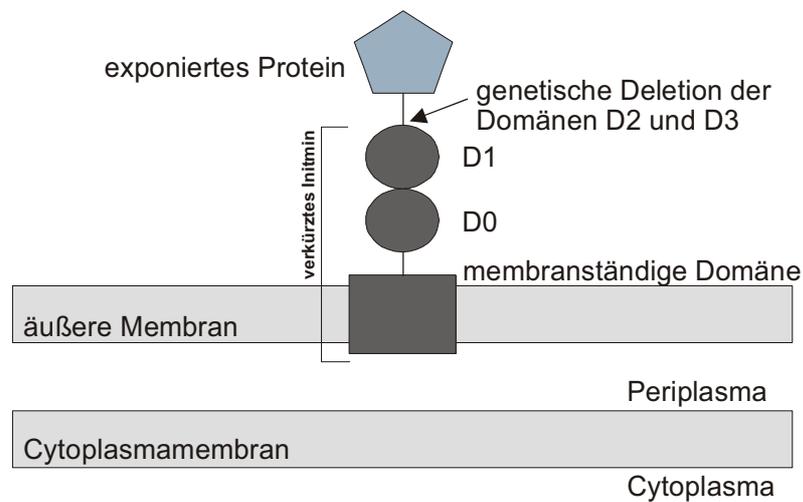


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Präsentation von Peptiden oder Proteinen auf der äußeren Membran von *E. coli* Bakterien unter Verwendung eines um die zwei äußeren Domänen (vergl. Abb. 1.3) verkürzten Intimin Proteins. Die Verkürzung erfolgte auf DNA-Ebene, die Präsentation erfolgt durch genetische Fusion des zum exponierenden Protein korrespondierenden Gen an das 3'-Ende des Intimings.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein Verfahren zu entwickeln, das es gestattet, kombinatorische Bibliotheken von Peptiden und Proteinen mit geringem experimentellem Aufwand nach Varianten durchmustern zu können, die vorgegebenen Ansprüchen an die Bindung eines definierten Zielproteins genügen. Hierfür sollten zufallsmäßig erzeugte Sammlungen von Peptiden/Proteinen erzeugt, einzeln aber in multipler Kopiezahl auf der Oberfläche von *Escherichia coli* Zellen präsentiert und einer Abfrage bezüglich ihrer Bindungseigenschaften gegenüber vorgegebenen Zielproteinen zugänglich gemacht werden. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollten zum Nachweis der generellen Machbarkeit dieses experimentellen Ansatzes natürliche Interaktionspartner von Antikörpern isoliert und genbasierte Peptidfragmentbibliotheken nach Epitopsequenzen durchmustert werden. Das Ziel war dann, die genauen Bindungsstellen der Antikörper an dem betreffenden Protein zu bestimmen. Im zweiten Abschnitt der Arbeit sollten in einem evolutiven Ansatz neue Bindemoleküle mit definierten Eigenschaften zu vorgegebenen natürlichen Proteinen produziert, isoliert und charakterisiert werden. Dazu sollten Peptidbibliotheken angelegt werden, die via bakterieller Oberflächenpräsentation durchmustert werden können. Bisher war die Präsentation von Molekülbibliotheken von mehr als 10^9 verschiedenen Varianten für Phage Display jedoch nicht für *E. coli* Bakterien beschrieben. Diese Arbeit sollte ausloten, ob es möglich ist, so große Sammlungen

von Peptidvarianten in *E. coli* durch bakterielle Oberflächenpräsentation zu präsentieren und Durchmusterungsverfahren zu etablieren, die es gestatten, interessante Peptid- oder Proteinvarianten aus solchen komplexen Sammlungen zu isolieren.

2. Material

2.1 Verwendete Bakterienstämme

Escherichia coli:

BMH 71-18 (Quelle: B. Müller-Hill):

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

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

BMH 71-18, *mutS*::Tn10

BMH 71-18 dsbA (Kolmar unveröffentlicht)

BMH 71-18, *dsbA*::Tn5

Der Stamm BMH 71-18 *dsbA* wurde durch P1 Transduktion ausgehend von *E. coli* JCB609 *dsbA*::Tn5 (Bardwell *et al.*, 1991) hergestellt.

BMH 71-18 P' (Kolmar unveröffentlicht)

Der Stamm ist resistent gegen lytische Phagen, er wurde durch Anzucht während einer Phageninfektion selektiert.

DH5ζ (Hanahan, 1983)

F-, λ80dlacZ÷M15, *endA1*, *recA1*, *hsdR17* (*r_k⁻m_k⁺*), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, ÷(*lacZYA-argF*)U169, *ζ⁻*

DH5ζZ1

DH5ζ *tetR⁺*, *lacI⁺*, *sp^f*

TG1

F' *traD36 lacI^qlacZ÷M15 proA⁺B⁺/supE* (*hsdM-mcrB*) (*r_k⁻m_k⁺McrB*) *thi* (*lac-proAB*)

2.2 Bakteriophage

M13K07 (Vieira und Messing, 1987)

Dieser Bakteriophage wurde als Helferphage zur Produktion von einzelsträngiger Phasmid-DNA verwendet. Er vermittelt eine Kanamycinresistenz.

2.3 Vektoren

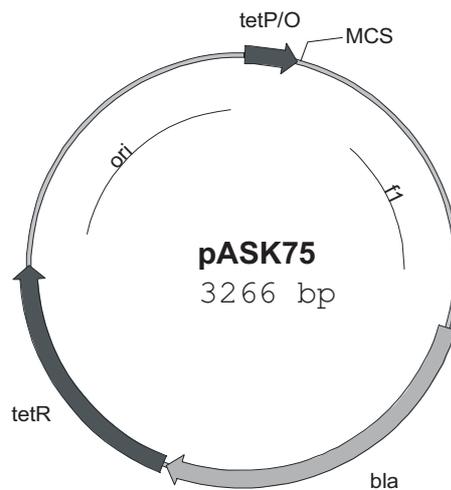


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Plasmids pASK 75 (Skerra 1994). bla, Gen kodierend für die η -Lactamase; tetR, Gen kodierend für den Tetracyclin-Repressor; ori, colE1 Replikationsursprung; tetP/O, Tetracyclin Promotor/Operator Region; MCS, multiple Klonierungsstelle; f1, Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1. Dieser Vektor diente als Expressionsvektor und er war das Ursprungsplasmid für den Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt. Er verfügt über eine streng regulierte Tetracyclin Promotor/Operator Region.

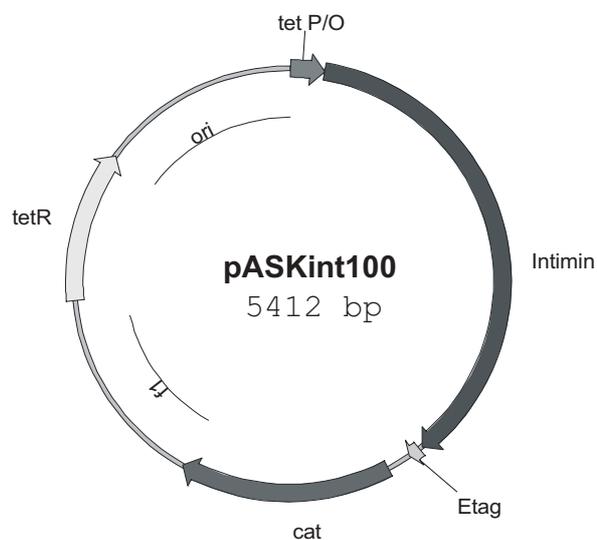


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Oberflächenpräsentationsvektors pASKInt100 (Wentzel *et al.* 2001). tet P/O, Tetracyclin Promotor/Operator Region; Intimin, Gen kodierend für das verkürzte Intimin (Wentzel *et al.*, 2001); Etag, Sequenz kodierend für das Etag Epitop; cat, Gen kodierend für die Chloramphenicol-Acetyltransferase; f1, Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1; tetR, Gen kodierend für den Tetracyclin-Repressor; ori, colE1 Replikationsursprung, tetP/O, Tetracyclin Promotor/Operator Region. Dieser Vektor war der Standardvektor für die bakterielle Oberflächenpräsentation von Peptiden. Die kodierende DNA-Sequenz für das zu präsentierende Peptid wurde hinter die kodierende DNA-Sequenz für das Etag Epitop, dass von dem monoklonalen anti-Etag Antikörper erkannt wird, kloniert.

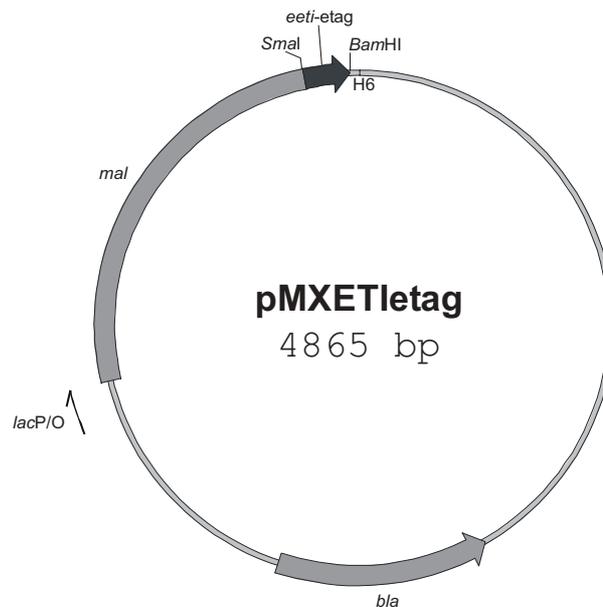


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des pMXETIetag. *lacP/O*, lac Promotor/Operator Region; *mal*, Gen kodierend für das *E. coli* Maltose Bindeprotein; *eeti-etag*, Gen kodierend für ein Cystinknotenprotein basierend auf EETI-II mit dem Etag Epitop im Bereich der Inhibitorschleife; *bla*, Gen kodierend für η -Lactamase; H6 kodierender Bereich für ein Hexa-Histidin Anhängsel; *SmaI*, Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SmaI*; *BamHI*, Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI*.

Dieser Vektor wurde zur Expression von isolierten Peptiden als MalE-Fusion benutzt. Die DNA wurden hinter die für das MalE kodierende DNA Sequenz kloniert. Nach Induktion mit IPTG wird so ein bipartites Fusionsprotein, aus MalE, und dem Peptid (mit C-terminalem H6 zu Reinigungszwecken) produziert.

2.4 Verwendete Oligonukleotide

AskPromNhe:	5'-GCGCGCTAGCCCATCGAATGGCCAGATG
Ask-up IR:	5'-IRD800-TACCACTCCCTATCAGTG
AvaI-adaptor_lo:	5'-CCCGGAACCGCTTCCGGAC
AvaI-adaptor_up:	5'-CCGGGTCCGGAAGCGGTTCCGGG
AW-Cat-S/H-Lo:	5'-CGCGTCGACAGGCTTGAAAACGTTTCAGTTTGC
BamHI-adaptor_lo:	5'-GATCCTGCGGGTCAGTCAGTTA
BamHI-adaptor_up:	5'-TAACTGACTGACCCGCAG
Bla-BglII-up:	5'-CGGGAGATCTCACCCAGAAACGCTGGTG
Bla-Hind-lo:	5'-GCGCAAGCTTACCAATGCTTAATCAGTG
CAT-Hind_lo:	5'-CCACAAGCTTGAAAACGTTTCAGTTTG
C-Mix8-Cup:	5'-GCGCCCCGGGTGCNNSNNSNNSNNSNNSNNS NNSNNSGGATCCTGCTAACAGGACTCCGACTGC
CSFV_lo:	5'-GGCATAGGCACCAAACCAGGT
CSFV_up:	5'-GAGAACATAACTCAATGGAAC
Etag-PfuII-Up:	5'-GCGCCAGCTGGGTGFCGCCGGTACCGTATCC
Etag-seq_up:	5'-IRD800-AATTCCTCCAACGCCCTG

ETIRand10:	5'-GACGCCCGGGTGCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNS NNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNS
ETIRand6:	5'-GACGCCCGGGTGCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNS AACAGGACTCCG
pASK-cat-5'seqlo:	5'-TATCAACAGGGACACCAGG
pASKdownABI:	5'-GACAGCTATCGCGATTGCAG
pASKu-IR:	5'-IRD800-TTAATGCGCCGCTACAGG
pASKupABI:	5'-GTAGCGGTAAACGGCAGAC
pcrvlo-NEW:	5'-GCGCAGATCTGATCGCGCTGAGAATGTCGCG
pcrvup:	5'-GCGCTCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGGA AGTCAGAAACCTTAATG
PMSIlo:	5'-TCATATTTTCGTAATCCTTC
PMSIup:	5'-GCGATGTTTCACCACATCG
Reptemp-up:	5'-GCGCGCTAGCAAACAGGACTCCGACT

Dabei steht N für alle Nukleotide und S für G oder C.

2.5 DNA-Längenstandards

Fragmentgröße in bp:

100bp DNA Leiter :	1000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100; 80
1 kb DNA Leiter:	10000; 8000; 6000; 5000; 4000; 3500; 3000; 2500; 2000; 1500; 1000; 750; 500;250
Lambda DNA/ <i>Hind</i> III:	23130; 9416; 6557; 4361; 2322; 2027; 564; 125
Lambda DNA/ <i>Eco</i> 47 I:	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; 73; 67; 47; 42; 32; 28; 23
Lambda DNA/ <i>Eco</i> 91 I:	8453; 7242; 6369; 5687; 4822; 4324; 3675; 2323; 1929; 1371; 1264; 702; 224; 117

Alle DNA-Längenstandards wurden von MBI-FERMENTAS bezogen.

2.6 Proteine und Enzyme

5prime-to-3prime Inc., USA

Anti- η -Lactamase Antikörper (entwickelt in Kaninchen)

Boehringer Mannheim, Mannheim

DNaseI, Streptavidin

MBI-Fermentas, Vilnius, LitauenRestriktionsendonukleasen, Rinderserumalbumin (BSA), T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase; *Calf intestine* Alkalische Phosphatase (CIAP), Polynukleotid Kinase (PNK)**Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach**Streptavidin gekoppelte *paramagnetic beads***Molecular Probes, Oregon, USA**

Streptavidin-R-Phycoerythrin, Phycoerythrin

New England Biolabs (NEB), Bad Schwalbach

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase

Promega, Madison, USA*Tfl*-DNA-Polymerase**Sigma, Saint Louis, USA**

Anti Maus Ig (Biotin Konjugat), Produkt Nr.: B-7264

Anti Maus Ig (FITC Konjugat), Produkt Nr.: F-0257

Anti Kaninchen Ig (Biotin Konjugat), Produkt Nr.: B-7389

Anti Human Ig (Biotin Konjugat, polyvalent), Produkt Nr.: B-9015

Anti Ziege Ig (Biotin Konjugat), Produkt Nr.: B-7014

Sonstige:

Anti-Sendai-Antikörper: Der Anti-Sendai-Antikörper wurde von H. Einberger zur Verfügung gestellt.

Anti CSFV-E^{ms} Antikörper: Verschiedene Antikörper wurden von Prof. Thiel (Justus-Liebig-Universität Giessen, Virologie) zur Verfügung gestellt (vergl. Abschnitt 4.1).

Anti-PMS1-Antikörper: Die Seren wurden von Dr. Wilfried Kramer (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

2.7 Chemikalien

Acros, New Jersey

Anhydrotetracyclin

Baker, Denventer, Holland

Dimethylformamid

Beckmann Coulter, Miami, USA

Fluorosphere Beads

Biacore, Freiburg

Kits zur chemischen Kopplung von Proteinen an Sensorchips CM5

Biozym, Hessisch Oldendorf

Biozym DNA Agarose

Boehringer, Mannheim

Adenosin-5' Triphosphat (ATP), Ampicillin (Natriumsalz), 2'-Desoxyribonukleosid-5' Triphosphate (dNTP's)

Difco, Dreieich

Bacto-Agar, Bacto Peptone

Epicentre Technologies, Madison, USA

Adenosin-5' Triphosphat (ATP),

Fluka, Neu Ulm

Dimethylsulfoxid (DMSO), Bromphenolblau, Glycerin, η -Merkaptoethanol, Dimethylformamide (DMF)

Gibco/BRL, Eggenstein

Hefeextrakt

Macherey-Nagel, Düren

Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids

Metabion, München

Oligonukleotide

MJ-Research, Watertown, USA

Chill out 14 (PCR-Wachs)

MWG, Ebersberg

Oligonukleotide

Naps, Göttingen

Oligonukleotide

National Diagnostics, Simmerville, New Jersey, USA

Protogel, Sequagel XR, Sequagel Complete

Oxoid, Wesel

Agar Bacteriological, Trypton

Riedel-de Haen, Seelze

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

Serva, Heidelberg

Dithiotreitol (DTT), Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz (EDTA), D(+) Glukose-Monohydrat, Harnstoff, Natriumdodecylsulfat (SDS)

Sigma-Ark, Steinheim

Oligonukleotide

Sigma, Deisenhofen

Borsäure, Chloramphenicol, Ethidiumbromid, Kanamycin, Polyethylenglycol (PEG), Bromphenolblau, Triton-X 100

Merck, Darmstadt

Alle anderen verwendeten Chemikalien

2.8 Sonstige Materialien und Geräte

Applied Biosystems, Freiburg

Vision Workstation

Bender & Hobein AG, Zürich

Vortex Genie 2

Biacore AB, Freiburg

Biacore 1000 (*upgrade version*), Sensorchips CM5

Biorad

Gene Pulser

Biozym, Hessisch Oldendorf

PCR-Tube (ultradünn), 0,2 mm

Braun, Melsungen

Injektions-Kanülen

Ceag Schirp Reinraumtechnik, Bork

Envirco Sterilbank

Constant Systems Ltd, England

Zell-Disruptor

Coulter Corporation, Hialeah USA

Fluoreszierende *MicroBeads*

Cybertech, Berlin

Cybertech CS-1 Elektronische Sofortbildkamera

Cytomation Inc., Texas

MoFlo Cell-Sorter, Cyclops Software

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf-Reaktionsgefäße

Gilson

Pipetman Pipetten (20, 200 und 1000 µl)

Genomed, Bad Oeynhausen

JetStar Plasmid Midiprep Kit 2.0

Greiner, Nürtingen

Petrischalen, 12 ml Röhrchen

Helma, Müllheim/Baden

Quarzküvetten

Hettich, Tuttlingen

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

H+P Labortechnik, München

Variomag-Mini-Kleinstmagnetrührer

Ingold, Steinbach

pH-Elektrode

IKA-Labortechnik, München

Beheizbarer Magnetrührer

Kimberley-Clark

Kimwipes (fusselreie Papiertücher)

Kontron, Eching

Ultrazentrifuge Centricon T1055, Zweistrahl-Spektralphotometer Uvicon 930

Köttermann Labortechnik

Wasserbad

Milipore, Eschborn

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

Miltenyi-Biotech, Bergisch Gladbach

MS⁺Separation Columns, Ständer und Magnet für MACS

MJ Research, Watertown, USA

Thermal Mini-Cycler PTC-150

MWG-Biotech

LI-COR DNA-Sequencer model 4000L/4200, Primus 96 Thermocycler

Pharmacia, Freiburg

Novablot Elektrophoretische Transfer Apparatur, FPLC Anlage, *Chelating* Sepharose

Sarstedt, Nürnberg

Reaktionsgefäße (1,5 ml), Röhrchen (50 ml), Multiple Well Plate 96-Well Nr. 82.1582.001, Röhre 5 ml (75x12 mm) Nr. 55.526.006

Sartorius, Göttingen

Sterilfilter, Sartorius universal U 4800 P Feinwaage

Savant Instruments, Vaterstetten

Speed Vac Concentrator SVC 100H

Schleicher und Schüll, Dassel

Nitrozellulose Membranen, Whatman-Papier

Schott

Alle Glaswaren

SLM

French Press Anlage

Silicon Graphics, Haar

Graphic Workstations

Sorvall, Bad Nauheim

Zentrifuge RC-5C

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim

pH-Meter-522

Zeiss, Oberkochen

Mikroskop Axioskop mit Durchlicht und Auflichtfluoreszenz

2.9 Medien**Antibiotic Medium 3 (Difco)**

0,15 % (w/v) Rinderextrakt; 0,15 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) Pepton; 0,1 % (w/v) Dextrose; 0,386 % (w/v) di-Kaliumhydrogenphosphat; 0,132 % (w/v) Kaliumdihydrogenphosphat

dYT-Medium

1 % (w/v) Hefeextrakt; 1,6 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) NaCl

dYT-Platten

1 % (w/v) Hefeextrakt; 1,6 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) NaCl ; 1,3 % (w/v) Bacto-Agar

LB-Medium

1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl

LB-Platten

Wie LB-Medium, zusätzlich zum Autoklavierungsansatz 1,3 % (w/v) Bactoagar

M9-Minimalmedium

0,7 % (w/v) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3 % (w/v) KH_2PO_4 ; 0,1 % (w/v) NH_4Cl
Nach dem Autoklavieren wurden pro Liter Medium noch folgende sterilfiltrierte Lösungen zugegeben: 25 ml 20 % (w/v) Glukose; 1 ml 100 mM CaCl_2 ; 1 ml 1M MgSO_4 ; 5 ml 0,1 mM FeCl_3 ; 1 ml Thiamin-Lösung (1mg/ml)

M9-Minimalplatten

Wie M9-Minimalmedium zusätzlich zum Autoklavierungsansatz 1,3 % Bactoagar

SOB-Medium

2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,05% (w/v) NaCl

SOC-Medium

2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt ; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl
Nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugeben auf: 10 mM MgCl_2 ; 10 mM MgSO_4 ; 20 mM Glukose

SOC-Platten

2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,3 % (w/v) Bacto-Agar
Nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugeben auf: 10 mM MgCl_2 ; 10 mM MgSO_4 ; 20 mM Glukose

Standard I-Nährbouillon (Merck)

1,5 % (w/v) Pepton; 0,3 % (w/v) Hefeextrakt; 0,6 % (w/v) NaCl; 0,1 % (w/v) Glucose

2.10 Puffer und Lösungen**Alkalische Phosphatase Reaktionspuffer**

100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH9,0

Ampicillin-Stammlösung

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

Anhydrotetracyclin-Stammlösung

2 mg/ml Anhydrotetracyclin in Dimethylformamid, immer unter Argon bewahren

APS-Stammlösung

10% APS (Ammoniumperoxodisulfat), frisch angesetzt

BCIP

50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidinsalz in 70 % Dimethylformamid

Chloramphenicol-Stammlösung

25 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol gelöst

CIAP-Puffer (10 x)

0,1 M Tris-HCl (pH 7,5); 0,1 M MgCl₂

DNaseI-Puffer

50 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl, pH 7,5

dNTP-Stammlösung

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

dNTP-Stammlösung für PCR

je 10 mM dNTP aus der dNTP-Stammlösung, mit H₂O verdünnt

E1 für Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed)

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

E2 für Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed)

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

E3 für Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed)

3,2 M Kaliumacetat-Essigsäure, pH 5,5

E4 für Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed)

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

E5 für Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed)

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

E6 für Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed)

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

Ethidiumbromid-Stammlösung (10 x)

10 mg/ml Ethidiumbromid

Extension-Buffer

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

Formamidfarbmarker

0,05 % (w/v) Bromenolblau; 10 mM EDTA in Formamid

HBS-Puffer

10 mM Hepes, 140 mM NaCl, pH 7,4

Hoechst Puffer (nicht reduzierend)

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

Hoechst Puffer (reduzierend)

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

IMAC Puffer I

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

IMAC Puffer II

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

IPTG Stammlösung

1 M IPTG in Wasser, sterilfiltriert

Kanamycin-Stammlösung

75 mg/ml Kanamycin in Wasser gelöst und sterilfiltriert

Kinase Puffer (10 x)

500 mM Tris-HCl (pH 7,6), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM EDTA

KGB-Puffer (10 x)

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

Laemmli Puffer (SDS-PAGE Puffer)

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

Mini I-Lösung

50 mM Glukose; 10 mM EDTA, pH 8,0; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0

Mini II-Lösung

0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS

Vor dem Gebrauch aus 0,4 M NaOH und 2% (w/v) SDS frisch mischen

Mini III-Lösung

7 M Ammoniumacetat

NBT Stammlösung

75 mg/ml NBT in 70 % Dimethylformamid

NT1, NT2 und NT3

Die Zusammensetzungen der Lösungen wurden vom Hersteller (Macherei und Nagel) nicht angegeben

PAG-Färbelösung

1000 ml Methanol, 15 g Comassie Brilliant Blue

PBS

140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2 mM KH₂PO₄

PBST (PBS-Tween)

140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2 mM KH₂PO₄, 0,005 % (v/v) Tween 20

Periplasmapräp Puffer 1

200 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 20 % (w/v) Saccharose, pH 9,0

Periplasmapräp Puffer 2

10 mM Tris-HCl, pH 9,0

Phenol/Chloroform

1 Vol Phenol/TE gesättigt; 1 Vol Chloroform

Poinceau S-Färbelösung

0,3 % (w/v) Poinceau S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure, 3 % (w/v) Sulfosalicylsäure

Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas)

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

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

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

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

Gelb: 33 mM Tris-Essigsäure, pH 7,9; 10 mM Mg-Acetat; 66 mM Kaliumacetat

Restriktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (NEB)

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

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

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

NEB4: 20 mM Tris-Acetat, pH 7,9; 10 mM Mg-Acetat; 50 mM Kaliumacetat; 1 mM DTT

RNaseA-Stammlösung

10 mg/ml RNase; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 15 mM NaCl; 20 min bei 100 °C kochen und dann langsam auf RT abkühlen lassen

Sammelgel Puffer

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

SSC (20 x)

3 M NaCl; 300 mM tri-Natriumcitrat

Sucrosefarbmarker

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

Sucrosegradienten-Puffer

100 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl; 18,5 % (w/v) Sucrose

T4-DNA-Ligationspuffer (10x)

400 mM Tris-HCl; pH 7,8; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 5mM ATP

TAE-Puffer (50x)

2 M Tris-Acetat; 50 mM EDTA, pH 8,0

Taq-Polymerase-Puffer (10x)

500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9,0; 15 mM MgCl₂; 1 % Triton X 100

TBE-Puffer (10x)

0,89 M Tris-Base; 0,89 M Borsäure; 25 mM EDTA

TE-Puffer

100 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA, pH 8,0

TES-Puffer (25x)

250 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2,5 mM EDTA; 2,5 M NaCl

Tetracyclin-Stammlösung

12,5 mg/ml Tetracyclin in Ethanol

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

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

Tris-Puffer

Tris(hydroxymethyl)aminomethan in Wasser auflösen und den pH-Wert mit Säure einstellen. Für Tris-HCl Salzsäure, für Tris-acetat Essigsäure.

Western Blot Transferpuffer

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

X-Gal-Lösung

2 % (w/v) 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid in Dimethylformamid

3. Methoden

3.1 *Mikrobiologische Methoden*

3.1.1 Stammhaltung und Vermehrung von *E. coli*

Für längerfristige Aufbewahrung der Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden je 2 ml autoklaviertes Glycerin mit 1 ml Bakterienkultur gemischt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alternativ zur Lagerung in Glycerin wurden die Bakterien als DMSO-Kulturen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (7 % v/v DMSO). Stämme und Klone, die sehr häufig benötigt wurden, wurden entweder auf M9-Minimal- oder auf entsprechende Selektivmedienplatten ausgestrichen und im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für einige Wochen gelagert. Die Anzucht dieser Stämme erfolgte in dYT-Medium in der Regel bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kulturen von einem Volumen von weniger als 4 ml wurden in Reagenzröhrchen auf einem Roller gerollt, größere Kulturen wurden in Kolben auf einem Schüttler bei 150 u/min geschüttelt.

3.1.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde in einem Kontron Photometer bei 600 nm gegen das unbeimpfte Medium bestimmt. Die Zellen wurden davor so verdünnt, dass die OD_{600} kleiner als 0,8 war. Die tatsächliche Zelldichte wurde dann aus dem gemessenen Wert errechnet.

3.1.3 Präparation von elektrokompenten *E. coli* Zellen

Zur Herstellung hochkompetenter Zellen z.B. für die Klonierung von Genbanken wurden 400 ml SOB-Medium mit 2 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 wachsen gelassen und dann für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Kultur in 50 ml Aliquots aufgeteilt (Falcon Röhrchen) und in einer Hettich ROTANTA/RPC Zentrifuge abzentrifugiert ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4000 U/min, 10 min). Das Medium wurde dann vollständig dekantiert und die Zellen wurden in je 50 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut auf Eis inkubiert. Nach 30 min auf Eis wurden die Bakterien wieder zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 20 ml H_2O resuspendiert und erneut 30 min auf Eis gelagert. Nach anschließender Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml H_2O resuspendiert. Nach einer erneuten 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in 6 Aliquots aufgeteilt, wieder abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurde jedes der 6 Aliquots in 200 μl H_2O resuspendiert. Jedes dieser 6 Aliquots wurde für eine Elektroporation verwendet.

Für einfache Klonierungen wurde die Vorbereitung von kompetenten Zellen deutlich vereinfacht, so wurden viel weniger Zellen für eine Transformation benutzt ($< 5\text{ ml}$ Kultur pro Transformation), auch wurde die dritte Inkubation auf Eis weggelassen und die Inkubationszeiten zwischen den einzelnen Waschschritten wurden deutlich verkürzt. Elektrokompente Zellen wurden zum Teil als DMSO Kulturen eingefroren und kurz vor dem Gebrauch aufgetaut.

3.1.4 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Zu den elektrokompenten Zellen wurden 5-400 ng DNA, gelöst in H₂O, pipettiert (1-20 μ l). Die DNA-Zellmischung wurde dann anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Kondensatorplattenabstand 2 mm) transferiert. Die Zellen wurden durch Anlegen eines Spannungspulses in einem BioRad Gene-Pulser (2500V, 25 μ F, 200T) transformiert. Anschließend wurde sofort 1 ml frisches Medium in die Küvette gegeben und die Zellsuspension wahlweise in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß oder ein Reagenzglas transferiert. Wenn hohe Transformationsausbeuten gewünscht wurden, wurden Reagenzgläser zur Kur verwendet und die Küvette noch zweimal mit 1 ml Medium nachgespült, so dass das Kurvolumen jeder Transformation 3 ml betrug. Die Zellen wurden 1h bei 37 °C inkubiert und dann plattiert. Die Transformationseffizienz wurde durch Verdünnungsplattierungen bestimmt. Bei der Generierung von Repertoires wurde das gesamte Kurvolumen auf Agarplatten ausplattiert. Am nächsten Tag wurden diese Platten dann mit Medium abgeschwämmt und Bakterien bis zur weiteren Verwendung als DMSO Kulturen gelagert.

3.1.5 Induktion von Bakterienkulturen

In dieser Arbeit wurden lediglich *lac*- und *tet* Promotoren induziert. Dazu wurde die jeweilige Bakterienkultur angeimpft und beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,8 mit dem jeweiligen Induktor induziert. Im Fall von *lac* Promotoren wurde eine Endkonzentration von 1 mM IPTG verwendet und *tet* Promotoren wurden mit 0,2 mg/l (w/v) Anhydrotetracyclin induziert. Die Induktionszeit betrug bei den einzelnen Experimenten zwischen 0,5 und 18 Stunden, sie ist im Ergebnisteil bei dem jeweiligen Experiment mit angegeben.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Fällung von DNA

3.2.1.1 Fällung von DNA mit Ethanol

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 7 M Ammoniumacetat und 3 Volumen 96% Ethanol versetzt. Anschließend wurde der Ansatz 10-60 min bei -20 °C inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde dann in einer Hettich-Tischzentrifuge (10-15 min, RT, 12000 U/min) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet entweder mit 75% (v/v) Ethanol gewaschen und rezentrifugiert oder direkt bei 37 °C getrocknet und in TE bzw. Wasser gelöst.

3.2.1.2 Fällung von DNA mit Isopropanol

Bei der Fällung mit Isopropanol wurde analog zur Fällung mit Ethanol vorgegangen mit dem Unterschied, dass 0,7 Volumen Isopropanol eingesetzt wurden. Bei der Verwendung von Isopropanol fallen weniger Salze aus, daher wurde diese Art der Fällung bevorzugt, wenn die DNA möglichst salzfrei sein sollte.

3.2.2 Extraktion von DNA mit Phenol, Phenol/Chloroform, Chloroform

Die Phenol/Chloroform-Extraktion diente zur Entfernung von Enzymen oder anderen Verunreinigungen aus DNA Lösungen. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Vol Phenol versetzt, gründlich gevortext und zur Beschleunigung der Phasentrennung für 3 min zentrifugiert (Hettich-Tischzentrifuge, 12000 u/min). Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1) hinzugegeben, gevortext und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol Chloroform versetzt. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde die DNA aus der wässrigen Phase durch eine Ethanolfällung ausgefällt.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA wurde in Agarosegelen unterschiedlicher Konzentrationen durchgeführt (0,8-2 %). Für kleinere Fragmente wurden höher konzentrierte, für größere Fragmente niedriger konzentrierte Gele verwendet. Normalerweise wurden 1 %ige Gele benutzt. Die Agarose wurde in TBE oder TAE-Puffer aufgekocht, anschließend in Gießschalen gegossen und der Kamm für die Ausformung der Taschen gesetzt. Für sehr kleine DNA Fragmente wurden Gele mit 1,5 % Agarose und zusätzlich 1 % HEC (Hydroxyethyl-Cellulose) verwendet. Die Hydroxyethyl-Cellulose wurde vor dem Aufkochen des Gels als Feststoff mit eingewogen.

3.2.4 Acrylamidgelelektrophorese von DNA-Fragmenten

In ganz bestimmten Fällen wurde DNA auch über Acrylamidgele aufgetrennt. Dies war in der Regel nur dann notwendig, wenn die zu analysierenden Fragmente kleiner als 40 bp waren. Eine solche Auftrennung war zum Teil nach DNase I Verdauen sinnvoll. Die DNA wurde dann auf ein 12,5 % Acrylamid Gel (Protogel, 1*TBE) aufgetragen. Im Gegensatz zur Elektrophorese von Proteinen wurde der Gelmatrix kein SDS zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 W (Geldimensionen 227 mm, 200 mm, 1,5 mm). Der Laufpuffer war in der Regel TBE. Nach der Elektrophorese konnte das Gel bei Bedarf mit Ethidiumbromid gefärbt und die Trennung unter UV-Licht analysiert werden.

3.2.5 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde der Nucleotrap-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Es wurde dabei nach der mitgelieferten Vorschrift vorgegangen. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist nicht bekannt. Im Prinzip wird dabei die Agarose durch Zugabe eines Chaotropen Agens aufgelöst, die DNA von Partikeln in der Nucleotrap Suspension gebunden, mehrfach gewaschen und am Schluß wieder von den Partikeln eluiert.

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht oder dunkel ausgeschnitten und das Gelstück in 300 μ l NT1 Puffer pro 100 mg Gel gelöst. Danach wurden 10 μ l Nucleotrap Suspension zugegeben und für 10 min bei 50 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Partikel, die nun die DNA gebunden hatten, abzentrifugiert und je zweimal mit 500 μ l NT2 und NT3 gewaschen (nach jedem Waschschrift wurden die

Partikel erneut abzentrifugiert). Die DNA wurde, nachdem die Partikel nach dem letzten Waschschrift getrocknet wurden (10 min RT), mit 60 μ l Wasser von den Partikeln abgelöst (10 min RT). Die Partikel der Nucleotrap Suspension wurden anschließend durch Zentrifugation aus der Lösung entfernt. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden in einer Hettich Tischzentrifuge (12000 U/min, 30 Sekunden) durchgeführt.

3.2.6 Reinigung von DNA aus Acrylamidgelen

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Acrylamidgelen war nur in Einzelfällen notwendig. Dazu wurde das Gelstück, das die gewünschten Fragmente enthielt, ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß mit TE Puffer transferiert. Die Elution aus dem Gelstück erfolgte durch Diffusion während einer Inkubation über Nacht bei 50 °C. Nach dieser Inkubation wurde der Überstand, der die Fragmente enthielt, abgenommen. Die DNA konnte anschließend weiter verarbeitet werden.

3.2.7 Auftrennung von DNA in Sucrosegradienten

3.2.7.1 Reinigung eines gespaltenen Vektors mit Gefriergradienten

Zur Herstellung von Sucrosegradienten wurden 12 ml Ultrazentrifugenröhrchen mit Sucrosegradienten-Puffer gefüllt und anschließend bei -20 °C eingefroren. Beim Auftauen bildet sich ein Konzentrationsgradient von ca. 10 % bis 30 % aus. Nun wurde die DNA-Lösung vorsichtig auf das Röhrchen geschichtet (die maximale Kapazität beträgt ca. 100 μ g DNA in einem Gesamtvolumen von nicht mehr als 200 μ l). Anschließend wurde aufgrund des Vakuums bei der Ultrazentrifugation noch Paraffin über die Gradientenröhrchen geschichtet. Daraufhin wurden die Gradienten zentrifugiert (Kontron Centricon T1055; Rotor TST 41.14; 28000 u/min; 18h, 15 °C).

Nach der Zentrifugation wurde der Boden des Röhrchens mit einer Kanüle (0,55 Δ 25mm) durchstoßen und die Sucroselösung in 25 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu Fraktionen von 0,5 ml fraktioniert. Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden auf einem Agarosegel analysiert. Die Fraktionen mit dem gewünschten Fragment wurden dann einer Ethanol-fällung unterzogen.

3.2.7.2 Reinigung eines gespaltenen Vektors mit gegossenen Gradienten

In einigen Fällen wurden die Gradienten mit einem Gradientenmischer hergestellt. Dazu wurde 1 ml hochprozentige Sucroselösung (40 % w/v) als Kissen in die Gradientenröhrchen vorgelegt und anschließend die zwei Sucroselösungen mit Hilfe eines Gradientenmischers darüber geschichtet. Die Gradienten gingen in der Regel über einen Konzentrationsbereich von 8 % bis 30 % (w/v) Sucrose. Die gegossenen Gradienten wurden direkt vor der Benutzung hergestellt. Die weitere Aufarbeitung der DNA war wie in 3.2.5.1 beschrieben.

3.2.8 Bestimmung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen

Die DNA-Konzentration wurde mit einem Kontron-Spektralphotometer (Uvicon 930) ermittelt. Doppelsträngige DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Mikroküvette (Hellma, QS 1,000) gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht dabei einer

Konzentration von 50 σ g/ml. Als Referenz wurde zusätzlich bei 280 nm gemessen. Die beiden Absorptionswerte sollten ungefähr ein Verhältnis von 2:1 haben, liegt die OD_{280} darüber, so ist mit Verunreinigungen durch Proteine zu rechnen. Bei einzelsträngiger DNA wurde analog vorgegangen, nur entspricht hierbei eine OD_{260} von 1,0 etwa 35 σ g/ml DNA.

3.2.9 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse

3.2.9.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Minipräparation von Plasmid-DNA wurden 1,5-2 ml Bakterienzellkultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert und die Bakterien in der Tischzentrifuge 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen wurden in 100 σ l Mini I-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden 200 σ l Mini II-Lösung hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach ca. 2 min waren die Zellen lysiert und es wurden 150 σ l Mini III-Lösung dazu pipettiert. Der Ansatz wurde nun zum Fällern der Proteine und der chromosomalen DNA für 5 min auf Eis inkubiert und danach direkt für 10 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen und mit Ethanol gefällt.

Alternativ wurden teilweise verschiedenste Plasmid-Präparationskits benutzt. Es wurde dabei immer nach der mitgelieferten Vorschrift vorgegangen. In der Regel sind alle benötigten Lösungen in diesen Kits enthalten. Alle benutzten Kits verwenden das Prinzip der alkalischen Lyse, liefern aber noch eine Reinigungsmatrix für Plasmid DNA, deren Zusammensetzung nicht veröffentlicht wird, mit.

3.2.9.2 Midipräparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde in der Regel der JetStar-Kit (Genomed) verwendet. 50 ml Bakterienkultur wurden in der Hettich-Kühlzentrifuge (Hettich Rotanta) abzentrifugiert (10 min, 4000 U/min, 4 °C). Anschließend wurde das Zellpellet in 4 ml E1-Puffer resuspendiert, die Bakterien wurden durch Zugabe von 4 ml E2-Puffer lysiert. Die Reaktion wurde nach 5 min durch Zugabe von 4 ml E3-Puffer gestoppt und der Ansatz erneut in der Hettich-Zentrifuge für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde dann auf die mitgelieferte, zuvor mit 10 ml E4-Puffer äquilibrierte Säule (Säulenmaterial ist nicht veröffentlicht) gegeben und anschließend die gebundene DNA zweimal mit je 10 ml E5-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von 5 ml E6-Puffer wurde die DNA eluiert. Diese wurde danach durch Hinzufügen von 0,7 Vol Isopropanol und anschließender Zentrifugation (Hettich Mikro Rapid/K 12000 U/min, 30 min, 4°C) gefällt. Nach der Fällung wurde die DNA in Wasser aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

3.2.10 Spaltung von DNA mittels Restriktions-Endonukleasen

Für die Spaltung von DNA wurden Enzyme der Firmen MBI-Fermentas und NEB-Biolabs verwendet. Die Reaktionen wurden in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer und bei der angegebenen Temperatur durchgeführt. Im Normalfall wurde eine Einheit Enzym pro Mikrogramm DNA eingesetzt und eine Stunde bei der

angegebenen Temperatur inkubiert. Unter bestimmten Voraussetzungen wurde teilweise länger (bis zu 5 Stunden) und mit mehr Enzym inkubiert, insbesondere wenn die DNA in einer für das betreffende Enzym ungünstigen Eigenschaft aufwies (Lage der Erkennungssequenz etc.). Allerdings wurde darauf geachtet, dass der Anteil der dazugegebenen Enzymlösung nicht größer als 5 % (v/v) des gesamten Spaltansatzes wurde, da die hohe Glycerinkonzentration im Lagerungspuffer der Nukleasen die Reaktion hemmen kann. Bei Doppelverdauen wurde teilweise, wenn beide Enzyme nicht im gleichen Puffer des Herstellers spalten, KGB-Puffer verwendet. In diesem Puffer spalten viele Enzyme mit der gleichen oder einer höheren Aktivität als in den mitgelieferten Puffersystemen (Hanish und McClelland, 1988; McClelland *et al.*, 1988). Nach dem Verdau wurde die Spaltung durch Agarosegelelektrophorese überprüft und die Restriktionsenzyme wurden inaktiviert. Dies konnte durch 10-20 minütige Inkubation bei hoher Temperatur (falls die Nukleasen thermolabil waren und die notwendige Inaktivierungstemperatur und Zeit vom Hersteller angegeben wurde) oder durch Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung geschehen. Wenn die DNA anschließend in einer Ligation eingesetzt werden sollte, war die Inaktivierung unabdingbar. Sollte aber nur analytisch gespalten werden, so wurde in der Regel auf eine Inaktivierung der Enzyme verzichtet.

3.2.11 Hydrodynamisches Spalten von DNA

In bestimmten Fällen wurden größere DNA-Abschnitte in Zufallsfragmente zwischen 2 und 3 kb gespalten. Dies geschah durch hydrodynamisches Scheren der DNA (Oefner *et al.*, 1996). Dazu wurden 5-100 µg der DNA in 300 µl H₂O aufgenommen. Das Scheren der DNA wurde mit einer Beckman HPLC-Pumpe erreicht. Diese wurde so modifiziert, dass man sie auf Kreisfluß stellen konnte. In diesem Kreis war ein dünner Schlauch (Upchurch, Innendurchmesser 0,0025 Inch) integriert. Beim mehrfachen Passieren dieses Schlauches im Kreisfluß wurde die DNA hydrodynamisch gespalten. In der Regel wurde der Kreisfluß für 10 min bei Flussraten von 2-10 ml/min und 0,5-1 kpsi aufrecht erhalten. Anschließend wurde die gescherte DNA einer Ethanol-fällung unterzogen.

3.2.12 Partieller Verdau von DNA mit DNaseI

Zur Klonierung von DNA-Fragmentbibliotheken, die aus zufällig erzeugten Fragmenten bestehen sollten (vergl. insbesondere Abschnitt 4.1), wurde häufig ein DNaseI Verdau der zu klonierenden DNA angewandt. Durch den Verdau mit DNaseI wurde die DNA in Zufallsfragmente gespalten. Wenn die so erzeugten Fragmente kloniert wurden, entstand eine Bibliothek, die in ihrer Summe für alle Peptide und alle Frameshiftmutanten der Ausgangs-DNA kodierte. Der Verdau wurde in der Regel in 4 parallelen Ansätzen durchgeführt. Dabei wurde in allen Ansätzen die gleiche DNA Menge eingesetzt. Die Enzymmenge variierte in den einzelnen Ansätzen und betrug 18 mU, 27 mU, 36 mU und 180 mU. In der Regel wurden pro Ansatz 5-10 Mikrogramm DNA eingesetzt. Der Verdau wurde in DNaseI Puffer für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde nach dieser Zeit durch Zugabe von EDTA abgestoppt (Endkonzentration 50 mM). Anschließend wurden alle

Spaltansätze auf einem Acrylamidgel analysiert und gegebenenfalls die Fragmente der gewünschten Länge ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert.

3.2.13 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden

Zum Auffüllen von überhängenden DNA-Enden wurde T4-DNA Polymerase in dem vom Hersteller gelieferten Puffer verwendet. Die Reaktion wurde in Gegenwart von 0,5 pmol/µl NTP's bei 11 °C für 20 min durchgeführt. Die T4-DNA Polymerase wurde anschließend durch Phenol/Chloroform Extraktion oder durch Reinigung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese aus der Lösung entfernt.

3.2.14 Enzymatische Dephosphorylierung von DNA-Enden

Durch die Dephosphorylierung von DNA-Enden sollte in einer Ligationsreaktion die Rezyklisierung des Vektors verhindert werden. Die gespaltene Vektor DNA wurde in 1x CIAP-Puffer aufgenommen, anschließend wurden 1 Einheit Alkalische-Phosphatase (aus Kälberdarm, CIAP) pro Mikrogramm DNA zugegeben. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch zweimalige Phenol/Chloroform Extraktion aus der Lösung entfernt.

3.2.15 Enzymatische Phosphorylierung von 5'-DNA Enden

Die Phosphorylierung von 5'-DNA Enden wurde dann durchgeführt, wenn die betreffende DNA, in der Regel ein Oligonukleotid, kein Phosphat am 5'-Ende besaß, dieses aber für die weitere Verwendung notwendig war. Die Kinasierung wurde mit PNK (MBI) im mitgelieferten Kinasepuffer durchgeführt. In die Kinasierung wurden in der Regel 1000-2000 pmol Oligonukleotid und 1 Einheit PNK eingesetzt. Die Reaktion fand in Gegenwart von 2,5 mM ATP für 30 min bei 37 °C statt. Anschließend wurde die phosphorylierte DNA einer Phenol/Chloroform Extraktion unterzogen und mit Ethanol gefällt.

3.2.16 Ligation von DNA

Für die Ligation von DNA wurde T4-DNA Ligase verwendet. Die Ligation fand in 1x Ligasepuffer statt. Das Reaktionsvolumen richtete sich nach der Art der Ligation. So wurde bei Vektorreligationen ein Volumen von 70-100 µl gewählt, hingegen bei Ligationen mit einem *Insert* ein kleineres Volumen (15- 40 µl). Der Ansatz wurde entweder 1h bei 37 °C oder über Nacht bei 16 °C in einem Wasserbad inkubiert. Wenn es sich um eine *blunt-end* Ligation handelte, wurde prinzipiell länger inkubiert als bei *sticky-ends*. Die Enzymmenge richtete sich nach der Menge der DNA bzw. nach der Art der Ligation. Im allgemeinen wurden pro Ligation 1-1,5 Einheiten Ligase pro 100 ng Vektor DNA verwendet. Nach der Ligation wurde die T4-Ligase entweder durch Hitzebehandlung (15 minütige Inkubation bei 65 °C) oder durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion inaktiviert. Die DNA mußte vor der Transformation mit Ethanol gefällt werden.

3.2.17 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Teilweise wurden komplementäre Oligonukleotide zu einer doppelsträngigen DNA hybridisiert. Dazu wurden die Oligonukleotide in äquimolaren Mengen in 1ΔSSC gemischt. Anschließend wurde die Lösung 5 min auf 95 °C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.2.18 Amplifikation von DNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation wurden verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. In der Regel wurde *Taq*-Polymerase benutzt. Die Menge der Matrizen-DNA richtete sich nach dem jeweiligen Experiment, in der Regel wurden 5-100 ng als Matrize eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug immer 50 µl. Die Reaktion fand im jeweiligen Polymerasepuffer in Gegenwart von 0,2 pmol/µl jedes der beiden zur Amplifikation benötigten Oligonukleotide statt. Die Anfangskonzentration jedes der eingesetzten dNTPs betrug 0,2 mM. In der Regel wurden 25 Zyklen von Denaturierung der Matrizen DNA, Anhybridisierung der Oligonukleotide und Elongation durchgeführt. In bestimmten Fällen wurden aber auch mehr bzw. weniger Zyklen durchgeführt. Die Matrizen DNA wurde in den meisten Fällen vor dem 1. Zyklus durch 2 minütiges Erhitzen auf 98 °C denaturiert. Erst nach dieser Denaturierung wurden die Oligonukleotide sowie die Polymerase und die dNTPs zugesetzt.

Die Elongationstemperatur hing von der eingesetzten Polymerase ab, betrug aber in der Regel 72 °C. Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des Produkts, in der Regel wurde für eine Minute pro 1000 bp Produktlänge elongiert. Die Denaturierung der Matrizen DNA während der Zyklen wurde durch 30 sekundige Erhitzung auf 94 °C erreicht. Die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_A = \frac{(T_{M1} + 2 T_{M2})}{2} + 4,3 \text{ [}^\circ\text{C]}$$

Dabei ist T_A die Anhybridisierungstemperatur für die PCR-Reaktion und $T_{M_{1/2}}$ die Schmelztemperatur des jeweiligen Oligonukleotids. Die Schmelztemperatur wurde durch eine empirische Formel berechnet, die sowohl den G/C Gehalt des jeweiligen Oligonukleotids als auch dessen Länge in bp berücksichtigt:

$$T_{Mx} = 69,3 + 0,41\Delta(\%GC) - 650/n \text{ [}^\circ\text{C]}$$

Die Reaktion wurde in der Regel in einem Minicycler (MJ Research) oder in einem Primus 96 Thermocycler (MWG Biotech) durchgeführt. Nach der Reaktion wurde der Erfolg durch Agarosegelelektrophorese der amplifizierten DNA überprüft. Sollte die DNA anschließend enzymatisch manipuliert werden, wurde die Polymerase durch Phenol/Chloroform Extraktion und anschließender Ethanol-fällung, oder durch den NucleotrapCR Kit von Macherey und Nagel, aus der Lösung entfernt.

3.2.19 Kolonie-PCR-Durchmusterung

Um Klonierungen zu überprüfen, wurde teilweise eine Sonderform der PCR, die Kolonie-PCR, angewandt. Dabei wurde direkt aus den Bakterien das betreffende Produkt amplifiziert. Dies hat den Vorteil, dass nach Klonierungen mit großem

Hintergrund von religiertem Vektor viele Minipräparationen von Plasmid-DNA und anschließenden Restriktionsverdauen unnötig sind.

Kolonie-PCR wurde ausschließlich mit *Taq*-Polymerase durchgeführt. Bei der Prozedur wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte gepickt und separat ausgestrichen. Die an dem Zahnstocher verbleibenden Bakterien wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß durch Eintauchen in vorgelegten *Taq*-Puffer transferiert. Die Zusammensetzung der PCR und die Bedingungen waren wie im Abschnitt 3.2.18 beschrieben. Nachdem ein richtiger Klon durch Agarosegelelektrophorese der PCR identifiziert wurde, konnte dieser von der Agarplatte (s.o.) angeimpft und weiter bearbeitet werden.

3.2.20 Aufreinigung von PCR-Produkten mittels des *NucleotrapCR Kits*

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde teilweise der NucleotrapCR Kit verwendet. Die Reinigung erfolgte dabei analog zur Reinigung von DNA aus Agarosegelen (vgl. Abschnitt 3.2.5). Allerdings wurde die PCR-Lösung zuvor mit einem Volumen Chloroform extrahiert und dann wurden 10 µl NucleotrapCR Suspension zu dem PCR-Ansatz (mit H₂O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt) gegeben. Die NucleotrapCR Suspension bindet nur DNA, die länger als 150 bp ist, so dass Primer nicht binden und aus der Lösung entfernt werden. Anschließend wurde wie bei der Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit dem Nucleotrap Kit verfahren.

3.2.21 Sequenzierung von DNA

Es wurde in der Regel doppelsträngige Plasmid-DNA unter Verwendung von Gelen unterschiedlicher Zusammensetzungen und Längen sequenziert (Tab. 3.1).

Gel	25 cm	41 cm	66 cm LongRanger	66 cm Sequagel
Geldicke	0,25 mm	0,25 mm	0,25 mm	0,25 mm
LongRanger-Lösung	-	-	4,3 ml	-
Sequagel XR	16 ml	32 ml	-	32 ml
Sequagel complete	4 ml	8 ml	-	8 ml
Protogel	3 ml	-	-	-
Harnstoff	-	-	21 g	8 g
5xTBE	-	-	10 ml	4 ml
Wasser	-	-	27 ml	13 ml
DMSO	-	-	500 µl	-
TEMED	-	-	50 µl	-
10% APS	300 µl	300 µl	350 µl	350 µl
Spannung $\Psi\beta$	900	1500	2000	1800
Strom $\Psi\alpha\beta$	37	37	37	37
Leistung $\Psi\gamma\beta$	40	50	50	50
Temperatur $\Psi\delta\beta$	50	50	45	45
Frames	15	25	35	35

Tabelle 3.1: Angegeben sind die Gelzusammensetzungen sowie die Länge der Gele und die Laufbedingungen für Sequenzierungen.

Die Länge der benutzten Gele hing von der Leseweite ab. 25 cm Gele wurden für Sequenzierungen bis 300 bp benutzt. Mit 41 cm Gelen konnten bis zu 800 bp sequenziert werden. Durch Verwendung von 66 cm Gelen konnten bis zu 1100 bp gelesen werden.

Für die Sequenzreaktion wurde der *Thermo-Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* (Amersham Life Science) verwendet. Bei diesem Kit sind die für den Abbruch der Elongationsreaktion notwendigen Didesoxy-Nukleotide mit den dNTPs und der thermostabilen Polymerase in je einer Stammlösung (A, C, G und T) vorgemischt. Zur Sequenzierung wurden je 2 µl dieser Terminationsmische in ein separates PCR-Gefäß vorgelegt. Anschließend wurde dazu 6 µl eines Matrizen DNA/Primer Gemisches gegeben. Pro Reaktion wurde 1 pmol 5'-IRD 800 (Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff) markiertes Oligonukleotid und 50 ng Matrizen DNA pro Länge in kb eingesetzt. Die PCR-Bedingungen lauteten:

1. 95 °C 2 min
2. 95 °C 30 s
3. T_M 30 s
4. 70 °C 30 s
5. 19 mal nach Schritt 2
6. 95 °C 30 s
7. 70 °C 30 s
8. 9 mal nach Schritt 6

Die fertige Sequenzreaktion konnte bis zu zwei Wochen bei -20 °C gelagert werden. Sie wurde vor dem Auftragen auf das Sequenzgel mit 6 µl Licor-Farbmarker versetzt und 2 min bei 98 °C erhitzt. Die so behandelten Sequenzreaktionen wurden auf ein Sequenzgel aufgetragen (s.o.) und der Sequenzlauf bei den entsprechenden Bedingungen gestartet (s.o.). Die Auswertung erfolgte mit dem BaseImagIR Software Paket. Zu Beginn der Arbeit wurde einzelsträngige DNA in die Sequenzreaktion als Matrize eingesetzt. Die Einzelstrang DNA wurde durch Infektion der betreffenden Kultur (das zu sequenzierende Plasmid muss hierbei einen f1 Replikationsursprung besitzen) mit M13K07 infiziert (30 min RT) und anschließend über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler wachsen gelassen. Zusätzlich zum Selektivantibiotika des Vektors wurde dem Medium Kan⁷⁵ zugegeben (die Resistenz wird durch den Phagen vermittelt). Die einzelsträngige Phasmid-DNA konnte anschließend durch Phenol/Chloroformextraktion aus den Phagenpartikeln gewonnen werden.

3.3 *Proteinchemische Methoden*

3.3.1 Präparation von periplasmatischen Proteinen aus *E. coli*

Diese Methode beruht auf einem osmotischen Schock, der zum Zerreißen der äußeren Bakterienmembran führt (Neu und Heppel, 1965). Die Cytoplasmamembran bleibt dagegen weitestgehend intakt, so dass sich nach Zentrifugation lediglich periplasmatische Proteine im Überstand befinden.

Die induzierte Bakterienkultur wurde durch Zentrifugation geerntet und in 100 ml kaltem Periplasmapräp Puffer 1 resuspendiert (für eine 1 l Kultur, bei kleineren Kulturvolumina entsprechend weniger). Die resuspendierten Zellen wurden anschließend für 30 min auf Eis geschüttelt. Daraufhin wurden sie erneut durch Zentrifugation geerntet und in 100 ml kaltem Periplasmapräp Puffer 2 resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden nun für 30 min auf Eis geschüttelt. Nach dieser Inkubation wurde die Lösung zentrifugiert und der Überstand, der die periplasmatischen Proteine enthielt, wurde abgenommen. Er konnte nun für die Analyse auf einem SDS-Page oder für weitere Reinigung der in ihm enthaltenen Proteine verwendet werden.

3.3.2 Zellaufschluß von *E. coli* Bakterien

Der Zellaufschluß der Bakterien (Periplasma und Cytoplasma) wurde auf verschiedene Art und Weise erzielt. Eine Methode war der Aufschluß mit Ultraschall. Dazu wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet und anschließend in dem Puffer, in dem die Proteine weiter bearbeitet werden sollten, resuspendiert (25 ml bei einer 1 l Kultur). Anschließend wurde durch 5 malige Ausübung eines 1 minütigen Ultraschallpulses ein Aufschluß der Zellen erreicht (Brenson Sonifier 250, *output control* 6, *duty cycle* 60). Die Zelltrümmer konnten durch Zentrifugation pelletiert werden und der Überstand mit den Proteinen konnte weiter verarbeitet werden. Der Aufschluß mit Ultraschall ging schneller von statten, wenn die Bakterien vor der Schallbehandlung bei -80 ° C eingefroren waren.

Der Aufschluß mit Ultraschall ist sehr einfach, beinhaltet aber auch einige Probleme. So ist er zum einen nicht so effizient wie die im folgenden beschriebenen Methoden, zum anderen wird die Lösung durch die Schallwirkung lokal stark erhitzt, was zu einer teilweisen Denaturierung der Proteine führen kann. Aus diesem Grund wurde der Aufschluß häufig durch *french-pressing* erzielt. Dazu wurden die Bakterien wie bei dem Aufschluß durch Ultraschall pelletiert und in dem gewünschten Puffer resuspendiert (25 ml für 1 l Kulturvolumen einer über Nacht Kultur). Anschließend wurden die Zellen mittels 1-3 Passagen durch eine SLM Aminco *French Press* Anlage (1000 psi) aufgeschlossen. Die so erhaltene Suspension wurde zentrifugiert und die Proteine, die sich dann im Überstand befanden, konnten weiter verarbeitet werden. Alternativ zum Aufschluß durch *french-pressing* wurden Bakterienzellen teilweise in einem Zelldisruptor (Constant Systems Ltd., 0,18 mm Düse, 1,5 kbar) aufgeschlossen. Die weitere Bearbeitung war dann analog zu den beiden anderen Aufschlußverfahren.

3.3.3 Dialyse von Proteinen

Die Dialyse von Proteinen wurde dazu benutzt, den Puffer, in dem das Protein gelöst war, auszutauschen. Dazu wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch gefüllt und in den vorgekühlten Puffer (mindestens das 500 fache Volumen der Proteinlösung) gehängt. Die Dialyse wurde für mindestens 20 Stunden im Kühlraum bei 8 °C unter Rühren des Dialysepuffers durchgeführt. Während dieser Zeit wurde der Dialysepuffer mindestens einmal ausgetauscht.

3.3.4 Reinigung von Proteinen mittels immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Mit dieser Methode konnten Proteine, die terminal ein Oligo-Histidinhängsel besaßen, aufgereinigt werden. Dazu wurden Chromatographiesäulen mit einem Volumen von 0,5-5 ml verwendet. Die Chelating-Sepharose wurde mit 20 ml Wasser gewaschen und anschließend durch Auftrag von 10 ml 100 mM NiCl mit Nickel beladen. Anschließend wurde die Säule noch zweimal mit je 15 ml H₂O gewaschen. Dadurch wurden sämtliche nicht gebundenen Ni-Ionen von der Säule entfernt. Nach dem Waschschrift wurde die Säule mit 20 ml Imac I Puffer äquillibriert. Auf die so vorbereitete Säule wurde der Zellaufschluß (s. 3.2.1 bzw. 3.2.2) aufgetragen. Alle Durchflüsse wurden separat gesammelt und für spätere Analysen aufgehoben. Nach dem Auftrag wurde die Säule mit 20 ml Imac I gewaschen. Daraufhin wurden die Gebundenen Proteine mit ansteigenden Imidazolkonzentrationen (in der Regel jeweils 10 ml 20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM, 200 mM und 500 mM Imidazol in Imac Puffer I) von der Säule eluiert. Die ein Oligo-Histidinhängsel tragenden Proteine eluierten meistens bei Imidazolkonzentrationen zwischen 40 mM und 200 mM Imidazol. Die Fraktionen wurden auf Eis gelagert. Nach der Reinigung erfolgte eine Analyse durch SDS-PAGE. Die Säule wurde im Bedarfsfall mit 0,5 M EDTA regeneriert.

3.3.5 Reinigung von Proteinen mittels Ionen Austauschchromatographie

In dieser Arbeit wurde lediglich die Anionenaustauschchromatographie verwendet. Dabei kamen zwei Systeme zum Einsatz. Zum einen wurde eine Pharmacia FPLC Anlage bestehend aus dem *Liquid Chromatographie Controller LCC-500 Plus*, zwei Laufpuffer Pumpen *Pump P-500*, einer Peristaltikpumpe *Peristaltic Pump P-1*, einem Photometer *Single Path Monitor UV-1*, einem Fraktionssammler *Fraction Collector frac-100* und einem analogen Schreiber, benutzt. Weiterhin wurde auch eine Biocat Anlage (BioVison Workstation) benutzt. Bei Verwendung der Pharmacia Anlage wurde das zu reinigende Protein gegen den Reinigungspuffer dialysiert (für alle Proteine unterschiedlich, ist im Ergebnisteil mit angegeben). Der Laufpuffer A entsprach dem Reinigungspuffer und der Laufpuffer B (Elutionspuffer) entsprach dem Puffer A mit 1 M NaCl.

Die Säulenmatrix war bei Benutzung der FPLC-Anlage immer ein MonoQ Material (Pharmacia MonoQ 8513062), das vor Auftrag des Proteins mit dem Laufpuffer A äquillibriert wurde. Anschließend wurde die Proteinlösung auf die Säule gegeben und die Proteine wurden in einem ansteigenden Salzgradienten (steigender Anteil von Laufpuffer B) fraktioniert eluiert. Die Fraktionen wurden einzeln gesammelt und der Chromatographievorgang über Aufzeichnung der OD₂₈₀ auf dem Schreiber festgehalten. Es wurden unterschiedliche Salzgradienten (Anteil Puffer B gegen die Zeit) benutzt. Sie sind im Ergebnisteil mit angegeben. Nach der Chromatographie wurden die Fraktionen auf einem SDS-Gel analysiert.

An der BioCat Workstation wurden sowohl HQ-Säulen (Poros) als auch die FPLC-MonoQ-Säule verwendet. Da das Gerät eine Mischkammer besitzt, wurde anstelle von zwei Puffern der Laufpuffer aus H₂O und einer Pufferstammlösung gemischt. Der Salzgradient wurde durch Zumischung einer 3 M NaCl Lösung gebildet. Alle Schritte

sind bei dieser Anlage frei programmierbar. Die Programme der jeweiligen Reinigung sind im Ergebnisteil mit angegeben.

Die Proteinlösung wurde über die Säule gepumpt und anschließend die gebundenen Proteine in einem ansteigenden Salzgradienten fraktioniert eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mit dem integrierten Fraktionssammler (*integrated autosampler*) gesammelt. Dabei wurde der pH-Wert, die Leitfähigkeit, die OD₂₆₀ und OD₂₈₀ kurz nach der Säule automatisch protokolliert. Nach der Chromatographie wurden Aliquots der Fraktionen einzeln auf einem SDS-Gel analysiert und die Fraktion, die das gewünschte Protein enthielt, konnte weiter bearbeitet werden.

3.3.6 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid Gelen (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Analysen von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamid Gele verwendet. In der Regel wurden 12,5 % Gele verwendet. Es wurden 10 Gele gleichzeitig in einem Gießstand hergestellt. Die Gelmatrix wurde zwischen eine Glas- und eine Aluminiumoxidplatte gegossen. Zuerst wurde das Trenngel hergestellt. Die Trenngellösung wurde bis zu 2/3 in den Gießstand gefüllt und jedes Gel mit Isopropanol überschichtet. Sobald das Gel vollständig polymerisiert war, wurde darauf das Sammelgel gegossen und die Kämme wurden eingesetzt. Die Gele konnten im Kühlschrank ca. 20 Tage gelagert werden.

	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
Acrylamid (Protogel)	27,6	4,48
Trenngelpuffer	14,4	-
Sammelgelpuffer	-	2,8
SDS 10 % in H ₂ O	1,44	0,56
APS 10 % in H ₂ O	0,24	0,1
TEMED	0,04	0,03
H ₂ O	27,2	20,4

Tab. 3.2: Benötigte Lösungen für die 12,5 % SDS-Gele, angegeben sind Mengen für 10 Gele.

Die Proben wurden entweder in reduzierendem oder nicht reduzierendem Hoechstpuffer aufgenommen und für 2-5 min bei 95 °C gekocht. Anschließend wurden sie auf ein Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 6 W durchgeführt. Als Laufpuffer diente Laemmlipuffer. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 min mit einem 1:1 Gemisch aus PAG-Färbelösung und 20 % Essigsäure angefärbt. Die unspezifisch in die Gelmatrix eingedrungene Farbe wurde durch Kochen des Gels in Wasser wieder entfernt.

3.3.7 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (*Western Blot*) und immunochemischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen wurde nach dem *semi-dry* Verfahren durchgeführt. Auf mit *Western Blot* Transferpuffer getränktes Filterpapier (Whatmann MM) wurde die Nitrozellulosemembran gelegt. Direkt auf die Membran wurde das ungefärbte Proteingel gelegt und darauf wieder getränktes Filterpapier. Der Transfer erfolgte elektrophoretisch zwischen zwei Graphitelektroden

(Novablot) bei 10 V für eine Stunde. Der Transfer der Proteine wurde durch 2 minütiges Anfärben der Nitrozellulosemembran mit Ponceau-S Lösung überprüft. Die Farbe wurde anschließend mit Wasser von der Membran gespült.

Für den immunochemischen Nachweis der Proteine wurde die Membran 1 h mit 2 % BSA (w/v in PBS) inkubiert. Anschließend wurde sie mit PBS gewaschen und mit 10 ml des gegen das betreffende Protein gerichteten Antikörpers (1:10000 in PBS verdünnt) unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde sie 10 min mit PBST und 2 mal mit PBS (je 15 ml) gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für 1 h mit 10 ml eines zweiten Antikörpers (Alkalische Phosphatase Konjugat, 1:10000 in PBS verdünnt), der gegen den ersten gerichtet war, inkubiert und anschließend erneut gewaschen (s.o.). Die Entwicklung erfolgte in 20 ml AP-Puffer (Alkalische Phosphatase Reaktions-Puffer), dem 12,5 µl NBT und 75 µl BCIP zugegeben waren. Die Alkalische Phosphatase Reaktion wurde durch Waschen mit Wasser abgestoppt.

3.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen

Proteinkonzentrationen wurden ausschließlich durch photometrische Messungen bestimmt. Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin sowie Disulfidbrücken absorbieren UV-Licht im Wellenbereich zwischen 250 und 300 nm. Der molare Extinktionskoeffizient (κ_{280}) eines definierten Proteins kann anhand folgender Formel berechnet werden (Pace *et al.*, 1995):

$$\kappa_{280}^{M^{41} cm^{41}} = \left(\frac{1}{5500} \Delta_{Trp} + \frac{2}{1490} \Delta_{Tyr} + \frac{2}{125} \Delta_{Disulfid} \right)$$

Dabei ist Δ_{Trp} die Anzahl der Tryptophane, Δ_{Tyr} die Anzahl der Tyrosine und $\Delta_{Disulfid}$ die Anzahl der Disulfidbrücken in dem betrachteten Protein. Unter Verwendung des Lambert Beerschen Gesetzes konnte nach Messung der Absorption bei 280 nm gegen den proteinfreien Puffer die Konzentration des gereinigten Proteins berechnet werden:

$$A = \kappa_{280} \Delta c \Delta d$$

Wobei A die gemessene Absorption bei 280 nm, c die Konzentration des Proteins und d die Schichtdicke der Küvette ist.

3.3.9 Einkonzentrierung und Lagerung von gereinigten Proteinen

Die Reinigungsfractionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden gegen den Lagerungspuffer (im Normalfall PBS) dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Konzentration photometrisch bestimmt. Das dialysierte Protein wurde gegebenenfalls einkonzentriert. Zur Einkonzentrierung wurden Centriprap bzw. Centricon YM 10 (Amicon Bioseparations) Röhrchen nach Anleitung des Herstellers verwendet. Nach der Einkonzentrierung des gereinigten Proteins wurde die Konzentration erneut bestimmt. Anschließend wurde das Protein in flüssigen Stickstoff getropft und die schockgefrorenen Kügelchen bei -80 °C gelagert. Das Eintropfen in flüssigen Stickstoff hat den Vorteil, dass das Protein in kleinen Aliquots (Tropfengröße) eingefroren wird

und auch in kleinen Aliquots, ohne die gesamte Präparation auftauen zu müssen, wieder entnommen werden kann.

3.4 *Methoden zur evolutiven Anreicherung von Bakterien, die Peptide zu einer Funktionsabfrage auf ihrer Oberfläche präsentieren*

3.4.1 Induktion der Synthese von Intimin Fusionsproteinen

Die betreffenden Bakterien wurden in der Regel in einem 50 ml Kolben in Selektivmedium angeimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,2-0,5 bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert (120-150 u/min). Die in dieser Arbeit verwendeten Oberflächenpräsentationsvektoren enthielten das Gen für den Membrananker (Intimin) immer unter Kontrolle eines *tetA* Promotor/Operators. Nach Erreichen der oben genannten OD_{600} wurde die Synthese durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (0,2 mg/l Endkonzentration) induziert. Die Induktion erfolgte für 1 Stunde auf dem Schüttler (37 °C, 120-150 u/min). Anschließend wurden die Bakterien auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert, längstens jedoch über Nacht im Kühlraum.

3.4.2 Fluoreszenzmarkierung von *E. coli* Zellen

Die Fluoreszenzmarkierung von induzierten *E. coli* Zellen diente sowohl zur Analyse einzelner Klone oder heterogener Kulturen mit dem Fluoreszenzmikroskop und dem Durchflußcytometer, als auch zur Anreicherung durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS). Die Markierung erfolgte je nach dem Zweck des Experiments. Allen Markierungen war gemein, dass die Bindung eines Proteins an das oberflächenexponierte Peptid durch einen Fluoreszenzfarbstoff, der durch Antikörper vermittelt wurde, nachgewiesen wurde. Dieser Fluoreszenzfarbstoff war in den allermeisten Fällen Streptavidin-R-Phycoerythrin. Die Bindung an die Bakterienzelle wurde durch einen biotinylierten Antikörper vermittelt. R-Phycoerythrin gehört zu den Phycobilliproteinen. Diese Proteine aus Cyanobakterien sind dort als Antennenpigmente an der Photosynthese beteiligt. Die relative Molekularmasse beträgt 240000 und das Emissionsmaximum ist bei 578 nm. Die Absorptionsmaxima liegen bei 488 nm und 546 nm und 565 nm. Die maximale relative Quantenausbeute beträgt bis zu 0,82 (Oi *et al.*, 1982).

In der Regel wurden 200 µl induzierte (vergl. 3.4.1) Bakterienzellkultur markiert (Abweichungen von der Zellmenge sind im Ergebnisteil separat angegeben). Die Bakterien wurden abzentrifugiert (Tischzentrifuge 12000 u/min, 30 s) und das Medium abgenommen. Anschließend wurden sie in 10 µl des ersten Antikörpers (in der Regel 100 µg/ml in PBS) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen mit 300 µl PBS aus der Lösung entfernt und die Zellen erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 10 µl eines biotinylierten Antikörpers (in der Regel 100 µg/ml in PBS), der gegen den vorhergehenden gerichtet war, resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper durch waschen (s.o.) entfernt. Anschließend wurden die Bakterien in 10 µl Streptavidin-R-

Phycoerythrin (100 µg/ml) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde nicht an die Bakterien gebundenes Streptavidin-R-Phycoerythrin durch waschen (s.o.) entfernt und das Bakterienpellet wurde in PBS resuspendiert.

Bei allen Experimenten wurden verschiedene Antikörper zur Vermittlung der Fluoreszenz benutzt, sie sind im Ergebnisteil bei der Beschreibung der Experimente mit angegeben. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden in der Regel umgehend für die Analysen oder Anreicherungen verwendet. In Ausnahmefällen konnten sie aber auch auf Eis für eine kurze Zeit, bevorzugter Weise im Dunkeln, gelagert werden.

3.4.3 Markierung von *E. coli* Zellen mit paramagnetischen Partikeln

Die Markierung von *Escherichia coli* Zellen mit paramagnetischen Partikeln wurde vor einer magnetischen Zellsortierung durchgeführt. In der Regel kam eine magnetische Zellsortierung dann zur Anwendung, wenn mehr als 10^{10} Zellen in einer Anreicherungsrunde auf ihre Bindungseigenschaften hin durchmustert wurden. Verwendet wurden paramagnetische Partikel der Firma Miltenyi Biotech. Diese Partikel waren mit Streptavidin beschichtet, so dass sie an Biotinmoleküle binden. Daher ist auch bei der Markierung der präsentierenden Zellen mit den paramagnetischen Partikeln die vorletzte Stufe immer ein biotinkonjugierter Antikörper. Die Antikörperkaskade bis zu der Zugabe der Partikel ist - wie schon bei der Fluoreszenzmarkierung von Bakterien - in jedem Experiment anders und erfolgt analog zur Fluoreszenzmarkierung, mit dem einzigen Unterschied, dass am Ende der Markierung nicht Streptavidin-R-Phycoerythrin zugegeben wird, sondern die Streptavidin beschichteten paramagnetischen Partikel. Die Menge der eingesetzten Partikel variierte je nach Menge der zu markierenden Zellen. Es wurden 1 bis 150 ml Bakterienkultur aufgearbeitet. Für 10 ml Kulturvolumen wurden in der Regel 50 µl Partikel (1:5 verdünnt in PBS) eingesetzt, für 150 ml Kulturvolumen bis zu 500 µl der Partikel (1:5 verdünnt in PBS). Nach der Inkubation mit den Partikeln wurden die Bakterien 2-3 mal mit PBS gewaschen. Die Partikel pelletieren nicht bei der Zentrifugation und wurden so aus der Lösung entfernt. Die so behandelten Zellen wurden auf Eis gelagert und nach Möglichkeit direkt der magnetische Zellsortierung unterzogen.

3.4.4 Mikroskopische Analyse von fluoreszenzmarkierten Bakterien

Eine Möglichkeit, die Bindung eines bestimmten Zielproteins an die Bakterienzellen zu analysieren, war die Kontrolle im Fluoreszenzmikroskop. Für die Analyse wurde ein Zeiss Axioskop benutzt. Bei normaler Kontrolle von fluoreszenzmarkierten Zellen reichte in der Regel ein Acroplan 100Δ/1,25 Oil Objektiv aus. Bei sehr schwacher Fluoreszenz der Bakterien wurde ein Plan-Neofluar 100Δ/1,3 Oil Objektiv verwendet. Zur Kontrolle von mit Phycoerythrin markierten Zellen wurde in der Regel der Filter 09 gewählt. Bei schwächer fluoreszierenden Zellen wurde in der Regel der Filter 15 benutzt. Die Ergebnisse wurden schriftlich protokolliert, es wurden während dieser Arbeit keine Fotos aufgenommen, da keine CCD-Kamera zur Verfügung stand.

3.4.5 Analyse von Bakterienzellen mit dem Durchflußcytometer

Zur Analyse wurde ein MoFlo *Cellsorter* (Cytomation) verwendet. Der verwendete Laufpuffer war immer PBS. Das laseroptische Flusssystem des Gerätes wurde mit Fluoreszenzpartikeln (Polystyrenpartikel, *Flow Check Fluorospheres*, Beckman Coulter) justiert. Diese Partikel sind mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen beschichtet. Dadurch konnten beide Fluoreszenzen (FITC und Phycoerythrin) separat eingestellt werden. In der Regel wurde die Optik jedoch nur mit der Fluoreszenz 1 (FITC) eingestellt.

Nach der Justage konnten die Zellen analysiert werden. Die Parameter am MoFlo waren dabei: *forward scatter*, *side scatter*, 730 (LIN mode, *amplification factor* 6), FL1 600 (LOG mode), FL2 600 (LOG mode), *trigger* Parameter: *side scatter*. Die Zellen wurden so verdünnt, dass zwischen 2000 und 40000 Ereignisse pro Sekunde registriert wurden. In der Regel wurden 3×10^5 Ereignisse für eine Messung analysiert. Die erste Auswertung erfolgte mit der Cyclops Software. Diese erlaubt es, Fluoreszenzregionen zu definieren und die Ereignisse in diesen Regionen statistisch auszuwerten. Für eine genauere Analyse wurden die Daten exportiert und mit Sigma Plot (SPSS-Science) ausgewertet.

3.4.6 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

Zur fluoreszenzaktivierten Zellsortierung wurde der MoFlo *Cellsorter* benutzt. Die Einstellung der Optik erfolgte wie in 3.4.5 beschrieben. Für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung mußte jedoch zusätzlich die Sortierungseinheit des Gerätes eingestellt werden. Dazu wurden ebenfalls die fluoreszierenden Polystyrenpartikel benutzt. Die Kallibrierung beinhaltete im wesentlichen die Einstellung des Abrißpunktes des letzten Tropfens an der Keramikdüse. Zur Überprüfung der Einstellung wurden 10×10^3 Fluoreszenzpartikel vom Gerät einzeln auf einen Objekträger abgelegt. Das Ergebnis konnte im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop, Achrostigmat $10 \times 0,25$, Filter 09) analysiert werden. Wenn das Gerät zehnmal 8-10 Ereignisse korrekt ablegte, wurde mit der Sortierung von Bakterien begonnen. Gegebenenfalls musste sonst noch nachjustiert werden. Während der Sortierung wurde am Monitor kontrolliert, ob sich der Abrißpunkt des Tropfens verschob. Wenn dies der Fall war, wurde die Sortierung unterbrochen und die Sortiereinheit neu justiert. In der Regel war der Flüssigkeitsstrahl aber sehr stabil und das einmal eingestellte Gerät konnte den ganzen Tag benutzt werden.

Die Zelldichte der zu sortierenden Bakterien wurde so eingestellt, dass 2000-40000 Ereignisse pro Sekunde analysiert wurden. Die Anzahl der sortierten Ereignisse variierte bei den unterschiedlichen Experimenten und ist im Ergebnisteil mit angegeben.

3.4.7 Magnetische Zellsortierung

Zum Teil wurden bei Anreicherungsexperimenten, die die Durchmusterung von sehr vielen Zellen ($> 10^9$) voraussetzten, die ersten beiden Anreicherungsrounden mit magnetischer Zellsortierung durchgeführt. Die magnetische Zellsortierung hat gegenüber der fluoreszenzaktivierten den Vorteil, dass viel mehr Zellen parallel sortiert werden können. Dadurch verkürzt sich die Isolierungszeit erheblich. Der

Nachteil dabei ist allerdings, dass die magnetische Anreicherung nicht so effizient ist und man sie auch nicht direkt, wie bei einem durchflußcytometrischen Histogramm, verfolgen kann. Daher wurde teilweise der Kompromiss gefunden, nur die ersten Anreicherungsrounden magnetisch durchzuführen und danach durch fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung weiter anzureichern.

Für die magnetische Zellsortierung wurden ausschließlich Magnetsäulen der Firma Miltenyi und die dazugehörigen Magnete benutzt. Es wurden sowohl „mini Macs“ als auch „maxi Macs“ Säulen in den entsprechenden Magneten verwendet. Die magnetisch markierten Zellen wurden auf die jeweils mit PBS äquilibrierte (3 ml „mini“, 10 ml „maxi“) Säule gegeben. Der Zelldurchlauf wurde in der Regel verworfen. Anschließend wurde die Säule insgesamt 3 mal mit PBS gewaschen („mini“ je 1 ml, „maxi“ je 4 ml). Nach dem Waschen wurde die Säule aus dem Magneten genommen und die gebundenen Zellen wurden mit PBS ausgewaschen.

3.5 Bindungsstudien mittels Plasmonresonanz (Biacore)

Für die genauere Analyse der Bindungseigenschaften von isolierten Peptiden wurde teilweise versucht, die Bindungskonstante zu bestimmen. Dazu wurde ein Biacore 1000 benutzt. Für die Bindungsstudien wurde der Sensorchip CM5 verwendet. Dieser Chip ist auf der Goldfläche mit carboxymethyliertem Dextran beschichtet. Über die vorher aktivierten Carboxygruppen können Moleküle an diesen Chip kovalent gekoppelt werden. In dieser Arbeit wurde die Kopplung von Proteinen über Aminogruppen (Lysinreste) durchgeführt.

Für die Aktivierung der Chips wurde z.T. der *amine coupling kit* von Biacore benutzt, teilweise wurden aber auch Chemikalien anderer Hersteller verwendet. Die Aktivierung eines Chips wurde durch Injektion von EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid) und NHS (N-Hydroxysuccinimid) erreicht. Dazu wurden 35 µl eines NHS/EDC Gemisches (0,05 M NHS; 0,02 M EDC) über die Chipoberfläche geleitet. Die Kontaktzeit betrug 7 Minuten (Flußrate 5 µl/min). Anschließend wurde das zu koppelnde Protein über den Chip geleitet (35 µl mit einer Kontaktzeit von 7 min, die Konzentration war bei jeder Kopplung verschieden und ist im Ergebnisteil mit angegeben). Dabei war darauf zu achten, dass der Puffer keine Aminogruppen enthielt, die ansonsten die aktivierte Oberfläche belegt hätten. Üblicherweise wurde 10 mM Acetat mit unterschiedlichen pH Werten benutzt. Der pH Wert spielt bei der Kopplung eine entscheidende Rolle, da die Oberfläche des Chips negativ geladen ist und es eventuell zu elektrostatischer Abstoßung kommen kann. Demgegenüber dürfen die Aminogruppen nicht protoniert sein. Aus diesem Grund wurde der pH Wert des Kopplungspuffers für jedes zu koppelnde Protein separat ausgetestet. Nach der Kopplung des Proteins wurden die verbleibenden aktivierten Gruppen durch einen 7 minütigen Puls von 1 M Ethanolamin abgesättigt. Die so vorbereitete Chipoberfläche des Sensorchips konnte für Bindungsstudien mit dem zum gekoppelten Protein korrespondierenden Liganden verwendet werden.

Als Laufpuffer während der Bindungsstudien wurde HBS (10 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7,4) verwendet. Der freie Ligand wurde gegen diesen Puffer dialysiert und konnte so vorbereitet für die Analysen benutzt werden. Vor der Messung der

Änderung des Refraktionsindexes wurde darauf geachtet, dass das Gerät eine stabile Basislinie anzeigte. Anschließend wurde der Ligand in die Flußzelle injiziert und die Änderung der Resonanz bei und während der Injektion wurde vom Gerät aufgezeichnet. Die Flussrate betrug bei diesen Messungen in der Regel 20 µl/min. Nach der Injektion wurde noch die Dissoziation für mindestens 4 min verfolgt und danach konnte die Chipoberfläche regeneriert werden. Die Regeneration wurde in der Regel durch einen einminütigen Puls von 100 mM Glycin erreicht (es wurde Glycin pH 2 und pH 1,5 verwendet).

Da es häufig zu unspezifischen Interaktionen des Liganden mit der Chipoberfläche kommt, die sich auch in der Änderung der Response Units widerspiegeln, wurde für jede vermessene Proteinkonzentration auch eine Kontrollmessung vorgenommen. Diese bestand darin, die gleiche Injektion des Liganden durch eine andere Flußzelle durchzuführen. Diese zweite Flußzelle war mit einem anderen Protein als dem Interaktionspartner gekoppelt. Die tatsächlich vom Liganden hervorgerufene Änderung der Response war die Differenz dieser beiden Messungen. Die Differenz ließ sich mit der Biaevaluation Software berechnen. Mit dieser Software wurden auch die kinetischen Daten berechnet (vergl. Ergebnisteil).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kartierung linearer Epitope durch bakterielle Oberflächenpräsentation genbasierter Peptide

4.1.1 Generelle Vorgehensweise

Die Verwendung von Peptidbibliotheken zur Identifizierung antigener Bereiche eines Proteins ist gebräuchlich und etabliert. Ein Peptid, das von einem Antikörper erkannt wird, bezeichnet man als Epitop, die Aufklärung solcher Epitope nennt man Epitopkartierung oder *epitope mapping*. In den meisten Fällen wird dabei auf die chemische Peptidsynthese zurückgegriffen. Das zu untersuchende Protein wird in geordneten, sich überlappenden Peptiden von 12-15 Aminosäuren synthetisiert. Solche Verfahren werden als PEPSCAN (Geysen *et al.*, 1984; Reineke *et al.*, 1999) bezeichnet. Die Wechselwirkung der Peptide mit den zu untersuchenden Antikörpern wird dann in der Regel durch ELISA oder *dot-blot* Techniken ausgewertet. Häufig kommen auch *Phage Display* Techniken zur Anwendung (vergl. 1.3.1). Ziel der nachfolgenden Experimente war die Etablierung und Anwendung eines Systems zur Bestimmung von Epitopsequenzen. Dieses System sollte auf bakterieller Zelloberflächenpräsentation basieren, wobei die zu untersuchenden Peptide über das Intimin auf der äußeren *E. coli* Membran verankert werden sollen. Ein solcher Ansatz würde es möglich machen, individuelle Varianten einem Hochdurchsatzverfahren (*high throughput screen*, HTS) bei der Durchmusterung zu unterziehen.

Es sollten Antikörper/Antigen Wechselwirkungen aufgeklärt werden. Dabei sollte es sich um Interaktionen von linearen Peptiden, die in ihrer Summe ein ganzes Protein darstellen, mit Antikörpern, die gegen das ganze Protein gerichtet sind, handeln. Durch indirekte Bestimmung der Peptidsequenz, die von den Antikörpern erkannt wird, lassen sich Bereiche des Proteins eingrenzen, die für den Organismus, aus dem die Antikörper stammen, immunogen wirken. Um solche Epitope mittels bakterieller Zelloberflächenpräsentation zu kartieren, muß eine Peptidbibliothek erzeugt werden, die in ihrer Summe das ganze zu untersuchende Protein darstellt. Anschließend müssen diese Peptide einer Abfrage durch die Antikörper zugänglich gemacht werden. Die Erzeugung der Peptidbibliothek muß auf DNA-Ebene erfolgen, d.h. es wird genau genommen keine Peptidbibliothek sondern eine DNA-Fragmentbibliothek hergestellt. Diese DNA-Fragmentbibliothek kodiert für die gesamten Peptide des Proteins sowie für alle *Framshift*-Mutanten. Durch Induktion der Genexpression werden die zu den DNA-Fragmenten korrespondierenden Peptide produziert und anschließend über den Membrananker, das Intimin, auf der äußeren *E. coli* Membran präsentiert. Dadurch trägt jede Bakterie dieser Bibliothek ein individuelles Peptid, das einer Abfrage durch die zu untersuchenden Antikörper zugänglich ist. Die Vorgehensweise der Bibliotheksherstellung ist in Abb. 4.1 schematisch dargestellt.

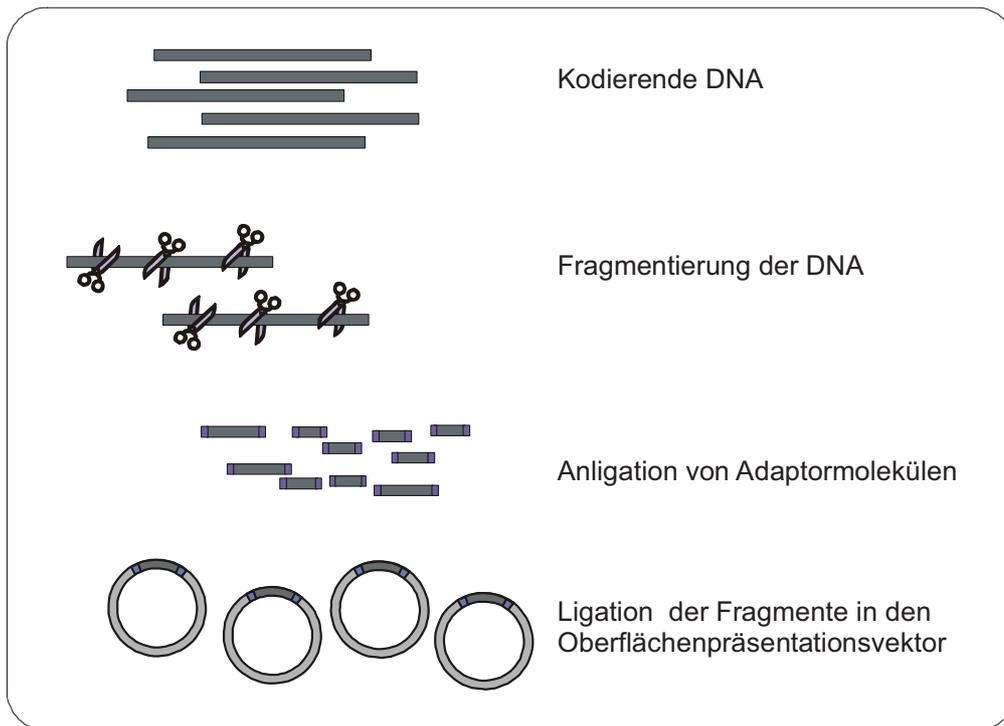


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Erzeugung einer DNA-Fragmentbibliothek. Die für das zu untersuchende Protein kodierende DNA wird mittels PCR amplifiziert und anschließend durch Behandlung mit DNaseI in kurze Fragmente gespalten. Danach werden Adaptormoleküle anligiert und schließlich werden diese Genabschnitte in einen Oberflächenpräsentationsvektor ligiert und mit dieser Ligation werden *E. coli* Bakterien transformiert.

Die DNA-Fragmente werden durch einen DNaseI Verdau des Gens erzeugt. Anschließend werden an diese Fragmente Adaptormoleküle anligiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Adaptormoleküle (s. Abb. 4.2) fügen an die Fragmente eine *Ava*I und eine *Bam*HI Schnittstelle. Dadurch wird eine deutlich höhere Ligationseffizienz mit dem gleich gespaltenen Vektor erreicht. Zusätzlich fügt der 3' Adaptor (*Bam*HI-Adaptor) Stoppcodone in allen drei Leserastern ein. Somit wird eine Translation über die Sequenz des *Bam*HI-Adaptors hinaus verhindert.



Abb. 4.2: Die zur Klonierung verwendeten Adaptormoleküle. Die doppelsträngigen Adaptoren resultierten aus der Hybridisierung von je zwei Oligonukleotiden. Die Adaptoren fügen nach Ligation mit dem DNaseI Fragment die überhängenden Enden der Restriktionsenzyme *Ava*I bzw. *Bam*HI an das DNA-Fragment an. Dadurch wird die Ligationseffizienz mit dem gleich geschnittenen Vektor pASKInt100 gegenüber einer *blunt-end* Ligation erhöht. Der *Bam*HI-Adaptor fügt Stoppcodone (unterstrichen) in allen drei Leserastern an das Fragment an. Somit wird eine Translation in die Vektorsequenz ausgeschlossen.

Nach der Anbringung der beiden Adaptoren werden die Fragmente mit dem mit *Ava*I und *Bam*HI geschnittenen Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 (s. Abb. 4.3)

ligiert und mit diesen Plasmiden *E. coli* Bakterien transformiert. Der Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 besitzt ein verkürztes Intimingen (Christmann *et al.*, 2001; Wentzel *et al.*, 2001). Dieser Vektor entstand durch Klonierung des verkürzten Intimings in den Vektor pASK21-EETI (Christmann *et al.*, 1999). Die für die für Codone #1 bis #659 kodierende DNA wurde mittels PCR aus dem EHEC O157:H7 Stamm 933 amplifiziert (GenBank accession no. Z11541, bp 69 bis 2045) und kloniert. Anschließend wurde ein amber Codon an Position #35 der *eaeA* Sequenz und die für das Etag Epitop kodierende DNA-Sequenz eingeführt (Wentzel *et al.* 2001). Der Vektor enthielt das verkürzte Intimingen unter der Kontrolle einer *tetA* P/O Region. Durch Induktion der Bakterien mit Anhydrotetracyclin wird ein bipartites Fusionsprotein aus dem verkürzten Intimin und dem mit dem klonierten Fragment korrespondierenden Peptid produziert. Nach der Verankerung des Intimins in der äußeren Membran wird das Peptid auf der Zelloberfläche präsentiert und einer Abfrage durch die Antikörper zugänglich gemacht (s. Abb. 4.3).

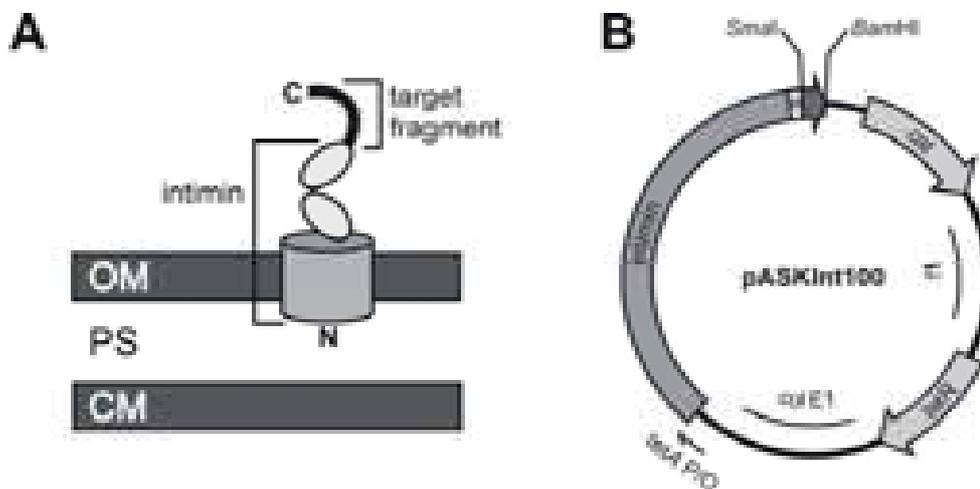


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Oberflächenpräsentation (A) sowie des Oberflächenpräsentationsvektors pASKInt100 (B).

A: CM, Cytoplasmamembran; PS, Periplasmatischer Raum; OM, Äußere Membran; N, N-Terminus; C, C-Terminus; target fragment, zum klonierten DNA-Fragment korrespondierendes Peptid.

B: *intimin*, Gen kodierend für das verkürzte Intimin; *e*, kodierende Sequenz für das Etag Epitop; *Sma*I, Restriktionsschnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Sma*I; *Bam*HI, Restriktionsschnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI; *cat*, Gen kodierend für die Chloramphenicol-Acetyltransferase; *tetR*, Tetracyclin Repressor; *tetA* P/O, Tetracyclin Promotor/Operator Region.

Durch Induktion mit Anhydrotetracyclin wird ein bipartites Fusionsprotein aus dem Intimin-Etag und dem zum klonierten DNA-Fragment korrespondierenden Peptid produziert. Das Intimin wird N-terminal in der äußeren Membran verankert und das C-terminale Peptid ist zum extrazellulären Medium gerichtet.

Die induzierten Zellen können mit den Antikörpern, deren Epitope bestimmt werden sollen, inkubiert werden. Die Bakterien, die ein Peptid präsentieren, das von den Antikörpern erkannt wird, werden von diesen gebunden. Durch Wegwaschen der ungebundenen Antikörper und durch Inkubation mit einem zweiten biotinylierten Antikörper, der den ersten bindet, kann anschließend Biotin auf diesen Zellen

deponiert werden. Daraufhin können sie mit einem an Streptavidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff fluoreszenzmarkiert werden (s. Abb. 4.4). Es ist selbstverständlich ebenso möglich, den Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Fluoreszein) schon an den zweiten Antikörper zu koppeln. In dieser Arbeit wurde als Fluoreszenzfarbstoff ausschließlich Streptavidin-R-Phycoerythrin verwendet. R-Phycoerythrin gehört zu den Phycobilliproteinen. Diese Proteine aus Cyanobakterien sind dort als Antennenpigmente an der Photosynthese beteiligt. Die relative Molekularmasse beträgt 240.000 und das Emissionsmaximum ist bei 578 nm. Die Absorptionsmaxima liegen bei 488 nm, 546 nm und 565 nm. Die maximale relative Quantenausbeute beträgt bis zu 0,82 (Oi *et al.*, 1982). Damit liegt die Ausbeute deutlich höher als bei FITC.

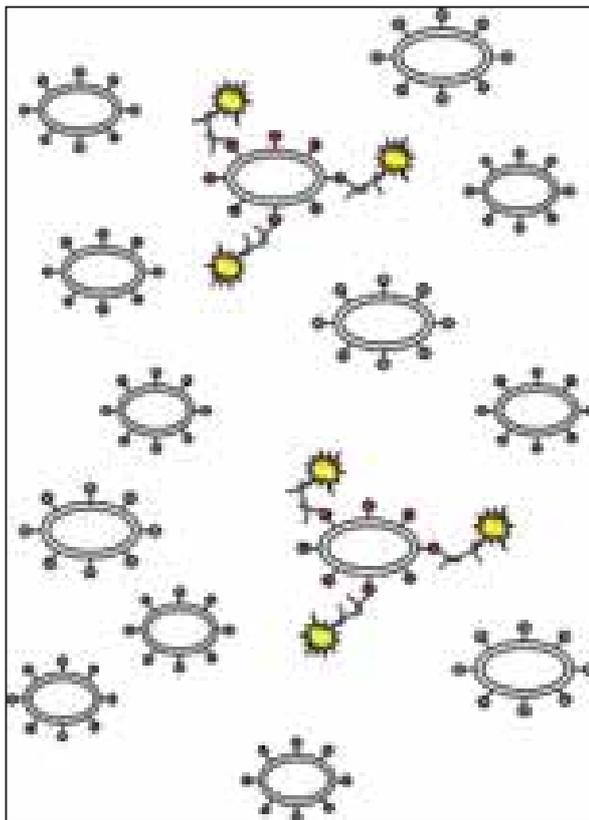


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Fluoreszenzmarkierung exponierter Peptidbibliotheken mit Antikörpern. Die Zellen präsentieren auf ihrer Oberfläche Peptide (dargestellt als Kugeln), deren korrespondierende DNA in den Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 kloniert wurde. Nach Inkubation der Bakterien mit den zu untersuchenden Antikörpern werden solche Bakterien von diesen Antikörpern gebunden, die das passende Epitop präsentieren. Anschließend können Zellen, die Antikörper gebunden haben, durch einen zweiten biotinylierten Antikörper und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert werden. Dadurch wird das Bakteriengemisch einer Durchmusterung durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung zugänglich gemacht. Bakterien, die Antikörper gebunden haben,

werden aussortiert und vermehrt. Dieser Anreicherungsprozess aus Fluoreszenzmarkierung, Sortierung und Vermehrung läßt sich beliebig oft in iterativen Runden wiederholen. Am Ende der Anreicherung kann durch Sequenzierung der Plasmid-DNA indirekt die Epitopsequenz bestimmt werden.

Die Zellen, die über das von ihnen präsentierte Peptid Antikörper gebunden haben, weisen dann gegenüber den anderen eine erhöhte relative Fluoreszenz auf. Somit ist es möglich, sie über fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von den anderen, nicht epitopräsentierenden Bakterien, zu trennen (veranschaulicht in Abb. 4.4). Anschließend kann die Peptidsequenz von isolierten Einzelklonen, die jeweils noch auf ihre Fähigkeit, Antikörper zu binden, getestet werden müssen, indirekt durch Sequenzierung der Plasmid-DNA bestimmt werden.

4.1.2 Kartierung von η -Lactamase Epitopen

Um die generelle Anwendbarkeit der intiminvermittelten Zelloberflächenpräsentation zur Identifikation von Wechselwirkungen linearer Peptidantigene mit Antikörpern zu zeigen, wurde in dieser Arbeit zuerst ein Experiment mit η -Lactamase als Zielprotein durchgeführt. Das Ziel dieses Experiments war, Epitope, die von einem polyklonalen anti-Ampicillinase Kaninchenserum erkannt werden, mittels bakterieller Zelloberflächenpräsentation zu isolieren und ihre Sequenz zu bestimmen.

Die TEM1 η -Lactamase ist seit Konstruktion des Vektors pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) als Selektionsmarker in der molekularbiologischen Forschung gebräuchlich und wird auf vielen Plasmiden verwendet. Eine Produktion des Proteins in *E. coli*, sei es als ganzes Protein oder in Fragmenten, sollte daher problemlos möglich sein. Die Vorgehensweise zur Kartierung der lineareren TEM1 η -Lactamase Epitope war wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben. Das Gen für die η -Lactamase sollte mittels PCR amplifiziert, anschließend durch DNaseI fragmentiert und diese Fragmente sollten schließlich in den Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 kloniert werden (s. Abb. 4.1). Dadurch entsteht bei Induktion der Proteinproduktion mit Anhydrotetracyclin ein bipartites Fusionsprotein aus Intimin und einem Peptid, resultierend aus der korrespondierenden DNA-Sequenz des klonierten Fragments. Dieses Peptid wird, vermittelt durch das Intimin, auf der Zelloberfläche präsentiert und einer Abfrage durch Antikörper zugänglich gemacht. Durch indirekte Fluoreszenzmarkierung der anti η -Lactamase Antikörper sollte die Wechselwirkung mit dem Peptid auf den Bakterienzellen sichtbar und durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung isolierbar werden.

4.1.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen zu η -Lactamasen

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts gehörten Infektionskrankheiten wie Pneumonien, Tuberkulose und bakterielle Meningitis zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Die Entdeckung Alexander Flemings im Jahr 1928, dass die Kontamination von Agarplatten mit dem Pilz *Penicillium notatum* Bakterien in ihrem Wachstum behindert, sowie die Isolierung und die chemische Charakterisierung des vom Pilz produzierten Wirkstoffs zehn Jahre später, stellte eine Revolution bei der Bekämpfung solcher bakteriellen Infektionskrankheiten dar. Der gefundene Stoff, das Penicillin, ein η -Lactam Antibiotika, interferiert in einer bestimmten Weise mit der Biosynthese des Hauptbestandteils der bakteriellen Zellwand, dem Peptidoglycan (Ghuysen, 1991). Dieses Makromolekül bildet ein dreidimensionales Netz um die gesamte Bakterienzelle und schützt diese vor dem eigenen osmotischen Druck (Frere und Joris, 1985). Weiterhin ist das Peptidoglycan für die Form und die Rigidität sowohl Gram-positiver als auch Gram-negativer Zellen verantwortlich. Da dieser Zellwandbestandteil auf die bakterielle Welt beschränkt ist, erklärt sich die hohe Spezifität der η -Lactam Antibiotika für Prokaryonten.

Die physiologischen Zielmoleküle der η -Lactam Antibiotika sind die DD-Peptidasen, auch Penicillin-Bindeproteine genannt. Sie sind für den letzten Schritt der Zellwandbiosynthese, die Verknüpfung der unterschiedlichen Peptidoglycanstränge, verantwortlich (Nanninga, 1991). Die Quervernetzung wird durch die Verknüpfung

einer endständigen Aminosäure (meistens Glycin) der einen Kette mit zwei endständigen D-Aminosäuren (D-Ala-D-Ala) der anderen Kette hervorgerufen. Die η -Lactam Antibiotika ahmen die Peptidbindung der zwei D-Aminosäuren nach (Amidbindung im Lactamring). Die DD-Peptidasen besitzen im aktiven Zentrum ein Serin, welches während der Katalyse einen alkylierungs- dealkylierungs Zyklus durchläuft. Die Antibiotika werden von den Peptidasen gebunden, und es entsteht ein sehr stabiles, katalytisch nicht aktives Alkylenzym (s. Abb. 4.5).

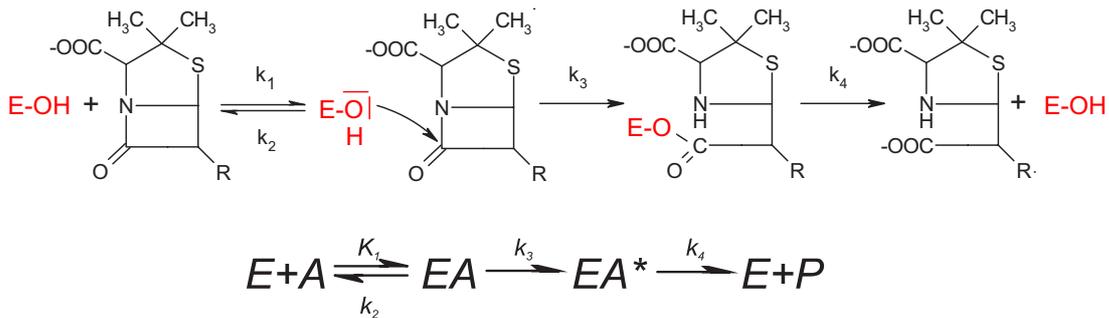


Abb. 4.5: Reaktionsgleichung und Schema eines Penicillin Bindeproteins mit η -Lactam-Antibiotika. E Penicillin Bindeprotein, A η -Lactam Antibiotika, EA nicht kovalent verknüpfter Enzym-Substratkomplex, EA* inaktives kovalent verknüpftes Alkylenzym, P umgesetztes Antibiotikum

Beide Komplexe EA und EA* sind katalytisch inaktiv. Durch einen hohen k_3 und einen sehr niedrigen k_4 Wert akkumuliert sich das Alkylenzym (EA*) im Gleichgewichtszustand, und die Zellwand kann nicht mehr synthetisiert werden. Der alkylierte Rest, das Serin im aktiven Zentrum der DD-Peptidasen ist essentiell für die Interaktion mit den natürlichen Substraten (den beiden D-Alaninen). Somit stellen die η -Lactam Antibiotika auf dem Katalysemechanismus basierende Inhibitoren der Penicillin-Bindeproteine dar.

Der Einsatz dieser Antibiotika in den 40 Jahren des letzten Jahrhunderts markierte einen Wendepunkt bei der Behandlung von Infektionskrankheiten. Es wurde aber, wie man heute weiß, viel zu früh von einem Sieg über die bakteriell verursachten Krankheiten gesprochen. Mit dem vermehrten Einsatz von η -Lactam Antibiotika stieg der Anteil resistenter Bakterien drastisch an. So nahm die Anzahl penicillinresistenter *Staphylococcus aureus* Stämme direkt nach der Entwicklung des Antibiotikas 1942 deutlich zu (Wiedemann *et al.*, 1989). Dies führte zur Entwicklung immer neuer η -Lactam Antibiotika und dadurch bedingt zum Auftreten von Bakterien, die immer neue Resistenzen ausgebildet hatten. Eine wesentliche Rolle bei der Resistenz spielen chromosomal- oder plasmidkodierte η -Lactamasen. Diese Enzyme hydrolysieren sehr effizient die Amidbindung im Lactamring, wodurch die Antibiotika ihre Wirksamkeit verlieren (Frere, 1995). Die η -Lactamasen reagieren ähnlich wie die DD-Peptidasen mit den Antibiotika (s. Abb. 4.5). Im Gegensatz zu den Penicillin-Bindeproteinen weisen diese Enzyme deutlich höhere Geschwindigkeitskonstanten auf. So liegt der k_4 (s. Abb. 4.5) eines Penicillin-Bindeproteins für gewöhnlich nicht über $0,001 \text{ s}^{-1}$ (Frere *et al.*, 1992). Daraus resultiert eine Halbwertszeit des alkylierten - nicht aktiven - Enzyms $t_{1/2}$

> 10 min. Demgegenüber sind bei η -Lactamasen Geschwindigkeitskonstanten von $k_4 \sim 10000 \text{ s}^{-1}$ bekannt (Matagne *et al.*, 1998). Zusätzlich ist die Alkylierungsrate (k_{cat}/K_m) größer als bei den Penicillin-Bindeproteinen. Diese quantitativen Unterschiede sind dafür verantwortlich, dass η -Lactamasen Penicilline und Penicilline DD-Peptidasen inaktivieren.

Die große Gruppe der η -Lactamasen wird in vier Klassen A-D nach Substratspezifität, Inhibitorresistenz und Struktur eingeteilt (Bush *et al.*, 1995). Die Klassen A, C und D enthalten Serin Lactamasen, für die das obige Reaktionsschema zutrifft. Die Klasse B enthält die seltener auftretenden Metallo-Enzyme, die im aktiven Zentrum Zn^{2+} Ionen für die Katalyse benötigen. Diese Enzyme wurden zunächst ausschließlich in *Bacillus cereus* und nahen Verwandten gefunden. In letzter Zeit werden diese Enzyme aber immer häufiger in klinischen Isolaten wie *Bacteroides*, *Aeromonas* und *Chryseobacterium* angetroffen. Desweiteren treten plasmidkodierte Imp1 Metallo-Lactamasen vermehrt in *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* sowie in *Serratia marcescens* auf (Payne, 1993). Der Reaktionsmechanismus dieser Metallo-Enzyme ist nicht identisch mit dem in Abb. 4.5 dargestellten.

Eine Strategie, die Resistenzen der infektiösen Keime zu umgehen, war die Entwicklung immer neuerer Antibiotika, die von den bis dahin charakterisierten η -Lactamasen nicht umgesetzt wurden. Dies führte aber auf seiten der Bakterien zu einer *evolution in real time* (Petrosino *et al.*, 1998) und zu neuen Resistenzen. Beängstigend an dieser Entwicklung war der Effekt, dass sich die Resistenzen horizontal zwischen Bakterienstämmen verbreiten (Davies 1994, Baquero und Blazquez, 1997). In den 80 Jahren des letzten Jahrhunderts reduzierten nahezu alle Pharmakonzerne ihre Anstrengungen bezüglich der Entwicklung von neuen Antibiotika. Der Einsatz dieser antibakteriellen Stoffe wurde aber weltweit in vielen Bereichen weiter verstärkt. Dies führte dazu, dass in der Humanmedizin gebräuchliche Antibiotika ihre Wirksamkeit verloren haben. So wirkt gegen methicillinresistente *Staphylococcus aureus* Stämme (MRSA) nur noch ein Antibiotikum (Vancomycin), und es ist nur noch eine Frage der Zeit, bis diese letzte Barriere fällt (Walsh, 1999). Die Verbreitung von multiresistenten Bakterien kann zu Zuständen, wie sie vor der Entwicklung des Penicillins herrschten, führen (Cohen, 2000). Die Entwicklung neuer Antibiotika und neuer Inhibitoren sowie die genaue Identifizierung und Charakterisierung von η -Lactamasen bleibt daher eine der dringendsten Aufgaben der klinischen Forschung.

4.1.2.2 Konstruktion einer η -Lactamase Fragmentbibliothek und Bestimmung linearer Epitope

Es sollten Epitope kartiert werden, die von einem polyklonalen anti-Penicillinase Serum erkannt werden. Es handelte sich um ein kommerziell vertriebenes Kaninchenserum (s. Abschnitt 2.6). Die Vorgehensweise war analog zur Abb. 4.1. Das *bla* Gen (kodierend für die TEM-1 η -Lactamase) wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide Bla-BglII-up und Bla-Hind-10 aus dem Plasmid pASK75 amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels NucleotrapCR gereinigt. Daraufhin erfolgte die Fragmentierung der DNA durch einen DNaseI Verdau. Dazu wurden 4 Ansätze zu je 5 μg PCR Produkt mit unterschiedlichen Enzymmengen verdaut. Der Ansatz 1 wurde mit 18 mU, der Ansatz 2 mit 27 mU, der Ansatz 3 mit

36 mU und der Ansatz 4 in Gegenwart von 180 mU DNase I gespalten. Die Spaltung erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 mM EDTA pH 8,0 (Endkonzentration 50 mM) abgestoppt. Daraufhin wurden die Fragmente zur Größenselektion auf ein Acrylamidgel (12,5 %, TBE) aufgetragen. Es wurden Fragmente der Größe zwischen 20 bp und 40 bp aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Elution der Fragmente wurden die Gelstücke für 12 Stunden in TBE Puffer bei 50 °C inkubiert. Der Überstand, der dann die DNA Fragmente enthielt, wurde Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend wurde die DNA mit Ethanol aus der Lösung gefällt. Daraufhin wurden überhängende Enden mit T4-DNA Polymerase aufgefüllt bzw. abgebaut. Die so erhaltenen Fragmente waren vorbereitet für die Anligation der zwei Adaptormoleküle *AvaI*-Adaptor, resultierend aus der Hybridisierung der Oligonukleotide *AvaI*-adaptor_up/*AvaI*-Adaptor_lo und *BamHI*-Adaptor, resultierend aus der Hybridisierung der Oligonukleotide *BamHI*-Adaptor_up/*BamHI*-Adaptor_lo (vergl. Abb. 4.2).

Die Adaptormoleküle waren aus mehreren Gründen gegenüber einer *blunt end* Ligation von Vorteil. Sie fügen die überhängenden Enden der Restriktionsenzyme *AvaI* und *BamHI* an die Fragmente an, wodurch die Ligationseffizienz in den Vektor deutlich erhöht wurde. Weiterhin wurden von dem *BamHI*-Adaptor Stoppcodone in allen drei Leserastern eingeführt. Dies war sinnvoll, da durch die unterschiedliche Länge der zu klonierenden Fragmente das Leseraster verschoben werden konnte und der Vektor nur über ein Stoppcodon verfügte. Somit war eine Translation über den Bereich des *BamHI*-Adaptors hinaus in die Vektorsequenz nicht möglich. Um die Ligationseffizienz der Adaptoren mit dem *Insert* zu erhöhen, wurden die 5'-Enden der Oligonukleotide *AvaI*-adaptor_lo und *BamHI*-adaptor_up vor der Hybridisierung mit Polynukleotid-Kinase (PNK) phosphoryliert. Diese Adaptoren wurden mit den DNA Fragmenten ligiert (2,5 molarer Adaptoren Überschuss). Die Ligasereaktion wurde über Nacht bei 15 °C durchgeführt. Um die Linkerdimere aus der Lösung zu entfernen, wurden die Fragmente erneut über ein Polyacrylamidgel (12,5 %) größenfraktioniert. Anschließend wurden sie mit dem *AvaI/BamHI* gespaltenen Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 (s. Abb. 4.3) ligiert. Mit diesen Plasmiden wurde *E. coli* BMH 71-18 transformiert. Insgesamt wurden $1,03 \cdot 10^5$ unabhängige Transformanten erzeugt. Die Bakterienbibliothek wurde als DMSO-Kultur bei -80 °C gelagert.

Zur Isolierung von Epitopen wurden die Zellen, die die η -Lactamase Fragmentbibliothek repräsentierten, angeimpft und induziert. Anschließend wurden die Zellen mit dem anti- η -Lactamaseserum, anti-Kaninchen Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Im Fluoreszenzmikroskop waren fluoreszierende Zellen sichtbar. Diese Bakterien präsentierten Peptidfragmente, die mit Antikörpern aus dem anti-Ampicillinase Serum interagierten. Theoretisch könnte die Interaktion aber auch mit allen anderen Komponenten, die bei der Fluoreszenzmarkierung eingesetzt wurden (dem anti-Kaninchen Serum oder Streptavidin-R-Phycoerythrin), stattfinden.

Die so markierten Zellen wurden anschließend im Durchflußzytometer vermessen und fluoreszierende Zellen aussortiert (s. Abb. 4.6). Insgesamt wurden 150.000 Zellen bei der ersten Sortierung gesammelt. Diese wurden anschließend resortiert (Parameter

sort single 1). Es wurden insgesamt 50.000 Ereignisse, die eine relative Fluoreszenz zwischen 12 und 10.000 aufwiesen, separiert (s. Abb. 4.6).

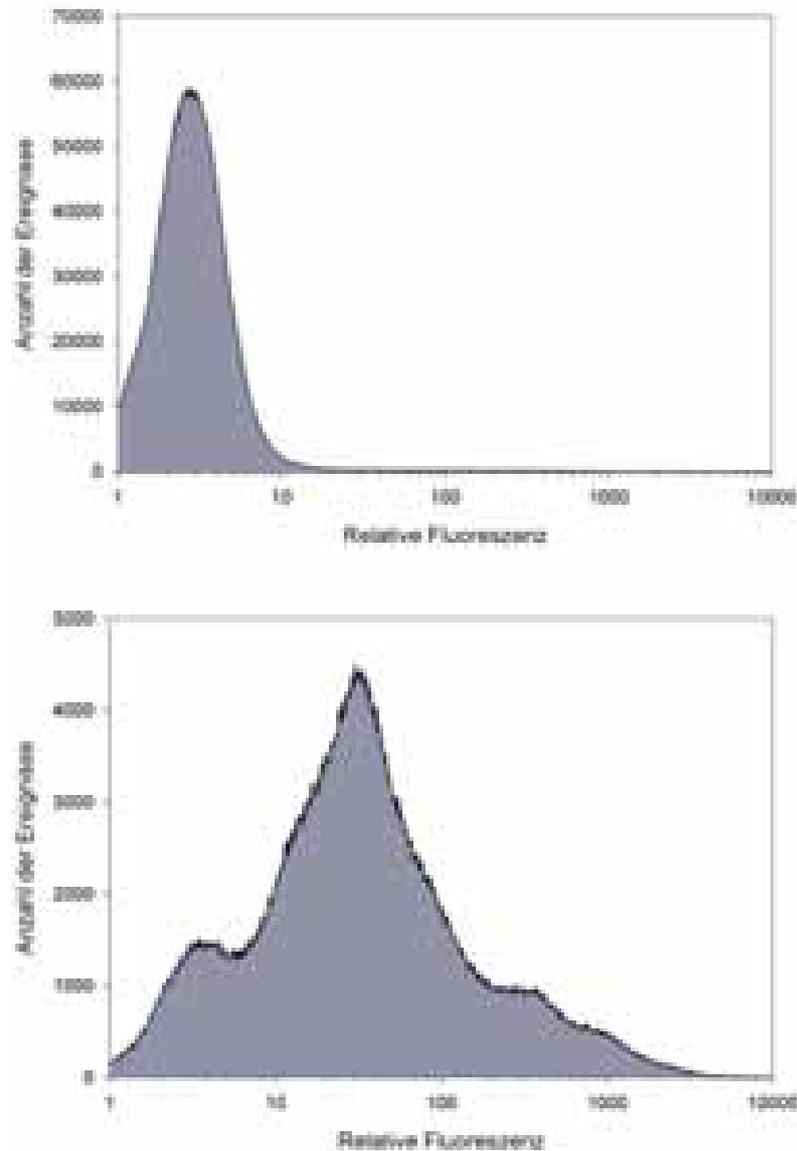


Abb. 4.6 Oben: Durchflußcytometrisches Histogramm der Anreicherung von η -Lactamase-Epitopen. Die Bakterienbibliothek angezogen, induziert und mit anti-Ampicillinaserum, anti-Kaninchen (Biotinkonjugat)-Serum und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden Zellen, die eine relative Fluoreszenz zwischen 12 und 10.000 aufwiesen, aussortiert (FACS Parameter *sort single 1*). Daraufhin wurde die sortierte Population resortiert und mit diesen- zweifach sortierten- Zellen wurde 50 ml dYT cm²⁵ beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Unten: Durchflußcytometrisches Histogramm der zweiten Anreicherungsrunde. Die Zellen wurden wie oben induziert und fluoreszenzmarkiert. Es war eine deutliche Zunahme von Ereignissen mit einer erhöhten relativen Fluoreszenz gegenüber der 1. Runde feststellbar. Zellen, die eine relative Fluoreszenz zwischen 12 und 10.000 aufwiesen, wurden aussortiert. Anschließend wurden so sortierte Bakterien einzeln in Mikrotiterplatten mit 100 μ l Selektivmedium pro *well* abgelegt (FACS Parameter *sort single 1*).

Mit den sortierten Zellen wurden 50 ml dYT Cm²⁵ beimpft und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Ausgehend von dieser Kultur wurde am nächsten Tag eine frische Kultur angesetzt und diese induziert. Die induzierten Zellen wurden erneut mit anti-Ampicillinase Serum, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert sowie anschließend im Durchflußcytometer analysiert (s. Abb. 4.6 unten). Es war eine deutliche Anreicherung von positiven Zellen gegenüber den unselektierten feststellbar. Ereignisse, die eine relative Fluoreszenz zwischen 12 und 10.000 aufwiesen, wurden sortiert und einzeln in 96-well Mikrotiterplatten (100 µl dYT Cm²⁵/well) abgelegt.

Von den isolierten Klonen wurden 20 induziert, fluoreszenzmarkiert (s.o.) und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Von 16 positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA präpariert und unter Verwendung des IRD-800 markierten Oligonukleotids Etag-seq_up sequenziert. Insgesamt wurden 9 unterschiedliche Klone identifiziert (s. Abb. 4.7). Alle sequenzierten Klone enthielten ein *bla*-Fragment und bei allen Klonen war dieses Fragment im richtigen Leseraster (s. Tab. 4.1). Die DNA-Sequenzen sind im Anhang 7.1 aufgeführt.

Klon	aa-Position	Aminosäuresequenz
Bla_1	23-38	AHPETLVKVKDAEDQL
Bla_2	55-64	LESFRPEERF
Bla_3	55-69	LESFRPEERFPMMST
Bla_4	103-116	VEYSPVTEKHLTDGMT
Bla_5	158-166	TRLDRWEPE
Bla_6	204-215	QLIDWMMEADKVA
Bla_7	210-225	EADKVAGPLLRALPA
Bla_8	222-230	ALPAGWFIA
Bla_9	266-281	TMDERNRQIAEIGASL

Tab. 4.1: Kodierte Aminosäuresequenzen der sequenzierten *bla* Genfragmente. Die Länge der kodierten Epitope beträgt zwischen 9 und 16 Aminosäuren (kloniert wurden DNA-Fragmente zwischen 20 und 40 bp). Die Aminosäureposition bezieht die bei der Translokation ins Periplasma proteolytisch prozessierte Signalsequenz mit ein.

Die Sequenzen der Klone Bla_2 und Bla_3 überlappen (Bla_2 ist Teilsequenz von Bla_3, vergl. Tab. 4.1 und Abb. 4.7). Es ist durchaus wahrscheinlich, dass es sich dabei um das gleiche Epitop handelt. Die Sequenzen der Klone Bla_6 und Bla_8 überlappen mit der Sequenz des Klons Bla_7. Die Überlappung beträgt aber nur 6 bzw. 4 Aminosäuren. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um verschiedene Epitope handelt. Bei Betrachtung der Lage in der primären Aminosäuresequenz der η -Lactamase fiel auf, dass die gefundenen Fragmente über das gesamte Protein verteilt sind (s. Abb. 4.7 A). Eine Häufung an den Termini oder anderen Bereichen war nicht erkennbar. Da die Herstellerfirma des Serums zum Zeitpunkt der Experimente nicht mehr existierte, ließ sich nicht mehr klären, wie dieses Serum erzeugt wurde. Eine Immunisierung mit einem einzelnen kurzen Peptid scheidet mit Sicherheit aus. Wahrscheinlich erfolgte eine Immunisierung mit dem vollständigen Protein.

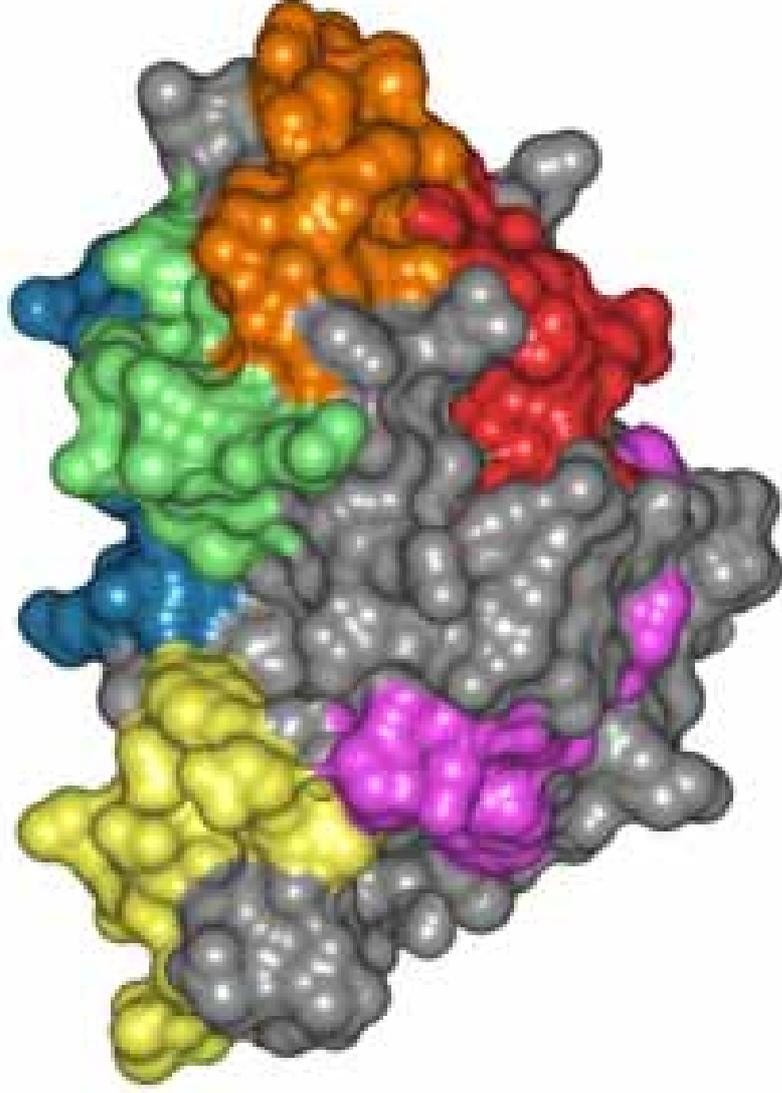
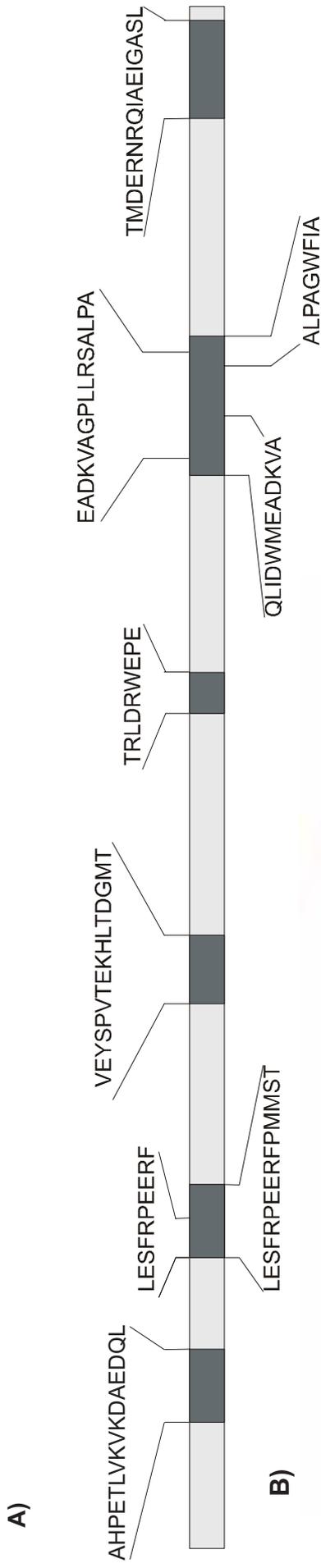


Abb. 4.7: Gefundene η -Lactamase Epitope.
 A) Eindimensionale Struktur (schematisch) der η -Lactamase. Die identifizierten Epitope sind dunkel unterlegt und die Aminosäuresequenz ist jeweils angegeben. Es wurden 9 unterschiedliche Sequenzen erhalten, von denen zwei das gleiche Epitop darstellen (LESFRPEERF und LESFRPEERFMMST).
 B) Dreidimensionale Struktur der η -Lactamase-Moleküloberfläche. Ausgehend von der Kristallstruktur (PDB Eintrag 1_M40BLA) wurde unter Verwendung des InsightII Software Packets die Moleküloberfläche berechnet (Conolly Surface, *Probe Radius* 1,4). Die Oberflächenteile, die von Aminosäuren aus dem Bereich der kartierten Epitope gebildet werden, sind farblich hervorgehoben: Bla_1 (orange), Bla_2 und 3 (rot), Bla_4 (gelb), Bla_5 (violett), Bla_6, 7 und 8 (blau) und Bla_9 (grün).

Bei Betrachtung der Tertiärstruktur des Enzyms fällt auf, dass alle Epitope an der Moleküloberfläche liegen (s. Abb. 4.7). Kein isoliertes Peptid liegt im Faltungskern verborgen. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass alle Paratope der betreffenden Antikörper mit dem nativen Protein interagieren können. Dies ist nicht selbstverständlich, da auch Fragmente aus dem Faltungskern auf MHCs präsentiert werden und die entsprechenden Antikörper aktivieren.

Dieses Experiment zeigte, dass sich die intimvermittelte Zelloberflächenpräsentation von Peptiden zur Identifizierung und Charakterisierung von Antikörper-Antigen Wechselwirkungen eignet. Es stellte den ersten Nachweis, dass durch die Präsentation von Peptiden auf dem Intiminsockel Bindungspartner identifiziert werden können. Es wurden 7 η -Lactamase Epitope isoliert, deren Peptidsequenz indirekt durch Sequenzierung der kodierenden DNA bestimmt wurde.

4.1.3 Kartierung von CSFV-E^{ms} Epitopen

Ziel der im folgenden beschriebenen Experimente war, in Zusammenarbeit mit der Bundesforschungsanstalt für Viruserkrankungen der Tiere, Epitope des Schweinepestvirus (CSFV *classical swine fever virus*) zu identifizieren. Dazu wurden von der Bundesforschungsanstalt verschiedene monoklonale Antikörper, die gegen das Hüllprotein E^{ms} gerichtet waren, sowie ein polyklonales Kaninchenserum gegen das gleiche Protein zur Verfügung gestellt. Die Epitope der Antikörper waren nicht bekannt. Die Kenntnis über solche Epitope können für diagnostische Zwecke sehr wichtig sein. Insbesondere sind sie dann interessant, wenn man mit den Antikörpern verschiedene Virenstämme unterscheiden kann.

4.1.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen zum CSF-Virus

Der Verursacher der Schweinepest, der CSF-Virus (*classical swine fever virus* oder auch *hog cholera virus*, CSFV) gehört zum Genus der Pestiviren. Zu diesem Genus zählen zudem der BVD-Virus (*bovine viral diarrhoea virus*, BVDV) und der BD-Virus (*Border disease virus*, BDV). Ursprünglich wurden die Pestiviren zu den Tongaviridae klassifiziert (Westaway *et al.*, 1985). Genauere Untersuchungen bezüglich der Genomorganisation und der Expression führten dann aber zur Reklassifizierung in die Familie der Flaviviridae (Wengler *et al.*, 1995). Die Familie der Flaviviridae enthielt bis dahin nur den Genus Flavivirus. Heute werden zusätzlich die Pestiviren und der *Hepatitis C-like virus* (HCV) hinzugezählt (Wengler *et al.*, 1995). Die Viren erreichen in Zellkultur nur moderate Titer, wodurch eine Reinigung sehr erschwert wird (Rümenapf *et al.*, 1991). Die Virenpartikel besitzen einen Durchmesser zwischen 40 und 60 nm (Moenning und Plagemann, 1992) und bestehen aus der kodierenden RNA, einem Nukleocapsid, und einer aus drei Glycoproteinen zusammengesetzten Virushülle (Thiel *et al.*, 1991).

Allen drei Vertretern der Pestiviren ist gemein, dass sie zwei Biotypen ausbilden können. Man unterscheidet zwischen der cytopathogenen und der nicht cytopathogenen Form. Die Viren können bei einem infizierten trächtigen Tier über die Plazenta den Embryo befallen (Thiel *et al.* 1996). Demgegenüber stellt die Plazenta von Wiederkäuern und Schweinen eine Barriere für Antikörper des schwangeren Tieres da. Solche intrauterinen Infektionen können zu Totgeburten und zu

Mißbildungen des Tieres führen. Fötusinfektionen mit nicht cytopathogenen Pestiviren können bei Rindern und anderen Wiederkäuern zu einer persistierenden Infektion des Fötuses führen, der anschließend eine Immunkompetenz erwirbt. Diese Tiere können veterinärmedizinisch unauffällig sein, bleiben aber ihr Leben lang viremisch. Bei infizierten Schweinen ist eine persistierende Infektion des Fötus spätestens nach der Geburt lethal. Infektionen von adulten Rindern mit dem BVDV verlaufen meistens unauffällig, die meisten Infektionen bleiben unerkannt (Thiel *et al.*, 1996). Auch postnatale Infektionen von Schafen mit dem BD-Virus verlaufen meistens harmlos. Demgegenüber ist die Infektion von Schweinen mit dem CSFV in der Regel sehr akut und mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden.

Alle Vertreter der Flaviviridae sind plussträngige RNA-Viren, deren Genom bis zu etwa 12.000 Nukleotide umfasst. Das Genom der Pestiviren besteht aus einer nicht kodierenden 5'-Region, daran schließt sich ein einzelner *open reading frame* (codierend für ~4000 Aminosäuren) an, gefolgt von einer nicht kodierenden 3'-Region. Das 3'-Ende ist bei allen Vertretern nicht polyadenyliert, die RNA ist aber am 5'-Ende wie Eukaryonten mRNA *gecapt*. Neuere Studien deuten daraufhin, dass die Translation der Virus-DNA *cap* unabhängig ist (Rice *et al.*, 1996). Das Polyprotein wird anschließend durch Virus- und Wirtsproteasen in 11-12 Proteine prozessiert.

Von allen Vertretern der Pestiviren verursacht der CSFV den größten ökonomischen Schaden (eine Übersicht über die verursachten Schäden findet sich in Edwards *et al.*, 2000). Schweine können zwar von allen Pestiviren infiziert werden (Patton *et al.*, 1992, Terpstra und Wensvoort, 1988), jedoch verursacht nur der CSFV schwere und in der heutigen Massentierhaltung oft fatale Erkrankungen. Aus diesen Gründen werden in einigen Teilen der Welt Schweine mit abgeschwächten Lebendimpfstoffen behandelt. Eine Impfung mit solchen Lebendviren ist in den Staaten der Europäischen Gemeinschaft nicht zugelassen. Dies liegt daran, dass die Lebendimpfstoffe serologisch nicht von echten Infektionen unterschieden werden können. Die derzeitige Strategie der EU sieht als hauptsächliche Bekämpfungsmethode des CSFV lediglich die Keulung aller Schweine auf Höfen mit einem infizierten Tier vor. Diese Strategie führte zur Tötung von mehr als 10 Millionen Schweinen während der großen Epidemie 1997/1998 in den Niederlanden. Der ökonomische Schaden betrug mehr als zwei Mrd. US Dollar (Pluimers *et al.*, 1999). Folgerichtig wäre die Entwicklung eines Impfstoffs, bei dem sich die geimpften Tiere serologisch von den infizierten unterscheiden, von großem Vorteil (Langgedijk *et al.*, 1999). Der CSFV unterteilt sich in die Autoprotease N^{pro}, das Nukleokapsidprotein C, die Hüllproteine E^{ms}, E1, E2 und die nicht Strukturproteine p7, NS 2-3, NS 4A, NS 4B, NS 5A und NS 5B (Meyers und Thiel, 1996). Das Glycoprotein E^{ms} kommt innerhalb der Flaviviridae nur bei den Pestiviren vor. Elektronenmikroskopische Studien haben gezeigt, dass sich die Glycoproteine E^{ms} und E2 auf der Virenoberfläche befinden (Weiland *et al.*, 1992). Sowohl E^{ms} als auch E2 sind in der Lage, virusneutralisierende Antikörper zu induzieren (Bruschke *et al.*, 1997, König *et al.*, 1995). Folgerichtig wäre die Impfung mit einem der beiden Glycoproteine eine gute Lösung, das andere Glycoprotein könnte dann als serologischer Marker zur Unterscheidung von echten Infektionen dienen. Ein solcher Ansatz wird als *DIVA*-Vakzin (*D*ifferentiating *I*nfected from *V*accinated *i*ndividuals) bezeichnet (van Oirschot,

1999). Allerdings ist auch die Unterscheidung nach einer DIVA-Vakzinierung alles andere als trivial, denn die Tests müssen CSFV-spezifisch sein. Da Schweine auch von allen anderen Pestiviren, ohne nennenswerte Auswirkungen (s.o.), infiziert werden können, muß zwischen einer Infektion mit dem CSFV oder dem BVDV/BDV unterschieden werden. Alle Pestiviren sind hoch homolog. Daher ist eine Kreuzreaktion der Antikörper bei Tests mit dem vollständigen Markerprotein unausweichlich. Für den Aufbau solcher Tests sind genaueste Informationen über die Beschaffenheit der CSFV-Epitope unabdingbar, da sonst BVDV/BDV infizierte Schweine durch Kreuzreaktion der Antikörper positiv ausfallen.

4.1.3.2 Konstruktion und Durchmusterung einer CSFV-E^{ms} Peptidbibliothek

Es sollten Peptidfragmente gefunden werden, die entweder von einem polyklonalen anti-CSFV-E^{ms} Kaninchenserum oder von einem von insgesamt 11 unterschiedlichen monoklonalen Maus Antikörpern erkannt werden. Die Vorgehensweise der Bibliothekserstellung war analog zur Abb. 4.1. Das CSFV-E^{ms} Gen wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide CSFV_up und CSFV_lo aus dem Plasmid p1219H (Christmann *et al.*, 2001) amplifiziert. Dadurch entstand das 678 bp lange CSFV-E^{ms} DNA Fragment des CSF-Viruses Stamm Alfort Tübingen (*GenBank accession* Nr. J04358, Nukleotide 1176 bis 1854). Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels NucleotrapCR gereinigt. Daraufhin erfolgte der DnaseI Verdau. Dazu wurden je 4 Ansätze a 6,75 μ g DNA mit unterschiedlichen Mengen an DNase I verdaut. Der Ansatz 1 wurde mit 18 mU, der Ansatz 2 mit 27 mU, der Ansatz 3 mit 36 mU und der Ansatz 4 wurde mit 180 mU DNase I verdaut. Die Spaltung erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 mM EDTA pH 8,0 (Endkonzentration 50 mM) abgestoppt. Daraufhin wurden die Fragmente zur Größenselektion auf ein Acrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Es wurden Fragmente der Größe 20-40 bp und 40-100 bp aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Elution der Fragmente wurden die Gelstücke für 12 Stunden in TBE Puffer bei 50 °C über Nacht inkubiert. Der Überstand, der dann die DNA Fragmente enthielt, wurde Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend wurde die DNA mit Ethanol aus der Lösung gefällt. Daraufhin wurden überhängende Enden mit T4-DNA Polymerase aufgefüllt bzw. abgebaut. Die so erhaltenen Fragmente waren vorbereitet für die Anligation der zwei Adaptormoleküle *Ava*I-Adaptor, resultierend aus der Hybridisierung der Oligonukleotide *Ava*I-adaptor_up/*Ava*I-Adaptor_lo und *Bam*HI-Adaptor, resultierend aus der Hybridisierung der Oligonukleotide *Bam*HI-Adaptor_up/*Bam*HI-Adaptor_lo (vergl. Abb. 4.2). Es wurden je 660 ng DNA mit einem 2,5 fach molaren Überschuß an Adaptormolekülen ligiert. Die Ligation mit den Adaptoren erfolgte für 16 Stunden bei 15 °C. Die Ligation wurde anschließend erneut über ein Acrylamidgel gereinigt (12,5 %). Dies war notwendig, um die im Überschuß vorhandenen Adaptoren und Adaptordimere abzutrennen. Die DNA wurde erneut durch Diffusion bei 50 °C aus den Gelstücken eluiert und anschließend in den *Ava*I/*Bam*HI gespaltenen Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 ligiert. Mit den so erhaltenen Plasmiden wurden DH5 ζ Zellen (Hanahan, 1983) mittels Elektroporation transformiert. Insgesamt wurden bei der Klonierung der 20-40 bp Fragmente $1,2 \Delta 10^5$ und bei der Klonierung der 40-100 bp Fragmente $5,2 \Delta 10^4$

unabhängige Klone erzeugt. Die Bakterienbibliothek wurde als DMSO-Kultur bei – 80 °C gelagert.

4.1.3.2.1 *Isolierung von CSFV-E^{ms} Peptid-Fragmenten, die mit monoklonalen Antikörpern interagieren*

Zuerst sollten Epitope, die von monoklonalen Antikörpern erkannt werden, aus den CSFV-E^{ms} Fragmentbibliotheken isoliert werden. Insgesamt standen 11 verschiedene Antikörper zur Verfügung: #1c6-2-14, #1d13-15, #1d29-16, #1d42-17, #1b5-18, #1b11-19, #4d20-20, #4b6-21, #b4-22, #1b43 und #24/16 (Kosmidou *et al.*, 1995, Weiland *et al.*, 1992). Um zu testen, ob in den beiden E^{ms} Bibliotheken Peptidfragmente enthalten waren, die mit den oben genannten monoklonalen Antikörpern interagieren, wurden die beiden Bibliotheken angeimpft und induziert. Anschließend wurden je 200 µl der induzierten Kultur mit dem jeweiligen monoklonalen Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Die markierten Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Es konnten lediglich bei zwei der elf monoklonalen Antikörper fluoreszierende Zellen in dem Gemisch festgestellt werden. Dabei handelte es sich um die monoklonalen Antikörper #24/16 und #b4-22.

Um Klone zu isolieren, die ein Peptid präsentieren, welches mit dem monoklonalen Antikörper 24/16 interagiert, wurde die Bakterienbibliothek (Fragmentgröße 40-100 bp) angeimpft und wie oben fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden die so markierten Zellen im Durchflußcytometer vermessen und fluoreszierende Zellen aussortiert (s. Abb. 4.8). Die aussortierten Zellen wurden resortiert und anschließend plattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen von den Platten geschwemmt, überimpft und induziert. Die so induzierten Zellen wurden erneut mit dem Antikörper #24/16, dem anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden die fluoreszenzmarkierten Bakterien im Durchflußcytometer vermessen und erneut sortiert (s. Abb. 4.8). Es konnte eine deutliche Anreicherung fluoreszierender Zellen gegenüber der ersten Runde festgestellt werden. Die sortierten Zellen wurden anschließend resortiert und plattiert. Anschließend wurden Einzelklone induziert und mit dem monoklonalen Antikörper #24/16 markiert (s.o.). Von 10 Klonen, die ein Peptid präsentierten, das von dem Antikörper erkannt wurde, wurde die Plasmid-DNA präpariert und mit dem Oligonukleotid Etag-seq_up (5'-IRD 800) sequenziert. Es wurden 9 unterschiedliche Sequenzen erhalten, ein Klon wurde zweimal gefunden. Die erhaltenen Sequenzen waren alle im korrekten Leseraster und überlappten miteinander (s. Abb. 4.10). Dem monoklonalen Antikörper konnte somit ein eindeutiges Epitop zugewiesen werden (Peptidsequenz: CRYDKNTDVNVV).

Die Isolierung von Peptiden, die mit dem monoklonalen Antikörper #b4-22 interagierten, erfolgte ähnlich wie bei der Isolierung des #24/16 Epitops. Es wurde bei dieser Anreicherung lediglich auf das Anwachsen der Zellen auf Platte nach der Resortierung von Runde 1 verzichtet. Anstelle dessen wurden die positiven Zellen ein zweites Mal resortiert und anschließend plattiert (s. Abb. 4.9). Von dieser Sortierung wurden dann wie bei der ersten Anreicherung Einzelklone auf ihre Eigenschaft, mit dem Antikörper #b4-22 zu interagieren, getestet.

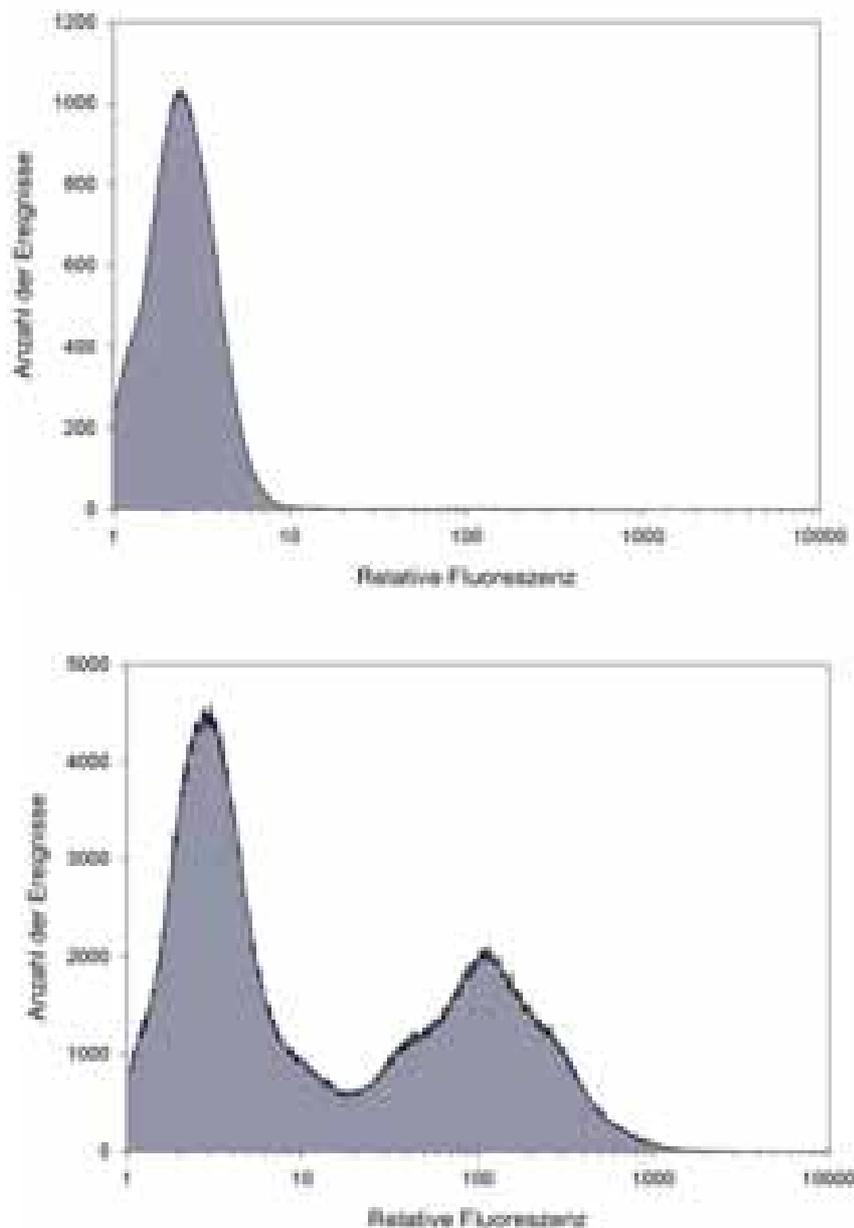


Abb. 4.8: Durchflußcytometrische Analyse CSFV-E^{ms} Bibliothek (Fragmente 40-100 bp) und Sortierung von Bakterien, die mit dem monoklonalen Antikörper #24/16 markiert wurden. Oben: Die Bakterienbibliothek wurde angezogen, induziert und mit #24/16, anti-Maus (Biotinkonjugat)-Serum und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden Zellen, die eine relative Fluoreszenz zwischen 12-10.000 aufwiesen, aussortiert (FACS Parameter *sort single 1*). Daraufhin wurde die sortierte Population resortiert und plattiert. Unten: 2. Runde. Die Zellen wurden wie oben induziert und fluoreszenzmarkiert. Zellen, die eine relative Fluoreszenz zwischen 12-10.000 aufwiesen, wurden aussortiert. Anschließend wurden die so sortierten Bakterien plattiert.

Von 5 positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und unter Verwendung des Oligonukleotids Etag-seq_up sequenziert. Alle Sequenzen waren unterschiedlich, im korrekten Leseraster und überlappten miteinander (s. Abb. 4.10). Dem monoklonalen Antikörper #b-22 konnte somit ebenfalls ein eindeutiges Epitop zugewiesen werden (Peptidsequenz: YDKNTDVNVV).

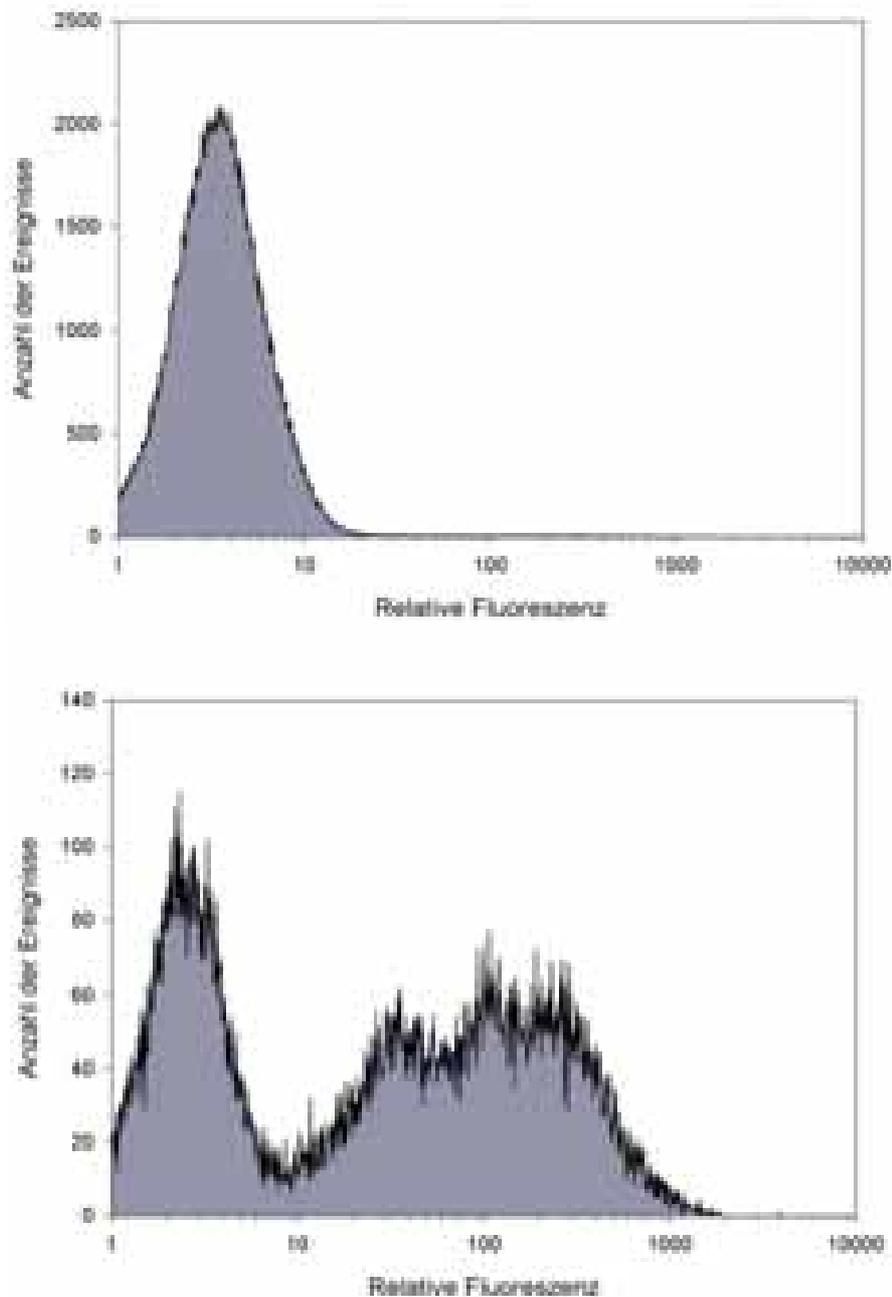
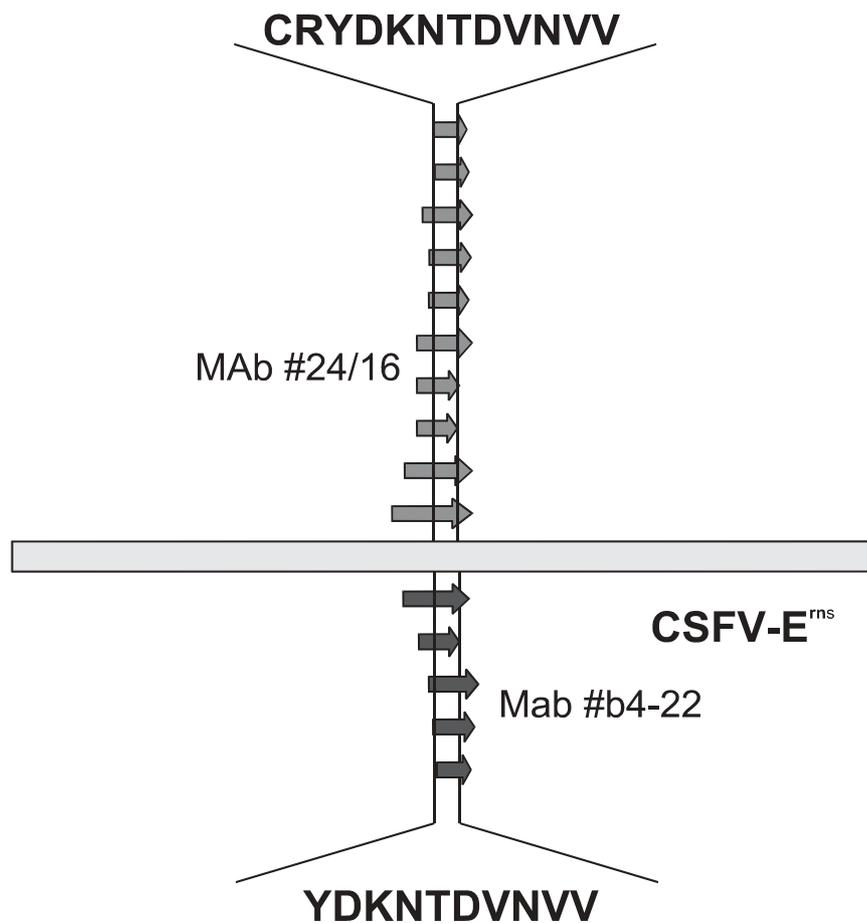


Abb. 4.9: Durchflußcytometrische Analyse CSFV-E^{ms} Bibliothek (Fragmente 40-100 bp) und Sortierung von Bakterien, die mit dem monoklonalen Antikörper #b4-22 markiert wurden. Oben: Die Bakterienbibliothek wurde angezogen, induziert und mit #b4-22, anti-Maus-Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden Zellen, die eine relative Fluoreszenz zwischen 12-10.000 aufwiesen, aussortiert (FACS Parameter *sort single 1*). Unten: Nach der Sortierung wurde die angereicherte Population resortiert und dann ein zweites Mal resortiert.



Peptidsequenzen MAb #24/16

24/16_1	T CRYDKNTDVNVV T Q A
24/16_2	AV T CRYDKNTDVNVV T Q A R
24/16_3	V T CRYDKNTDVNVV T Q A
24/16_4	TEGPPDKECAV T CRYDKNTDVNVV T Q A R
24/16_5	PPDKECAV T CRYDKNTDVNV V
24/16_6	CRYDKNTDVNVV <u>T</u> Q
24/16_7	PDKECAV T CRYDKNTDVNVV T Q A R N
24/16_8	CRYDKNTDVNVV T Q A R N R P T T
24/16_9	PPDKECAV T CRYDKNTDVNV V
24/16_10	N R T Q T N L T E G P P D K E C A V T CRYDKNTDVNVV T Q A

Peptidsequenzen MAb #b4-22

b4-22_1	TEGPPDKECAV T CR Y DKNTDVNVV T Q A R
b4-22_2	CRYDKNTDVNVV T Q A R N R
b4-22_3	PDKECAV T CR Y DKNTDVNV V
b4-22_4	YDKNTDVNVV T Q A R N
b4-22_5	V T CR Y DKNTDVNVV T Q A R N R

Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Peptidfragmente, die von den beiden monoklonalen Antikörpern erkannt werden (oben), sowie ein Sequenzalignment der gefundenen Aminosäuresequenzen (unten). Die vollständigen DNA-Sequenzen sind im Anhang 7.2 angegeben. Das letzte Valin der identischen Klone 24/16_5 und 24/16_8 (unterstrichen) wird nicht vom *csfv*-Gen, sondern vom Vektor kodiert. Die minimale Überlappungssequenz ist durch Fettdruck hervorgehoben.

Aus der Abb. 4.10 geht hervor, dass beide Antikörper die gleiche Region des CSFV-E^{ms} Proteins erkennen. Dennoch handelte es sich um zwei unabhängige Antikörper. Das Epitop des monoklonalen Antikörpers #24/16 CRYDKNTDVNVV ist möglicherweise noch eine Aminosäure kürzer. Das letzte Valin wird beim Klon 24/16_5 und dem identischen Klon 24/16_8 nicht vom *csfv*-Gen kodiert, sondern durch die ersten beiden Basen des *Bam*HI-Adaptors (TA) zum Valincodon GTA vervollständigt. Im Gen wird dieses Valin durch ein GTC kodiert (vergl. DNA-Sequenz Anhang 7.2.2).

Die Länge der gefundenen DNA-Fragmente betrug zwischen 43 und 102 bp (vergl. Anhang 7.2), was mit der gewünschten Länge bei der Klonierung von 40 bis 100 bp übereinstimmt. Es wurden keine Klone isoliert, die Fragmente im falschen Leseraster hatten. Dies ist nicht selbstverständlich, da die Bibliothek immerhin mehr als $5 \Delta 10^5$ Klone umfasste. Von diesen Klonen sind, sofern man von Sequenzunabhängigkeit der DNaseI bei der Fragmentierung ausgeht, nur 1/6 im korrekten Leseraster. Es wäre durchaus plausibel anzunehmen, dass Klone Peptide präsentieren, die mit dem anti-Maus-Serum (Biotinkonjugat) kreuzreagieren und somit bei der Markierung der Zellen fluoreszenzmarkiert worden wären. Solche Klone wurden bei der Analyse der Einzelklone nicht gefunden.

Die Epitope von zwei monoklonalen Antikörpern konnten durch relativ wenige Anreicherungsrounds und durch vergleichsweise wenige Sequenzen sehr gut eingegrenzt werden. Die anderen 9 Antikörper konnten nicht kartiert werden, da ihre Epitope nicht in der Bibliothek vertreten waren. Durch die Art der Bibliothek ist die Suche nach Epitopen auf lineare Peptidsequenzen beschränkt. Es ist durchaus möglich, dass die restlichen Antikörper konformationelle Epitope aus Bereichen, die in der Primärsequenz weit auseinanderliegen, erkennen. Da das CSFV-E^{ms} ein Glycoprotein ist, ist es ebenso möglich, dass die anderen monoklonalen Antikörper Zuckerreste in ihrer Erkennungssignatur haben. Die präsentierten Peptide werden von *E. coli* nicht glycosyliert und somit können die Epitope solcher Antikörper nicht kartiert werden. Demgegenüber scheint es sehr unwahrscheinlich, dass die Antikörper unglycosylierte lineare Peptide erkennen und diese nicht in der Bibliothek vorhanden sind. Von den 15 sequenzierten Klonen, die mit den beiden monoklonalen Antikörpern interagierten, hatten 13 eine unterschiedliche Sequenz. Es gibt zumindest in der Proteinregion, die von den beiden Antikörpern erkannt wird, eine hohe unabhängige Abdeckung der Fragmente. Sofern man von einer Gleichverteilung der DNA-Fragmente bei der Erzeugung der Bibliothek ausgeht, d.h. würde keine nennenswerte Verschiebung bei dem DNase-Verdau, der Ligation und der Transformation stattfinden, so sollten alle linearen Epitope in der Bibliothek vorhanden und isolierbar sein.

4.1.3.2.2 *Isolierung von CSFV-E^{ms} Peptid-Fragmenten, die mit einem polyklonalen Kaninchenserum interagieren*

Um weitere Epitope des CSFV-E^{ms} Proteins zu kartieren, stand in geringer Menge auch ein polyklonales Kaninchenserum zur Verfügung. Dieses sollte dazu dienen, zusätzliche Epitope des Strukturproteins zu kartieren. Die Vorgehensweise war dabei analog zur Kartierung der beiden monoklonalen Antikörper #b4-22 und #24/16. Lediglich wurde die Anreicherung mit der Bibliothek, die die kürzeren Fragmente (20-40 bp) enthielt, durchgeführt. Die CSFV-E^{ms} Bibliothek (Fragmentlänge 20-40 bp)

wurde angeimpft und induziert. Anschließend wurden die Zellen mit dem anti-CSFV-E^{ms} Serum, anti-Kaninchen-Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Alle Bakterienzellen wurden von dem Serum erkannt. Schon aus statistischen Gründen ist dies aber nicht möglich, da nur 1/6 aller in der Bibliothek vorhandenen Bakterien ein CSFV-E^{ms} Peptidfragment präsentieren konnten. Das polyklonale Serum war zuvor nicht affinitätsgereinigt. Somit war es sehr wahrscheinlich, dass viele *E. coli* Antikörper, bedingt durch eine Bakterieninfektion des Kaninchens vor der Immunisierung mit dem CSFV-E^{ms}, in dem Serum vorhanden waren.

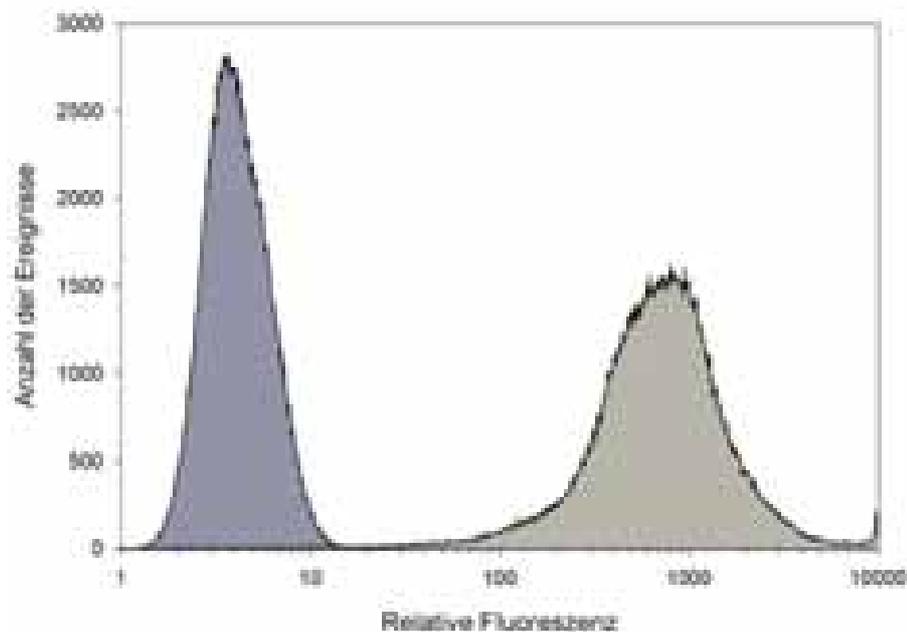


Abb. 4.11: Durchflußcytometer Histogramm von DH5 ζ Zellen markiert mit ungereinigtem anti-CSFV-E^{ms}-Serum (helle Kurve) und mit gereinigtem (dunkle Kurve). Es ist deutlich zu erkennen, dass das ungereinigte Serum viele *E. coli* Oberflächenantigene erkennt, diese Antikörper sind nach der Reinigung nicht mehr in dem Serum vorhanden.

Um zu überprüfen ob anti *E. coli* Antikörper in dem Serum vorhanden waren, wurden DH5 ζ Zellen, die kein Plasmid enthielten, mit dem anti-CSFV-E^{ms}-Serum, dem anti-Kaninchen-Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert. Auch diese Zellen fluoreszierten nach der Markierung (s. Abb. 4.11). Es war also notwendig, die anti-*E. coli* Antikörper aus dem Serum zu entfernen. Da es aus Gründen der biologischen Sicherheit nicht möglich war, eine Affinitätsreinigung mit dem gereinigten CSFV-E^{ms} Protein durchzuführen (eine Produktion des Proteins durfte aus Gründen der biologischen Sicherheit in unserem Labor nicht durchgeführt werden), wurde die umgekehrte Strategie verfolgt. Aus einer DH5 ζ Übernachtskultur wurden 8 ml Zellen pelletiert, anschließend in 60 μ l des Serums resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Antikörper, die die DH5 ζ Zellen erkennen, sollten an diese binden. Durch Zentrifugation der Bakterien sollten sie von den CSFV-Antikörpern, die im Überstand verbleiben, getrennt werden. Diese Reinigung wurde noch dreimal wiederholt. Nach der Reinigung waren keine Antikörper gegen die *E. coli*

Oberflächenantigene in der Lösung (s. Abb. 4.11). Das so behandelte Serum konnte für die Isolierung von CSFV-E^{ms} antigenen Determinanten verwendet werden.

Für die Anreicherung wurden die induzierten Bakterien (Fragmentgröße 20-40 bp) wie oben beschrieben mit dem gereinigten Serum fluoreszenzmarkiert, im Durchflußcytometer analysiert und anschließend sortiert (s. Abb. 4.12).

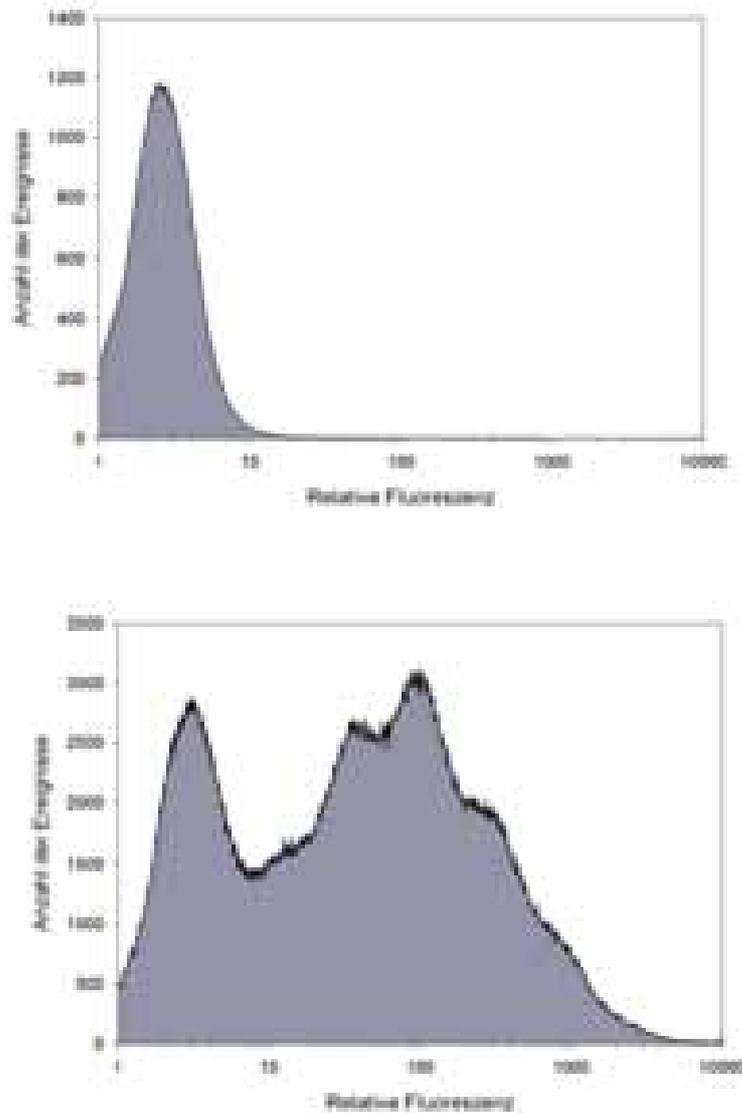


Abb. 4.12: Durchflußcytometrische Histogramme von der Anreicherung mit dem polyklonalen anti-CSFV-E^{ms} Serum. Oben: Die Bakterienbibliothek wurde angezogen, induziert und mit dem Serum, anti-Kaninchen-Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden Zellen, die eine relative Fluoreszenz zwischen 12 und 10.000 aufwiesen, aussortiert (FACS Parameter *sort single 1*). Daraufhin wurde die sortierte Population resortiert und dann plattiert. Unten: 2. Runde. Die Zellen wurden wie oben induziert und fluoreszenzmarkiert. Zellen, die eine relative Fluoreszenz zwischen 12 und 10.000 aufwiesen, wurden aussortiert. Anschließend wurden so sortierte Bakterien plattiert.

Danach wurde die aussortierte Population resortiert und anschließend plattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien von den Platten abgeschwemmt, neu angeimpft, induziert und wie oben fluoreszenzmarkiert. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden im Durchflußcytometer analysiert (s. Abb. 4.12). Es wurde eine deutliche Anreicherung von Ereignissen einer höheren relativen Fluoreszenz gegenüber der ersten Runde festgestellt. Somit war die Anreicherung erfolgreich. Anschließend wurden die fluoreszierenden Zellen aussortiert und daraufhin plattiert. Einzelklone der 2. Anreicherungsrunde wurden angeimpft, induziert und mit dem anti-CSFV-Serum, dem anti-Kaninchen-Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Als Kontrolle wurden diese Zellen auch nur mit dem anti-Kaninchen-Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert. Keiner der Klone reagierte allein mit dem anti-Kaninchen-Serum. Eine Anreicherung von Epitopen, die mit diesem Serum eine Kreuzreaktion eingehen, hatte nicht stattgefunden. Von positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA präpariert und sequenziert. Es stellte sich heraus, dass fast alle analysierten Klone das gleiche Epitop präsentierten (s. Abb. 4.13). Lediglich zwei weitere Epitope konnten identifiziert werden.

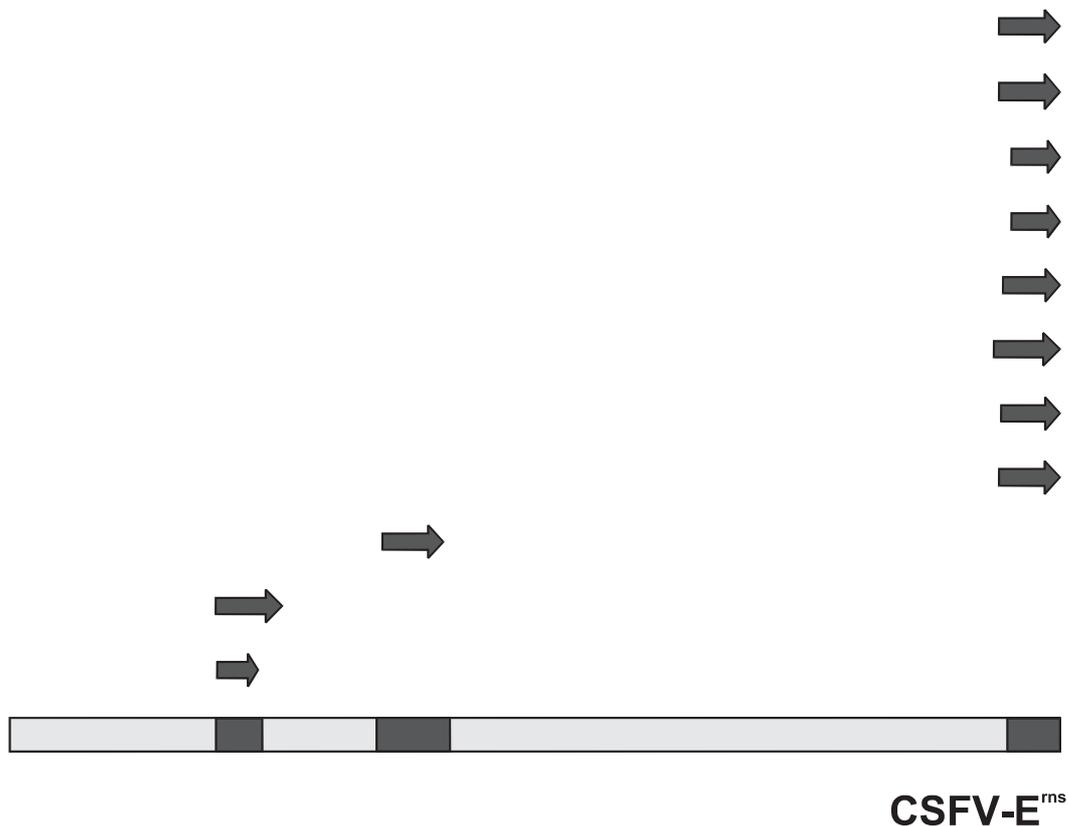


Abb. 4.13: Schematische Darstellung des CSFV-E^{ms} und der gefundenen Epitope. Es wurden insgesamt 3 unterschiedliche Epitope gefunden (dunkel hervorgehoben), jeder Pfeil symbolisiert eine Peptidsequenz, von links nach Rechts: LATDTL, YNIDPWIQ, TWFGAYA). Die DNA-Sequenzen sind im Anhang 7.2.3 aufgeführt. Von den 11 positiven Klonen repräsentierten 8 den C-Terminus des Proteins. Drei Klone konnten identifiziert werden, die einen anderen Proteinabschnitt repräsentierten. Von diesen dreien überlappten zwei in ihrer Sequenz.

Die Abbildung 4.13 verdeutlicht, dass Klone, die die C-terminale Region des CSFV-E^{ms} auf ihrer Oberfläche präsentierten, nach dieser Anreicherung deutlich überrepräsentiert waren. Dies deutet darauf hin, dass dieser Teil des Proteins gegenüber dem Rest stärker immunogen ist. Dies ist nicht verwunderlich, da gerade die Termini von Proteinen sehr häufig eine höhere Flexibilität aufweisen und für Proteasen des Immunsystems leichter angreifbar sind. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Anreicherung, wie sie hier durchgeführt wurde, einem *bias* unterworfen war. Das Protein, mit dem immunisiert wurde, stammte aus einer Baculovirus-Expressionskultur. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass viele Antikörper aus dem Serum auch Teile der Glycosylierung erkennen. Solche Antikörper können durch bakterielle Oberflächenpräsentation nicht kartiert werden. Es ist also durchaus denkbar, dass die hauptantigene Determinante des Proteins nicht der C-Terminus ist sondern ein glycosylierter Teil des Proteins. Betrachtet man aber rein peptidische Epitope, die man mit der angewandten Methodik kartieren kann, so ist die Konzentration von Antikörpern, die den C-Terminus des Proteins erkennen, am höchsten. Es scheint folgerichtig, dass diese Region im Kaninchenmodell die hauptantigene Determinante des gesamten Proteins, bezogen auf rein peptidische Abschnitte, ist.

Um sicherzustellen, dass die besondere Dominanz des C-Terminus nicht durch einen Zufall bei der Anreicherung zustande kam, wurde die Isolation ein zweites Mal wiederholt. Es wurden nach der zweiten Anreicherung 8 positive Klone sequenziert. Von diesen 8 präsentierten alle das C-terminale Fragment. Es wurde kein neues Epitop gefunden. Somit wurden insgesamt 19 positive Klone sequenziert, von denen 16 das C-Terminale Peptid auf ihrer Oberfläche präsentierten. Lediglich drei andere Klone wurden gefunden. Ob damit tatsächlich alle linearen peptidischen Epitope kartiert wurden, läßt sich nicht aussagen. Die starke Dominanz von Antikörpern, die den C-Terminus erkennen, könnte dafür verantwortlich sein, dass bei 19 sequenzierten Klonen aufgrund der im Verhältnis sehr niedrigen Konzentration der anderen Antikörper keine weiteren Epitope gefunden wurden.

Somit wurden insgesamt 4 lineare Peptidepitope des CSFV-E^{ms}, eins aus der Durchmusterung mit den monoklonalen Antikörpern und drei aus der Durchmusterung mit dem polyklonalen Kaninchenserum, identifiziert.

4.1.4 Isolation monospezifischer Antikörper mit epitopräsentierenden Bakterien als Reinigungsmatrix

Die vorherigen Abschnitte haben gezeigt, dass sich durch bakterielle Zelloberflächenpräsentation schnell und mit überschaubarem experimentellen Aufwand lineare Peptidepitope kartieren lassen. Für verschiedene Anwendungen wäre es wünschenswert, wenn man Antikörper, die gegen ein definiertes Epitop gerichtet sind, in Reinform hätte. Solche monospezifischen Antikörper sind in ihren Eigenschaften monoklonalen Antikörpern sehr ähnlich. Interessant wäre, wenn man die wie oben beschrieben isolierten epitopräsentierenden Bakterien direkt als Adsorptionsmatrix für die Isolation von monospezifischen Antikörpern benutzen könnte. Um die Funktionalität von Bakterien als Affinitätsmatrix für die Isolation von Antikörpern zu untersuchen, wurde ein Klon, der das C-terminale Fragment

TWFGAYA (Ser66_1, Anhang 7.2.3) im Sequenzkontext des Intimings enthielt, angeimpft und induziert. Anschließend wurden 20 ml dieser Kultur pelletiert. Die Zellen wurden dann in dem polyklonalen anti-CSFV-E^{ms} Serum resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die über das C-terminale TWFGAYA Fragment an die Zellen gebundenen Antikörper wurden durch Resuspendieren der Bakterien in 100 µl Glycin-Puffer (200 mM Glycin, 140 mM NaCl, pH 2.0) während einer 45 minütigen Inkubation auf Eis von der Zelloberfläche abgelöst. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand, der die monospezifischen Antikörper enthielt, wurde durch Zugabe von 25 µl 1 M Tris/HCl (pH 9) neutralisiert. Um zu zeigen, dass so gereinigte Antikörper für Immunfluoreszenzuntersuchungen geeignet waren, wurden diese Antikörper zur Bundesanstalt für Viruserkrankungen der Tiere geschickt. Dort wurde mit ihnen eine Immunfluoreszenz angefertigt (die Arbeiten hat Frau Dr. Christiane Meyer durchgeführt). BHK-21 Zellen wurden mit Vaccina-Virus MVA-T7 (Wyatt *et al.*, 1995) infiziert und mit dem Vektor pKANE54 transfiziert. Dieser Vektor kodiert das E^{ms} Protein des BVDV Virus Stamm cp7 unter T7 Promotor Kontrolle. Der C-Terminus dieses BVDV-E^{ms} ist sequenzidentisch mit dem CSFV-E^{ms}. Nach 24 stündiger Infektion wurden die BHK-21 Zellen mit Aceton/Methanol (1:1 v/v) fixiert und mit dem polyklonalen Serum bzw. den gereinigten Antikörpern sowie einem polyklonalen anti-Kaninchen Antikörper (FITC Konjugat) fluoreszenzmarkiert (s. Abb. 4.14).

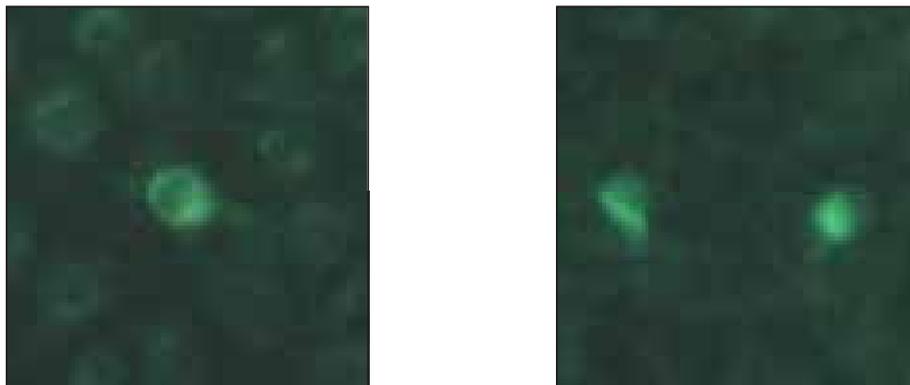


Abb. 4.14: Immunfluoreszenz von BHK-21 Zellen, die transient BVDV-E^{ms} von dem Plasmid pKANE54 produzierten. Links: Markiert mit dem polyklonalen anti-CSFV-E^{ms} Serum, rechts: Markiert mit den gereinigten monospezifischen Antikörpern (aus Christmann *et al.*, 2001).

Die Abbildung 4.14 zeigt, dass die gereinigten Antikörper noch mit ihrem Epitop, dem C-terminalen E^{ms}-Fragment, interagierten. Das gesamte BVDV-E^{ms} Protein zur Immunfluoreszenz einzusetzen, war hinsichtlich der Frage, ob es möglich ist, monospezifische Antikörper zu isolieren, etwas unglücklich. Es wurde so gezeigt, dass die Antikörper die harschen Elutionsbedingungen (200 mM Glycin, 140 mM NaCl, pH 2) ohne signifikanten Funktionsverlust überstehen, ein Reinigungseffekt konnte auf diese Weise allerdings nicht gezeigt werden. Das CSFV- und das zur Immunfluoreszenz verwendete BVDV Protein sind homolog. Im Falle, dass die Antikörper nicht selektiv an die Bakterien gebunden hätten und man wieder den gesamten Querschnitt des Serums nach der Reinigung erhalten hätte, wäre die

Immunofluoreszenz der BHK-21 Zellen (Abb. 4.14) identisch ausgefallen. Somit wurde mit diesem Experiment lediglich gezeigt, dass die Elutionsbedingungen die Funktionalität der Antikörper nicht beeinträchtigt, wenngleich starke Evidenzen darauf hindeuteten, dass die Zellen als Affinitätsmatrix zur Isolation von monospezifischen Antikörpern fungieren können. Eine unspezifische Adsorption aller Antikörper aus dem Serum an die Bakterien scheint nicht sehr wahrscheinlich, da dies erhebliche Probleme bei der Anreicherung hervorgerufen hätte. Die Kartierung der Epitope wäre nahezu unmöglich gewesen, da keine spezifische Markierung von epitopräsentierenden Zellen möglich wäre. Die Abbildungen 4.11 und 4.12 zeigen, dass eine unspezifische Adsorption bei der Markierung nicht stattgefunden hat. Dennoch bleibt der Einwand bestehen, dass nicht gezeigt wurde, dass die Antikörper monospezifisch waren. Um diese Einwände experimentell auszuräumen, stand kein weiteres Serum zur Verfügung. Daher wurde für diese Experimente auf ein anti-PMS1 Serum zurückgegriffen. Von diesem Serum, das das *S. cerevisiae* PMS1 Protein erkennt, standen in der Arbeitsgruppe ausreichende Mengen zur Verfügung. Um eine Reinigung zu zeigen, mußten mindestens zwei PMS1 Epitope, die von dem gleichen polyklonalen Serum erkannt werden, kartiert werden. Anschließend ließe sich so durch Affinitätsreinigung der monospezifischen Antikörper und wechselseitiges Markieren der epitopräsentierenden Zellen zeigen, dass die gereinigten Antikörper ausschließlich mit dem zu ihrer Isolation verwendeten Epitop reagieren.

Um die Funktionalität der Verwendung von epitopräsentierenden Zellen als Affinitätsmatrix zur Isolation von monospezifischen Antikörpern mit dem PMS1-Serum zu zeigen, mußte zuerst eine PMS1 Fragmentbibliothek erzeugt werden. Dies geschah analog zum Abschnitt 4.1.1. Das *pms1* Gen wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide *pms1_up* und *pms1_lo* aus dem Vektor *pWBK1pms1* (Kramer *et al.*, 1989) amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit DNaseI verdaut und über ein 12,5 % Polyacrylamidgel größenfraktioniert. Daraufhin erfolgte die Ligation der beiden Adaptormoleküle, die erneute Reinigung über ein 12,5 % Polyacrylamidgel sowie die Ligation in den Oberflächenpräsentationsvektor *pASKInt100*. Mit den so vorbereiteten Plasmiden wurde *E. coli* DH5 ζ transformiert. Insgesamt wurden 10^4 unabhängige Klone erhalten. Es wurden Fragmente von 40-100 bp kloniert. Die Zellen wurden angeimpft und induziert. Anschließend wurden sie mit dem anti-PMS1-Serum, anti-Kaninchen-Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Daraufhin wurden epitopräsentierende Zellen mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung aussortiert (s. Abb. 4.15). Die isolierten Zellen wurden anschließend zweimal resortiert.

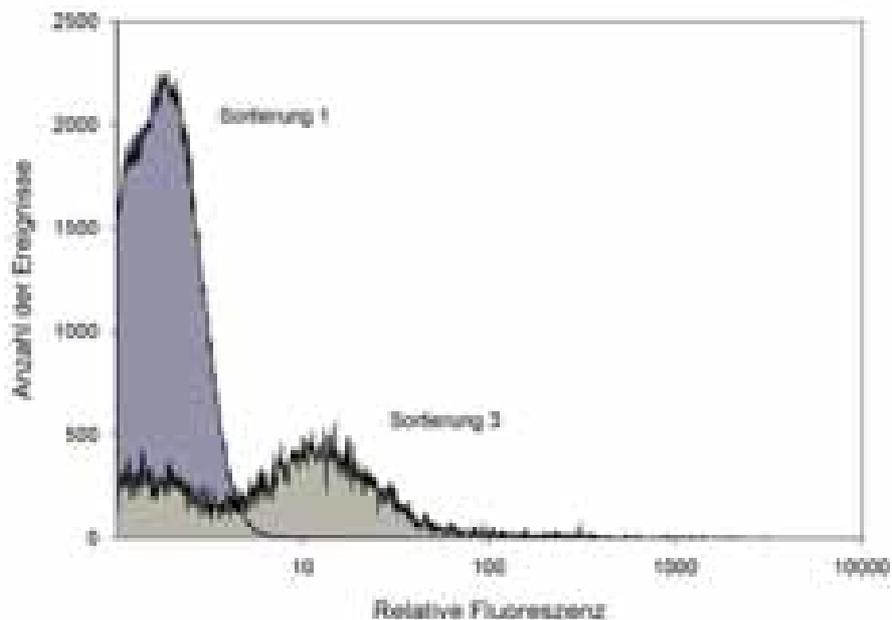


Abb. 4.15: Durchflußcytometrisches Histogramm der PMS1-Epitop Isolierung. Die Zellen wurden wie im Text beschrieben markiert und anschließend dreimal sortiert. Dargestellt ist die Sortierung 1 (dunkle Kurve) und die Sortierung 3 (helle Kurve). Es ist eine deutliche Anreicherung von Zellen erhöhter relativer Fluoreszenz feststellbar. Die Anzahl der Ereignisse bei der Sortierung 3 wurde aus Darstellungsgründen mit 10 multipliziert.

Von den sortierten Zellen wurden 10 Einzelklone getestet. Von diesen 10 präsentierten vier Klone ein Epitop, das von Antikörpern aus dem polyklonalen anti-PMS1 Serum gebunden wurde. Kein Klon wurde vom Anti-Kaninchen-Serum erkannt. Von den 4 Klonen wurde die Plasmid-DNA präpariert und sequenziert (verwendetes Oligonukleotid war Etag-Seq-up). Das Ergebnis der Sequenzierung ist schematisch in Abb. 4.16 dargestellt, die vollständigen Sequenzen sind im Anhang 7.3 zu finden. Alle vier Klone präsentierten unterschiedliche Epitope. Die Klone präsentierten Peptide zwischen 13 und 23 Aminosäuren Länge, dies ist in guter Übereinstimmung mit der Größenselektion bei der Klonierung, wo Fragmente zwischen 40 und 100 bp eingesetzt wurden.

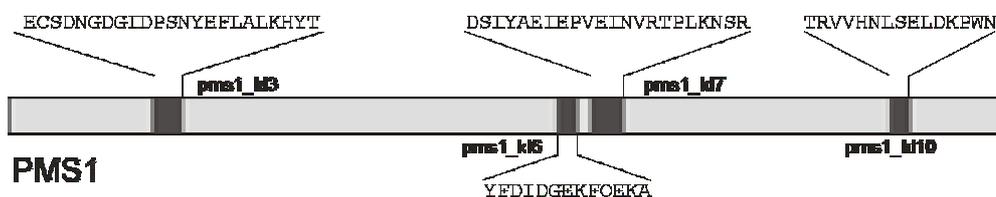


Abb. 4.16: Schematische Darstellung des PMS1 Proteins. Die kartierten Epitope sind dunkel hervorgehoben, die Peptidsequenz ist jeweils mit angegeben (die DNA-Sequenzen sind im Anhang 7.3 aufgeführt).

Für den Reinigungsnachweis monospezifischer Antikörper wurden die Klone PMS1_6 und PMS1_7 angeimpft und induziert. Anschließend wurden 20 ml dieser Kulturen pelletiert. Die Zellen wurden dann in dem polyklonalen anti-PMS1-Serum

resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die an die Zellen gebundenen Antikörper wurden durch Resuspendieren der Bakterien in 100 µl Glycin-Puffer (200 mM Glycin, 140 mM NaCl, pH 2.0) während einer 45 minütigen Inkubation auf Eis von der Zelloberfläche abgelöst. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand, der die monospezifischen Antikörper enthielt, wurde durch Zugabe von 25 µl 1 M Tris/HCl (pH 9) neutralisiert.

Die so gereinigten Antikörper wurden für die erneute Markierung der beiden Klone verwendet. Durch kreuzweise Markierung mit den gereinigten Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die isolierten Antikörper monospezifisch für ein definiertes Epitop waren (s. Abb 4.17 auf der nächsten Seite). Wenn man Antikörper zur Markierung einsetzte, die nicht mit Zellen des gleichen Klons gereinigt wurden, so war keine erhöhte relative Fluoreszenz der Zellen messbar. Damit ist gezeigt worden, dass sich die isolierten Klone zur Aufreinigung von monospezifischen Antikörpern eignen. Die so isolierten Antikörper sind funktional und spezifisch für ein definiertes Epitop. Die Menge ist durch die Anzahl der präsentierten Peptide auf den Zellen begrenzt. Allerdings sind diese Mengen für eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungen wie Immunofluoreszenz (s. Abb. 4.14) oder ELISA ausreichend.

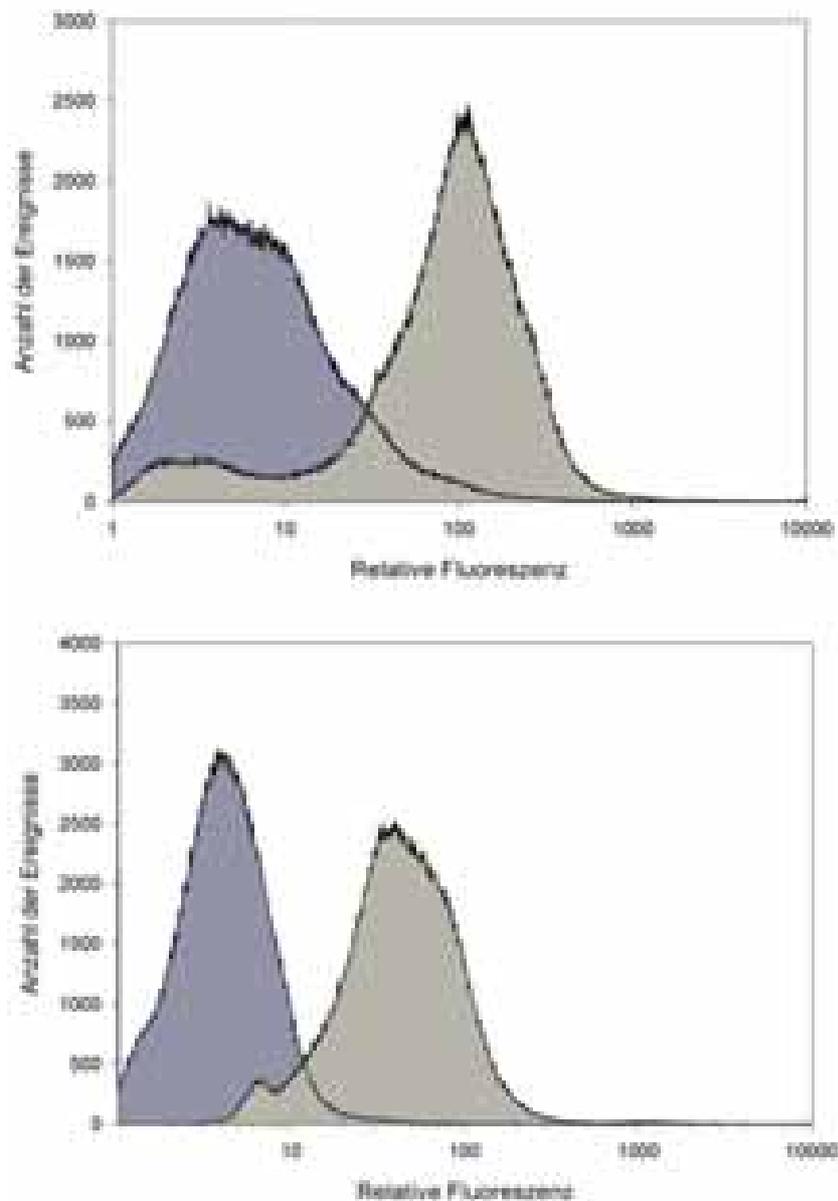


Abb. 4.17: Durchflußcytometrische Histogramme der zwei PMS1 epitoppäsentierenden Klone PMS1_kl6 und PMS1_kl7. Oben: Induzierte PMS1_kl6 Zellen markiert mit gereinigten monospezifischen Antikörpern gegen das PMS1_kl7 Epitop (dunkle Kurve), sowie mit gereinigten monospezifischen Antikörpern gegen das PMS1_kl6 Epitop (helle Kurve).

Unten: Induzierte PMS1_kl7 Zellen markiert mit gereinigten monospezifischen Antikörpern gegen das PMS1_kl6 Epitop (dunkle Kurve), sowie mit gereinigten Antikörpern gegen das PMS1_kl7 Epitop (helle Kurve). In beiden Fällen ist eine Vermittlung der Fluoreszenz an die induzierten Zellen nur dann gegeben, wenn zur Markierung Antikörper zur Anwendung kamen, die über Bakterien, die das gleiche Epitop präsentierten, gereinigt wurden. Wenn man Antikörper zur Markierung einsetzte, die nicht mit Zellen des gleichen Klons gereinigt wurden, so war keine erhöhte Fluoreszenz der Zellen messbar (dunkle Kurven beider Histogramme).

4.1.5 Durchmusterung großer Proteomabschnitte nach antigenen Determinanten

In den vorhergehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass sich die intiminvermittelte Zelloberflächenpräsentation von Peptiden eignet, um Antikörper-Antigen Wechselwirkungen zu identifizieren. Durch DNA-Sequenzierung der isolierten Klone konnte die genaue Sequenz der jeweiligen Epitope ermittelt werden. Der besondere Vorteil der bakteriellen Zelloberflächenpräsentation gegenüber anderen - z.B. chipbasierten - Verfahren (vergl. Einleitung), liegt in der einfachen Herstellung der Peptidbibliotheken. Sofern nur Antigene eines einzelnen Proteins gesucht werden, ist dies durch Peptidsynthese auf einer festen Matrix sehr schnell und einfach zu bewerkstelligen. Durch 15 Aminosäuren lange Peptide, die sich jeweils um 5 Aminosäuren überlappen, kann ein Protein wie die η -Lactamase (nach Prozessierung der Signalsequenz 263 aa) durch 27 Peptide repräsentiert werden. Soll aber ein ganzer Proteomabschnitt eines Organismus nach Epitopen durchmustert werden, kommt man schnell an die Grenzen dieser Methode. Die Suche nach antigenen Determinanten wäre auf diese Weise nicht mehr praktikabel. Die Erzeugung von Peptidbibliotheken durch Fragmentierung und Klonierung der korrespondierenden DNA sowie die Produktion der Peptide und deren Verankerung auf Bakterienzellen ist demgegenüber vergleichsweise einfach. Alle Arbeitsschritte erfolgen parallel, so dass die Konstruktion einer Peptidbibliothek, die einen ganzen Organismus repräsentiert, innerhalb von zwei bis vier Arbeitstagen, unabhängig von der Genomgröße, zu bewerkstelligen ist. Ein solches Projekt sollte in Zusammenarbeit mit der klinischen Forschergruppe „Molekular Pathology Of Cystic Fibrosis And Pseudomonas Genomics“ (AG Prof. Tümmler) der Medizinische Hochschule Hannover durchgeführt werden.

4.1.5.1 Vorbemerkungen zum Immunoprofiling eines variablen Genomabschnitts von pathogenen *P. aeruginosa* Bakterien

Pseudomonas aeruginosa ist ein fakultativ anaerobes stäbchenförmiges gram-negatives Bakterium. Seine metabolische Vielseitigkeit ermöglicht ihm eine ubiquitäre Verbreitung in der Natur. So kann *P. aeruginosa* aus aquatischen Lebensräumen wie Flüssen, Sümpfen und verschiedenen marinen Küstengewässern isoliert werden (Pellet *et al.*, 1983). Weiterhin sind Isolate aus dem Boden und aus Pflanzen beschrieben (Cho *et al.*, 1975). Von medizinischer Relevanz ist aber die Besiedlung von Menschen und Tieren. Das ursprüngliche Habitat der Spezies ist noch nicht geklärt, am häufigsten kann man sie aus Abwässern isolieren.

P. aeruginosa weist ein beträchtliches tier-, pflanzen- und humanpathogenes Potential auf. Dabei werden wirtsunabhängig die gleichen Virulenzfaktoren genutzt (Rahme *et al.*, 1995 und 2000). Der Mensch wird unter normalen Umständen nicht infiziert. Nur wenn eine Schwäche der Immunabwehr vorliegt, kann es zu einer Infektion kommen. Vor allem sind Personen mit schweren Hautverbrennungen und HIV-infizierte betroffen. Weiterhin tritt *P. aeruginosa* immer häufiger als Erreger nosocomialer Infektionen in Erscheinung. Auch hierbei werden hauptsächlich Patienten mit systemisch oder lokal geschwächter Immunantwort befallen. Betroffen sind hier vor allem Krebs- und Beatmungspatienten. Es werden vor allem Infektionen des Urogenitaltraktes, Pneumonien und Wundinfektionen beobachtet.

Besondere Bedeutung kommt *P. aeruginosa* bei Patienten mit Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) zu. Cystische Fibrose ist die häufigste vererbte Stoffwechselkrankheit in der Bundesrepublik Deutschland. Hierzulande leiden ca. 8000 Personen an dieser Krankheit, 5% aller Menschen (ca. 4.000.000) sind Merkmalsträger (Quelle: Deutsche Mukoviszidose eV). Die Krankheit kann auf Mutationen im *cftr*-Gen (Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator) zurückgeführt werden. Das Gen befindet sich auf dem Chromosom 7 und kodiert für einen spannungsabhängigen Ionenkanal. Bei einem defekten CFTR-Protein kann es zu einem veränderten Ionen- und Wassertransport über die Zellmembran kommen. Die Folge ist die Anreicherung von salzhaltigen Schleimen in verschiedenen Organen. Besonders betroffen sind dabei die Bauchspeicheldrüse, der Darm und die Lunge. Insbesondere die erhöhte Schleimmenge in der Lunge ist für die Erkrankten problematisch. In diesem Schleim nisten sich pathogene *Pseudomonas aeruginosa* Stämme ein. Bei CF-Patienten kann man die deutlich verringerte Lebenserwartung gegenüber Gesunden auf eine Besiedlung der unteren Atemwege mit alginatproduzierenden *P. aeruginosa* Stämmen zurückführen (Govan und Deretic, 1996). Mit der Besiedlung der Lunge geht eine entzündliche Destruktion des Lungengewebes einher, die letztendlich zu einem früheren Tod führt. Innerhalb der letzten Jahre sind deutliche Fortschritte in der Therapie erzielt worden. So lag die Lebenserwartung von CF-Patienten 1980 bei acht Jahren und nur ein Prozent erreichte die Volljährigkeit. Heute liegt die Lebenserwartung fast viermal so hoch bei 30 Jahren (Quelle: Deutsche Mukoviszidose eV). Dennoch ist derzeit keine Heilung möglich.

Die Gabe von Antibiotika führt nur teilweise zu einer Linderung der Symptome. Das liegt daran, dass sich die Bakterien im persistierenden Stadium durch einen Biofilm aus Alginat gegen äußere Einwirkung zu schützen versuchen. Dies führt zu einer mukoiden Morphologie. Einher geht dieses mit einer Veränderung der Lipopolysaccharideketten sowohl in ihrem Zucker- als auch ihrem Lipidanteil und mit dem Verlust der Motilität. Dieses Stadium wird in der Population durch Signalmoleküle, deren Konzentration von der Zelldichte abhängig ist, induziert. Die Kommunikation zwischen den Zellen wird durch N-Acetyl-Homoserinlactone als Signalmolekül bewerkstelligt. Dieser Prozess wird als *quorum-sensing* bezeichnet. Es gibt zwei getrennte Regulationssysteme, das *las*IR und das *rh*IR System (Übersicht bei Rumbaugh *et al.*, 2000 und Lyczak *et al.*, 2000). Insbesondere das *las*IR System ist an der Regulation der Biofilmsynthese beteiligt. Bei lang andauernder Behandlung mit antimikrobiellen Wirkstoffen wird ein weiterer Morphotyp beobachtet, die *small colony variants* (SCVs), die eine noch gesteigerte Resistenz gegen Antibiotika haben. Die Ursache dieser phänotypischen Konversion ist bisher noch nicht geklärt. Die Erradikation dieser soweit etablierten SCVs ist nicht mehr möglich.

Genetische Variabilität innerhalb von Bakterienspezies kann durch Nukleotidsubstitutionen, Umorganisation des Chromosoms oder aber auch durch den Erwerb von Fremdgenen erfolgen (Arber, 2000). Der Erwerb von Fremdgenen durch horizontalen Gentransfer ist ein zentraler Bestandteil der Diversifikation und der Speziesbildung von Bakterien (Übersicht bei de la Cruz und Davies, 2000; Lan und Reeves, 2000 sowie Ochman *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* hat ein vergleichsweise großes

Genom. Das Genom des sequenzierten Klon PAO1, einem Wundisolat, umfaßt 6,3 Mb und ist somit fast ein Drittel größer als das *E. coli* Genom. Die Vorhersage lautet, dass insgesamt 5570 Proteine kodiert werden. Damit ist es eines der größten bisher sequenzierten Bakteriengenome überhaupt (Stover *et al.*, 2000). Inwieweit der Stamm PAO1 repräsentativ für die gesamte Spezies ist, ist nicht geklärt. Untersuchungen haben gezeigt, dass es im *P. aeruginosa* Genom drei Regionen erhöhter Variabilität gibt (Heuer *et al.*, 1998, Römmling *et al.*, 1995). Diese sogenannten hypervariablen Regionen konnten bis auf ein intraklonales Level identifiziert werden (Römmling *et al.*, 1997). Vergleichende Genomkartierung zeigte zweifelsfrei die unterschiedlichen Regionen zweier verwandter Stämme, dem Stamm C und dem Stamm SG17M, die beide zum prädominanten *P. aeruginosa* Klon C gehören (Schmidt *et al.*, 1998). Der Stamm C war ein Klinikisolat (CF-Patient), der Stamm SG17M entstammte einem aquatischen Habitat. Die hypervariable Region befand sich in beiden Fällen nahe dem *lipH* Gen (s. Abb. 4.18). Um diese Bereiche genauer zu untersuchen wurde in beiden Fällen ein zusammenhängender *Cosmidcontig* (s. Abb. 4.18) konstruiert und sequenziert (Larbig *et al.*, 2002).

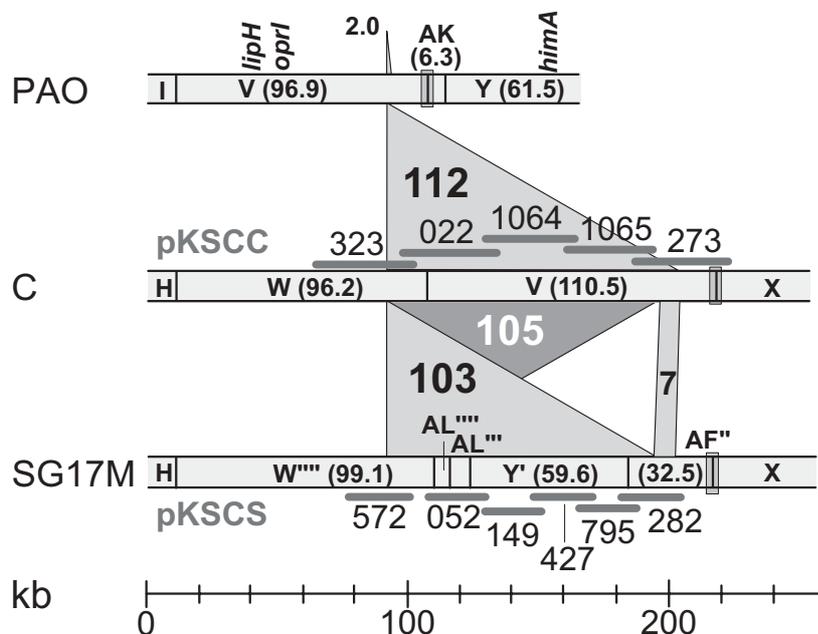


Abb.4.18: Schematische Darstellung der Chromosomenregion am *lipH* Gen der *P. aeruginosa* Stämme PAO, C und SG17M (aus Larbig *et al.*, 2002). Dargestellt sind die Insertionen von 112 kb (C) bzw. 103 kb (SG17M) gegenüber dem sequenzierten Referenzstamm PAO. Die beiden Genomregionen aus C und SG17M wurden durch Erstellung von Cosmidbanken sowie substraktiver Hybridisierung der Cosmidklone isoliert. Es ergab sich ein zusammenhängender Cosmidcontig von pKSCC 323, 022, 1064, 1065, und 273 bei C, bzw aus pKSCS 572, 052, 149, 427, 795 und 282. Alle Cosmide wurden durch ein *shotgun* Verfahren in den Vektor pTZ19Rcat subkloniert und sequenziert (Larbig *et al.*, 2002).

Die Cosmide deckten einen Bereich von 158.230 bp im Stamm C und 128.136 bp im Stamm SG17M ab. Die Sequenzierung ergab, dass beide Stämme einen identischen Bereich von 6872 bp und einen stammspezifischen Bereich von 104.995 bp (C) bzw.

103.304 bp (SG17M) hatten. Der Nomenklatur von Liang entsprechend wurden die Geninseln PAGI-2(C) und PAGI-3(SG) für *P. aeruginosa* genomic island bezeichnet (Liang *et al.*, 2001). Die Insertion in das Genom erfolgte in tRNAGly Gene (s. Abb. 4.19). Nach der Sequenzierung wurden 113 ORFs auf der PAGI-2(C) bzw. 105 ORFs auf der PAGI-3(SG) identifiziert. 60 % dieser ORFs waren hypothetische oder Orphan Gene (Larbig *et al.*, 2002).



Abb. 4.19: Schematische Darstellung der hypervariablen Region im PAO Genom und die PAGI-2(C) im Klon C Chromosom (aus Larbig, 2001).

Der Stamm C war ein Klinikisolat aus der Lunge eines CF-Patienten. Alle CF-Patienten haben ab einem bestimmten Alter *P. aeruginosa* Infektionen und reagieren mit einer inflammatorischen Antwort auf das Bakterium. Es wurde bereits gezeigt, dass sich in Immuneren von CF-Patienten ein hoher Antikörpertiter gegen verschiedenste *P. aeruginosa* Epitope befindet. So basieren verschiedene Tests zum Nachweis einer Infektion oft auf einem ELISA, bei dem das Blutserum auf Antikörper gegen *P. aeruginosa* untersucht wird. Häufig werden bei diesen Tests die Exoproteine alkalische Protease, Elastase und ExoA abgefragt. Langzeitstudien haben gezeigt, dass Patienten mit Cystischer Fibrose einen hohen Titer gegen *P. aeruginosa* Zelloberflächenantigene besitzen (Brett, 1986). Ebenso konnte gezeigt werden, dass sich in Seren von CF-Patienten Antikörper gegen Proteine aus dem TypIII Sekretionssystem befinden (Moss *et al.*, 2001). Typischerweise befinden sich die TypIII Gene geclustert auf einer Geninsel (vergl. Abschnitt 4.2). Es stellte sich die Frage, ob Gene auf der PAGI-2(C) auch immunogen sind. Es befinden sich unter den ORFs keine, denen man aufgrund von Sequenzvergleichen zweifelsfrei eine Oberflächenpräsenz zuweisen kann. Allerdings ist in den Seren von CF-Patienten auch ein hoher Antikörpertiter gegen intrazelluläre Proteine, wie das GroES, zu finden (Jensen *et al.*, 2001). Wenn es möglich wäre, Epitope zu isolieren, die von Genen aus der hypervariablen C Region kodiert werden, so würden sich daraus interessante Einsichten ergeben. Es wäre möglich, beim Infektionstest-ELISA verschiedene *P. aeruginosa* Stämme anhand dieser Epitope zu unterscheiden. Zusätzlich ließen sich durch die Kartierung Schlüsse auf die Expression von ORFs ziehen. Es wäre plausibel, von einem putativen Gen anzunehmen, wenn es für ein Epitop kodiert, dass es auch für ein funktionales Protein kodiert und dieses während der Infektion vom Bakterium exprimiert wird. Ziel der folgenden Experimente war zu untersuchen, ob sich innerhalb der 113 ORFs, die von der PAGI-2(C) kodiert werden, solche befinden, die für Proteine kodieren, welche bei CF-Patienten eine spezifische Immunantwort auslösen. Die Fragmentierung der 5 Cosmide, die den gesamten Genomabschnitt enthalten, sowie die Klonierung der Fragmente in den Zelloberflächen-

präsentationsvektor pASKInt100 würde zu einer Peptidbibliothek führen, mit der man sehr schnell den gesamten Proteomabschnitt nach antigenen Determinanten mit einem CF-Patientenserum durchmustern könnte.

4.1.5.2 Erzeugung von PAGI-2 (C) Fragmentbibliotheken

Die Geninsel PAGI-2(C) lag auf 5 überlappenden Cosmiden (pKSCC 323, 022, 1064, 1065, und 273) vor (s. Abb. 4.18). Jedes dieser Cosmide sollte einzeln fragmentiert und subkloniert werden. Die Cosmid-DNA wurde von der *Klinischen Forschungsgruppe Molekular Pathology Of Cystic Fibrosis And Pseudomonas Genomics* (Medizinische Hochschule Hannover), die in Zusammenarbeit mit dem *Goettingen Genomics Laboratory* auch das Sequenzierungsprojekt der beiden PAGIs durchgeführt hat, zur Verfügung gestellt.

Da eine Größeneinstellung beim DNaseI Verdau sehr schwer ist (es entstehen Fragmente im Bereich zwischen der gesamten Cosmidlänge und einem Nukleotid), wurden die Cosmide anders als bei den anderen Fragmentbibliotheken (vergl. Abschnitte 4.1.2-4.1.3) nicht direkt mit DNaseI verdaut. Anstelle dessen wurden die 5 Cosmide zuerst hydrodynamisch auf 1-3 kb Fragmente gesichert (vergl. 3.2.11). Die Flußgeschwindigkeit betrug 9 ml/min für 10 min. Anschließend wurden die Fragmente gefällt. Nach dieser Vorfragmentierung erfolgte ein DNaseI Verdau analog zu den vorherigen Abschnitten. Anschließend erfolgte nach Entfernung der DNaseI aus der Lösung und dem Auffüllen der überhängenden Enden die Ligation mit den Adaptormolekülen (vergl. Abb. 4.2). Daraufhin wurden die ligierten Fragmente über ein 2 % Agarosegel größenfraktioniert (es wurden Fragmente zwischen 50 bp und 400 bp ausgeschnitten) und mit dem Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 ligiert. Mit den so ligierten Plasmiden wurde *E. coli* 71-18P' transformiert. Die Ergebnisse der Transformation sind in Tab. 4.2 zusammengefaßt.

Cosmid	Transformanten total	PCR-Screen positiv / getestet	Transformanten mit <i>Insert</i>
323	$7,1 \cdot 10^6$	13 / 20	$4,6 \cdot 10^6$
022	$6,4 \cdot 10^6$	9 / 20	$2,8 \cdot 10^6$
1064	$2,2 \cdot 10^7$	11 / 20	$1,2 \cdot 10^7$
1065	$1,4 \cdot 10^7$	12 / 20	$8,4 \cdot 10^6$
273	$3,0 \cdot 10^7$	5 / 20	$7,5 \cdot 10^6$

Tab. 4.2: Zusammenfassung der Transformationsergebnisse bei der Erzeugung der PAGI-2(C) Fragmentbibliotheken. Die Transformationsausbeute wurde durch Verdünnungsplattierungen bestimmt. Die Transformanten mit *Insert* wurden anhand eines PCR-Screens mit den Oligonukleotiden *AvaI*-adaptor_up und *BamHI*-adaptor_lo errechnet. Die Spalte PCR-Screen positiv / getestet gibt die Anzahl inserttragender Klone von den insgesamt getesteten an. Aus diesem Verhältnis wurde die tatsächliche Anzahl der Transformanten mit *Insert* bestimmt.

Anhand der positiven Transformanten (mit kloniertem Fragment) und der durchschnittlichen Fragmentlänge kann die Wahrscheinlichkeit, ob die kodierende Sequenz

für ein definiertes Epitop in der Bibliothek repräsentiert ist, abgeschätzt werden. Die Wahrscheinlichkeit P, dass eine definierte Base eines Cosmids in einer zufällig erzeugten Fragmentbibliothek mit N Klonen nicht präsent ist, ist:

$$P = \left(\frac{\text{Fragmentlänge}}{\text{Cosmidlänge}} \right)^N$$

Dabei ist P die Wahrscheinlichkeit und N die Anzahl der Klone (Clarke und Carbon, 1976). Dies ist allerdings nur die Betrachtung einzelner Basen. Lineare Epitope, die eine durchschnittliche Länge von 12 Aminosäuren besitzen, also deren kodierende DNA ca. 36 bp lang ist, werden so nicht betrachtet, da sie zusammenhängend im richtigen Leseraster auf einem Fragment liegen müssen, um isolierbar zu sein. Eine Abschätzung kann jedoch von der obigen Gleichung abgeleitet werden. Da jedes potentielle Epitop in allen 6 Leserastern kloniert sein kann, muß man die Zahl der Transformanten mit einem klonierten Fragment durch 6 dividieren. Weiterhin muß die epitopkodierende Sequenz vollständig auf dem Fragment liegen. Die Fragmentlänge reduziert sich so auf:

$$\frac{\text{Länge}_{\text{Fragment}}}{6} = \text{Länge}_{\text{Epitop}} \quad (2.1)$$

Wobei $\text{Länge}_{\text{Fragment}}$ die durchschnittliche Länge der klonierten Fragmente ist und $\text{Länge}_{\text{Epitop}}$ die durchschnittliche Länge der zu einem Epitop korrespondierenden DNA. Die Cosmidlänge reduziert sich auf:

$$\frac{\text{Cosmidlänge}}{6} = \text{Länge}_{\text{Fragment}} \quad (2.1)$$

Somit lautet die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, ein bestimmtes Epitop in einer Fragmentbibliothek nicht realisiert zu haben:

$$P = \left(\frac{1}{6} \cdot \frac{\text{Länge}_{\text{Fragment}}}{\text{Cosmidlänge}} \right)^N$$

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein definiertes Epitop in der Bibliothek realisiert ist, ist dementsprechend 1-P (der Wahrscheinlichkeit nicht realisiert zu sein). Wenn man die Anzahl der positiven Transformanten aus Tab. 4.2 in die obige Gleichung einsetzt, so ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von >0,99 für alle 5 Cosmidbibliotheken, selbst wenn man von der geringsten Fragmentgröße von 50 bp ausgeht. Wenn also die Erzeugung der Fragmente, die Ligation und die Klonierung sequenzunabhängig vollzogen wurde, so müßten alle DNA Abschnitte, die ein potentielles Epitop kodieren, in den Bibliotheken repräsentiert sein.

4.1.5.3 Durchmusterung der PAGI-2(C) Fragmentbibliotheken

Für die Durchmusterung der PAGI-2(C) Fragmentbibliotheken wurde von der *Klinischen Forschungsgruppe Molekular Pathology Of Cystic Fibrosis And Pseudomonas Genomics* (Medizinische Hochschule Hannover) Serum von einem CF-Patienten, der mit dem

Stamm C infiziert war, zur Verfügung gestellt. Ähnlich wie bei der Kartierung der CSFV-E^{ms} Epitope stellte sich heraus, dass das Serum einen hohen Titer von anti-*E. coli* Antikörpern hatte. Dies war nicht verwunderlich, da das natürliche Habitat von *E. coli* Bakterien der menschliche Darm ist. Es war also notwendig, diese Antikörper aus der Lösung zu entfernen. Dazu wurde wie in Abschnitt 4.1.3.2.2 vorgegangen. Nachdem das Serum gereinigt war, konnte es für die Kartierung von PAGI-2(C) verwendet werden.

Die 5 Bakterienbibliotheken, die je ein Cosmid repräsentierten, wurden angeimpft und induziert. Anschließend wurde die Zelldichte bestimmt und eine Mischung gleicher Bakterienzahl aus allen 5 Bibliotheken angesetzt. Diese Mischung wurde mit dem humanen CF-Serum, einem anti-Human Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Diese Zellen wurden im Durchflußcytometer analysiert und anschließend wurden Ereignisse, die eine erhöhte relative Fluoreszenz aufwiesen, aussortiert (s. Abb. 4.20).

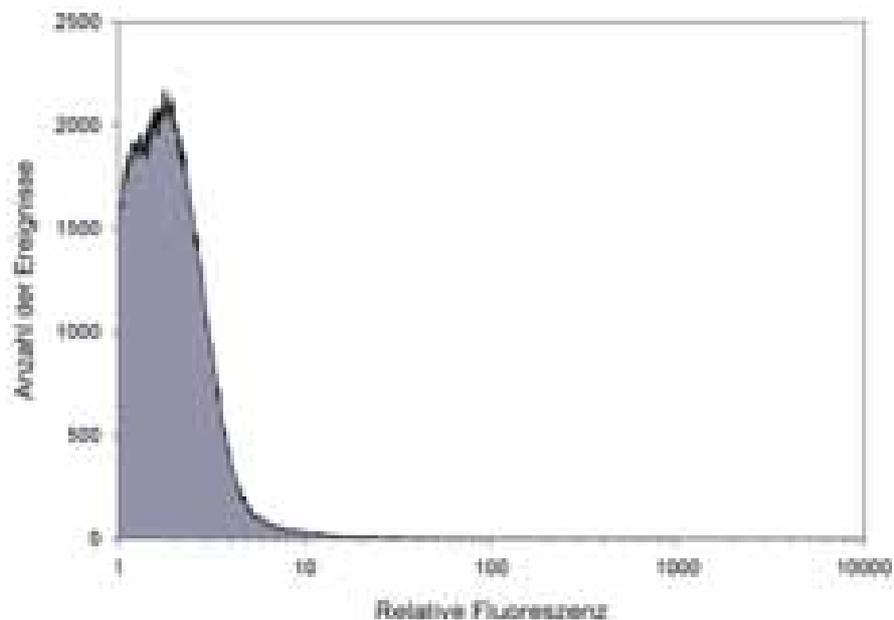


Abb. 4.20: Durchflußcytometrische Analyse der 5 PAGI-2(C) Fragmentbibliotheken im Gemisch (markiert mit dem CF-Serum, anti-Human-Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin. Ereignisse, die eine relative Fluoreszenz >12 aufwiesen, wurden aussortiert.

Insgesamt wurden bei dieser Sortierung $1\Delta 10^8$ Ereignisse betrachtet. Die aussortierten Zellen wurden plattiert, am nächsten Tag von den Platten abgeschwemmt und nach Induktion und Markierung erneut sortiert (s. Abb. 4.21). Anschließend wurden die sortierten Zellen zweimal resortiert und plattiert. Am nächsten Tag wurden 30 Einzelklone angeimpft und induziert. Daraufhin wurden diese Zellen nur mit dem anti-Human-Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Es stellte sich heraus, dass 19 Klone ein Peptid präsentierten, das mit dem anti-Humanserum (oder mit Streptavidin-R-Phycoerythrin) interagierte. Die Klone, die nicht mit dem anti-Human-Serum (Biotinkonjugat) interagierten, wurden daraufhin

mit dem CF-Serum, dem anti-Human-Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert und ebenfalls im Durchflußcytometer analysiert. Von diesen 11 Klonen präsentierten vier ein Peptid, das von dem CF-Serum erkannt wurde. In Tab. 4.3 ist das Ergebnis des Markierungsexperiments zusammengefaßt.

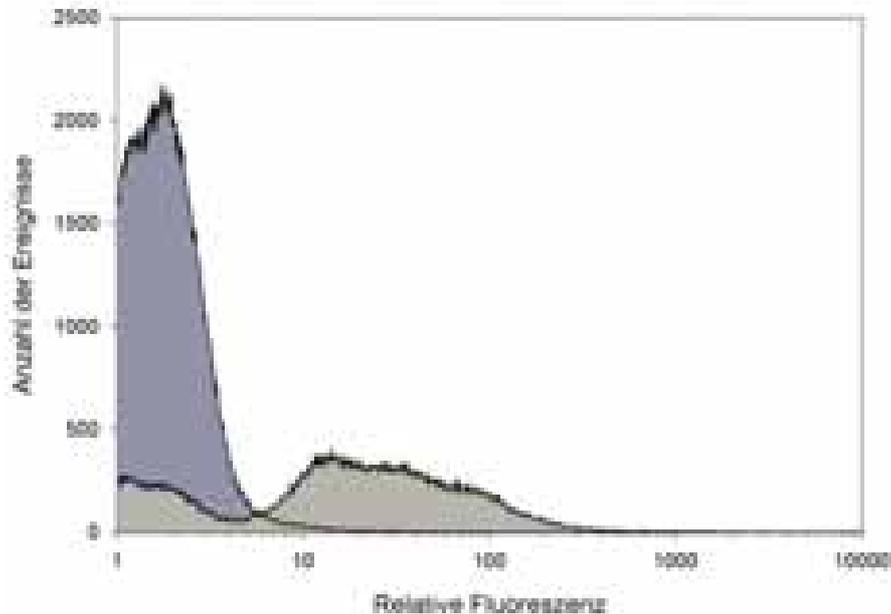


Abb. 4.21: Durchflußcytometrische Histogramme der zweiten Sortierrunde der Anreicherung von PAGI-2(C) Epitopen mit einem CF-Patientenserum. Die Zellen wurden mit CF-Patientenserum, anti-Human Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Beim Vergleich der ersten Runde (Abb. 4.20) mit der zweiten (dunkle Kurve) konnte keine signifikante Anreicherung festgestellt werden. Nach Resortierung wurde der Anteil von Ereignissen, die eine erhöhte Fluoreszenz aufwiesen, messbar (helle Kurve).

Getestete Klone	Positiv mit anti-Human-Serum	Positiv mit CF-Patientenserum	negativ
30	19	4	7

Tab. 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Einzelklonanalyse. Es wurden insgesamt 30 Klone getestet, von denen 4 von dem Patientenserum erkannt wurden. 19 Klone wurden von dem anti-Human Serum gebunden und 7 Klone wurden von keinem Serum erkannt.

Nur vier von 30 getesteten Klonen präsentierten ein Peptid, das von dem CF-Serum erkannt wurde. Demgegenüber standen 19 Klone, die mit dem anti-Human-Serum (Biotinkonjugat) wechselwirkten. Dieses Ergebnis war konträr zu allen bisherigen Kartierungen (s. Abschnitte 4.1.2 und 4.1.3). Bei der Anreicherung von η -Lactamase, CSFV-E^{ms} oder PMS1 Epitopen wurden keine Klone isoliert, die mit den zweiten Antikörpern der Markierungsreaktion interagierten. Somit musste davon ausgegangen werden, dass die isolierten Bakterien Peptide präsentierten, die durch eine Verschiebung des Leserasters Kreuzreaktionen der humanen CF-Antikörper und dem anti Humanserum (Biotinkonjugat), die eigentlich andere Epitope erkennen,

hervorrufen. Um sicher zu gehen, dass bei der Anreicherung keine positiven Klone verloren gegangen waren, wurden die Cosmide auch einzeln, jedes für sich, durchmustert (je zwei Sortierungen). Dabei wurden insgesamt noch 7 zusätzliche Klone isoliert, die von den Antikörpern aus dem CF-Serum erkannt wurden. Von allen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und unter Verwendung des IRD-800 markierten Oligonukleotids Etag-seq-up auf einem Licor Sequenziergerät sequenziert (DNA-Sequenzen sind im Anhang 7.4 angeführt). Von diesen 11 Klonen enthielten 8 DNA-Fragmente, die nach der Annotation im falschen Leseraster waren, einer ein Fragment, das aus einem nicht kodierenden Bereich der PAGI-2(C) entstammte, einer einen Teil des Cosmids und einer ein Fragment, das aus einem Teil des Cosmidrückrads und einem Teil des PAGI-2(C) orfs c11 (Larbig *et al.*, 2002) zusammengesetzt war (DNA-Sequenzen sind im Anhang 7.4 aufgeführt). Die DNA-Sequenz dieses Klones kodierte für ein Peptid, das Teil des Proteins war. Die Peptidsequenz, die von diesem Klon kodiert wurde, lautete:

AGIVVSRSSFGMASFSSGSQRRRFLTLASVLVGGVSIW

Der unterstrichene C-terminale Bereich ist Bestandteil des orfs c11. Obwohl dieses Peptid von dem orf c11 kodiert wurde, kann unter Berücksichtigung der anderen Sequenzen nicht davon ausgegangen werden, dass es sich um eine antigene Determinante handelte. Insgesamt wurden 11 Sequenzen erhalten, von diesen 11 deckten sich lediglich acht mit einem kodierenden Bereich der Geninsel, und von diesen acht war nur dieser eine im richtigen Leseraster. Das Verhältnis von 7:1 kommt der statistischen Verteilung sehr nahe, da bei der Herstellung der Bibliotheken DNA-Fragmente in allen sechs Leserastern kloniert wurden.

Somit ist es nicht gelungen, antigene Determinanten zu bestimmen, die von der PAGI-2(C) kodiert werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass die Diversität der Bibliothek nicht ausreichend war. Dies scheint aber eher unwahrscheinlich (vergl. Tab. 4.2 und die daran anschließende mathematische Abschätzung). Wahrscheinlicher ist, dass in dem Serum keine Antikörper gegen Proteine aus der Geninsel vorhanden waren oder dass die Konzentration dieser Antikörper unterhalb der Detektionsgrenze für die Oberflächenpräsentation lag. Es konnten jedoch Epitope kreuzreagierender Antikörper isoliert werden. Daher scheint es eher plausibel, dass die Proteine, die von der PAGI-2(C) kodiert werden, nicht vom Immunsystem der CF-Patienten erkannt werden. Dennoch ist die Konzentration der Antikörper als limitierender Faktor nicht gänzlich auszuschließen. Somit konnte nicht gezeigt werden, dass die Epitopkartierung mittels intiminvermittelter Oberflächenpräsentation geeignet ist, große Genombereiche zu untersuchen. Allerdings konnten viele Peptide bestimmt werden, die aufgrund von Kreuzreaktion der Antikörper, die eigentlich ein anderes Epitop erkennen, isoliert wurden. Dies deutet darauf hin, dass die Methode prinzipiell anwendbar ist. Es wird aber auch sehr deutlich, dass mit zunehmender Komplexität sowohl der Seren als auch der Peptidbibliotheken genaue Sequenzinformationen über den zu untersuchenden Bereich unabdingbar sind. Sind diese Informationen nicht vorhanden, so werden falsch-positive Klone nicht erkannt und die Peptidsequenz als Epitop bestimmt. Um solche falsch-positiven Klone zu

erkennen, muß der betreffende DNA Abschnitt wie in diesem Fall sequenziert und annotiert sein.

4.1.6 Diskussion der Epitopkartierungen

Ziel der Arbeiten in den Abschnitten 4.1.2 bis 4.1.4 war die Isolierung von antigenen Determinanten. Dieses Ziel wurde unter Verwendung der intiminvermittelten Zelloberflächenpräsentation realisiert. Insbesondere war die Aufgabe, Sequenzen nicht bekannter linearer Peptid epitope, die von vorgegebenen Antikörpern gebunden werden, zu ermitteln. Dazu wurde die für die Proteine, gegen die die Antikörper gerichtet waren, kodierende DNA fragmentiert und in den Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 in den Sequenzkontext eines verkürzten Intimings eingesetzt (s. Abb. 4.1 und 4.3). Durch Induktion der Genexpression wurden Fusionsproteine aus dem verkürzten Intimin und dem zur klonierten DNA korrespondierenden Peptid produziert. Nach Einbettung des Intimins in die äußere Bakterienmembran wurde das jeweilige Peptidfragment zum extrazellulären Medium exponiert und einer Abfrage seiner Eigenschaften zugänglich gemacht. Durch Inkubation der Bakterien mit den zu untersuchenden Antikörpern wurden solche Klone markiert, die Peptide präsentierten, die ein Epitop für diese Antikörper darstellten. Durch anschließende Fluoreszenzmarkierung der an die Zellen gebundenen Antikörper konnten mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung Bakterien angereichert werden, die solche Epitope auf ihrer Oberfläche präsentierten. Die Sequenz der Epitope wurde daraufhin indirekt durch Sequenzierung der Plasmid-DNA bestimmt. Untersucht wurden insbesondere aus infektionsbiologischer Sicht interessante Proteine und die dagegen gerichteten monoklonalen Antikörper und/oder polyklonale Seren. Die beschriebenen Experimente sind die ersten durchgeführten Versuche, Protein-Peptid Wechselwirkungen anhand der Durchmusterung von hergestellten Peptidbibliotheken, die über ein verkürztes Intimin auf der äußeren *E. coli* Membran verankert werden, zu bestimmen.

Um das in Abschnitt 4.1.1 dargestellte Verfahren der Identifikation von linearen Epitopen zu validieren, wurde ein Kartierungsexperiment mit einem kommerziell erhältlichen Serum, das gegen η -Lactamase gerichtet war, durchgeführt. Dieses Modellexperiment zeigte, dass die Anreicherung von epitopräsentierenden Bakterien sehr schnell und effizient war (vergl. Abb. 4.6). Nach nur zwei Anreicherungsrounds wurden Einzelklone isoliert, die Peptide auf ihrer Oberfläche präsentierten, die von den Antikörpern aus dem Serum gebunden wurden. Nach Sequenzierung der Plasmid-DNA wurden sieben unterschiedliche Peptidsequenzen identifiziert, die von Antikörpern aus dem Serum erkannt wurden. Diese Sequenzen waren über die gesamte Primärsequenz der η -Lactamase verteilt (s. Abb. 4.7 A). Bei Betrachtung der Tertiärstruktur des Enzyms war auffällig, dass alle gefundenen Epitope einen Anteil an der Moleküloberfläche hatten (vergl. Abb. 4.7 B). Kein gefundenes Epitop war im Faltungskern des Enzyms verborgen. Dies ist insoweit verwunderlich, da auch Proteinabschnitte aus dem Faltungskern nach proteolytischem Abbau auf MHCs präsentiert werden und eine Immunantwort auslösen. Solche Peptide wurden nicht isoliert. Es wurde nur eine begrenzte Anzahl von Klonen sequenziert. Möglicherweise

hätte die Sequenzierung von mehr Klonen auch solche zutage gefördert, die dem Faltungskern entstammen. Auch kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass Peptide, die einen Beitrag zur Enzymoberfläche leisten, löslicher und dadurch entweder in geringerem Maße einem proteolytischen Abbau im Periplasma unterworfen sind als Peptide aus dem Faltungskern oder mit höherer Effizienz durch die äußere Membran transloziert werden. Am wahrscheinlichsten scheint aber, dass das Serum von dem Hersteller über Bindung an immobilisierte η -Lactamase affinitätsgereinigt wurde. Dies ließ sich nicht mehr feststellen, da die Firma zum Zeitpunkt der Durchführung nicht mehr existierte und es keine genaueren Produktinformationen gab. Sofern diese Reinigung mit dem ganzen, korrekt gefalteten Enzym als Reinigungsmatrix durchgeführt wurde, ist es plausibel, dass die Antikörper keine Peptide aus dem Faltungskern erkennen, da diese Immunglobuline bei der Affinitätsreinigung verloren gingen. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass in geringeren Mengen auch Antikörper gegen andere Teile der η -Lactamase in dem Serum vorhanden waren. Dazu hätte man Peptide aus dem Faltungskern einzeln testen müssen. Solche Versuche wurden nicht unternommen.

In einer zweiten Serie von Experimenten wurden Epitope des Schweinepest-erregers CSFV kartiert. Dieser plussträngige RNA Virus wird in die Klasse der *Flaviviridae* eingeordnet (vergl. Abschnitt 4.1.3.1). Das Ziel war, Epitope des Glycoproteins E^{ms} aus der Virushülle zu identifizieren. Es wurde gezeigt, dass die Hüllglycoproteine E^{ms} und E2 virusneutralisierende Antikörper induzieren (König *et al.*, 1995; Brusckke *et al.*, 1997; vergl. Abschnitt 4.1.3.1). Da eine Impfung mit lebenden oder abgeschwächten Viren in den Staaten der europäischen Gemeinschaft aufgrund schlechter Unterscheidbarkeit zwischen echten Infektionen und geimpften Tieren nicht zugelassen ist, sind Kenntnisse über die genauen Epitope von großer Bedeutung. Aus diesen Kenntnissen ließen sich möglicherweise neue Impfungsstrategien, die die Problematik der Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren umgehen, (Vergl. Abschnitt 4.1.3.1) gewinnen.

Für die Kartierung standen anfänglich 11 verschiedene monoklonale Antikörper, die gegen das E^{ms} Glycoprotein gerichtet waren, zur Verfügung. Von keinem dieser Antikörper war die Erkennungssequenz bekannt. Nach Herstellung der Fragmentbibliotheken und Analyse der Klone stellte sich heraus, dass nur zwei der Antikörper mit Bakterien aus der Bibliothek interagierten. Nach zwei bzw. einer Anreicherungsrunde konnten Bakterien isoliert werden, die mit den beiden monoklonalen Antikörpern interagierten (s. Abb. 4.8 und 4.9). Die Sequenz der beiden Epitope konnte anschließend indirekt durch Sequenzieren der Plasmid-DNA bestimmt werden (s. Abb. 4.10). Dabei stellte sich heraus, dass beide Antikörper den gleichen Teil des Proteins erkennen (Peptidsequenzen: CRYDKNTDVNVV bzw. YDKNTDVNVV). In einer späteren Arbeit wurde gezeigt, dass dieses Epitop eine spezifische T Zellen Antwort auslösen kann (Armengol *et al.*, 2002). Die Epitopsequenz der anderen 9 monoklonalen Antikörper konnte nicht bestimmt werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen wäre es theoretisch möglich, dass die entsprechenden DNA-Fragmente nicht kloniert und somit die korrespondierenden Peptide nicht auf den Bakterienzellen verankert wurden. Diese Möglichkeit scheint allerdings eher unwahrscheinlich. Insgesamt wurden zur

Bestimmung der Epitopsequenzen (s.o.) 15 Einzelklone sequenziert; von diesen 15 waren 13 auf DNA-Ebene sequenzverschieden. Dies zeigt, dass zumindest die Region, die von diesen beiden Antikörpern erkannt wird, in vielen unterschiedlichen Variationen in den Bibliotheken präsent ist. Sofern von einer Gleichverteilung der Fragmente bei der Herstellung der Bibliothek ausgegangen wird, sollten alle linearen Peptide des CSFV-E^{ms} in der Bibliothek vorhanden sein. Auch wenn man von einer moderaten Verschiebung (z.B. durch präferentielles Spalten der DNaseI oder den daran anschließenden Schritten) ausgeht, scheint es eher unwahrscheinlich, dass lineare Teilpeptide des Proteins nicht auf den Zellen einer Abfrage zugänglich gemacht wurden. Auch scheint es wenig wahrscheinlich, dass die Epitope der neun Antikörper aufgrund struktureller oder sequenzspezifischer Eigenschaften nicht auf den Bakterienzellen präsentiert wurden. Das Oberflächenpräsentationsverfahren mit dem verkürzten EHEC Intimin als Membranverankerungsdomäne eignet sich nicht für alle Proteine gleichermaßen gut (vergl. Wentzel *et. al.*, 2001). Es gibt jedoch keine Anhaltspunkte dafür, dass die Präsentation von kurzen linearen Peptiden bezüglich ihrer Sequenz eingeschränkt ist. Allerdings können mit dem Verfahren, so wie die Bibliotheken in dieser Arbeit konstruiert wurden, lediglich lineare Peptide kartiert werden. Es ist durchaus denkbar und plausibel anzunehmen, dass einige der neun monoklonalen Antikörper keine linearen Peptide sondern in der Primärsequenz nicht zusammenhängende Oberflächenteile des CSFV-E^{ms} erkennen. Solche konformations-spezifischen Antikörper binden nur das native Protein oder größere Teilabschnitte desselben. Kurze lineare Peptide von 10-30 Aminosäuren Länge entsprächen nur einem Teil ihrer Erkennungssequenz und folglich können die Epitope nicht bestimmt werden. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass das CSFV-E^{ms} ein Glycoprotein ist (vergl. Abschnitt 4.1.3.1). Daher ist es durchaus möglich, dass einige der neun Antikörper Zuckerreste in ihrer Erkennungssignatur aufweisen. Da die präsentierten Peptide von *E. coli* Bakterien nicht glycosyliert werden, können die Epitope solcher Antikörper nicht durch bakterielle Oberflächenpräsentation von linearen Peptiden kartiert werden. Um zu überprüfen, ob die Antikörper Teile der Glycosylierung erkennen, hätte das Protein rekombinant in *E. coli* Bakterien produziert werden können und anschließend ein immunochemischer Nachweis (*Western-blot*, ELISA) geführt werden müssen. Sofern die Glycosylierung eine Rolle bei der Erkennung spielt, würde der Nachweis von unglycosyliertem gegenüber glycosyliertem Protein negativ ausfallen. Der Nachweis, ob die Antikörper konformationsspezifisch sind, wäre ebenfalls nur durch einen immunochemischen Test zu führen. Im Falle, dass die Antikörper mit dem nativen Protein interagieren nicht aber mit dem denaturierten, kann davon ausgegangen werden, dass die betreffenden Antikörper konformationsspezifisch sind. Solche Versuche wurden ebenfalls nicht durchgeführt, da kein CSFV-E^{ms} Protein zur Verfügung stand und eine Produktion in den Laboratorien, in denen diese Arbeit angefertigt wurde, aufgrund der biologischen Sicherheit nicht in Betracht gezogen wurde.

Die Arbeiten an η -Lactamase und CSFV-E^{ms} haben gezeigt, dass mit der Oberflächenpräsentation genbasierter linearer Peptide und deren Durchmusterung durch FACS ein einfaches und robustes Verfahren zur Verfügung steht, um lineare Epitope identifizieren zu können. Es ließe sich möglicherweise auch zur Kartierung

diskontinuierlicher Epitope einsetzen. Dazu müssten die Bibliotheken dahingehend modifiziert werden, dass jeweils zwei Genfragmente zufallsmäßig zusammenligiert werden (getrennt von einem Fragment variabler Länge zur Abstandshaltung). Bei Induktion der Genexpression würde so ein Fusionsprotein aus Intimin, einem Peptid des zu untersuchenden Proteins, einem Abstandshalter Peptid und einem weiteren Peptid des zu analysierenden Proteins produziert. Nach Verankerung des Intimins in der äußeren Membran würden die zwei durch den Abstandshalter getrennten Peptide zum äußeren Medium exponiert. Wenn solche Peptide konformationelle Epitope nachbilden, könnten die Antikörper an die Zellen binden und eine Anreicherung positiver Zellen durch fluoreszenzaktivierte oder magnetische Zellsortierung wäre möglich. Die prinzipielle Gangbarkeit einer solchen Strategie wurde bereits 1976 von Lee und Atassi gezeigt (Lee und Atassi, 1976). Diese kombinierten diskontinuierliche oberflächenexponierte kurze Sequenzabschnitte des Lysozyms in einem einzigen linearen Peptid mit dazwischenliegenden Glycinresten als Abstandshalter und konnten zeigen, dass die resultierende Sequenz von konformationsspezifischen anti-Lysozym-Antikörpern erkannt wurde. Bei solchen Versuchen ist zu berücksichtigen, dass die zu erstellenden Bibliotheken aufgrund der Kombinatorik (jedes denkbare Peptid muss mit jedem anderen kombiniert werden) deutlich umfangreicher werden. Bei der Untersuchung von einzelnen Proteinen würde dies noch keinen begrenzenden Faktor darstellen. Wenn z.B. ein Protein durch $5\Delta 10^3$ Klone repräsentiert ist, so würden für die Kartierung diskontinuierlicher Epitope $2,5\Delta 10^7$ benötigt, was durchaus im Bereich des Machbaren liegt. Bei der Analyse ganzer Proteome oder großer Abschnitte davon (s.u.) würde allerdings rasch die Grenze der Herstellbarkeit erreicht. Auch könnten theoretisch die konformationellen Epitope aus mehr als zwei diskontinuierlichen Sequenzabschnitten bestehen, so dass die Kombination von zwei Peptiden zu einem möglichen konformationellen Epitop nicht zwingend zur Bestimmung der Erkennungssequenz führen muss.

Zusätzlich zu den 11 monoklonalen Antikörpern wurde noch ein polyklonales Serum getestet. Auch bei diesem Serum wurden wie schon bei der Kartierung der η -Lactamase Epitope in nur zwei Anreicherungsrounden epitopräsentierende Klone isoliert (vergl. Abb. 4.12). Nach Sequenzierung von insgesamt 19 Klonen stellte sich heraus, dass 16 den gleichen Teil des Proteins präsentierten. Lediglich zwei weitere Epitope wurden identifiziert. Das dominante Epitop war die C-terminale Region des CSFV-E^{ms}. Auch hier gilt, wie schon bei den beiden monoklonalen Antikörpern, dass die gefundenen Sequenzen, die für die gleiche Region des Proteins kodierte, nicht in jedem Fall identisch waren. Dies spricht wieder dafür, dass die untersuchte Bibliothek eine hinreichende Diversität hatte und alle möglichen Epitope in ihr präsent waren. Dennoch wurde hauptsächlich die C-terminale Region gefunden (s. Abb. 4.13). Es ist plausibel anzunehmen, dass die meisten Antikörper dieses Serums, die lineare unglycosylierte Peptide erkennen, gegen diesen Bereich des Proteins gerichtet sind. In Kenntnis der Ergebnisse der Kartierung der 11 monoklonalen Antikörper kann davon ausgegangen werden, dass ein gewisser Teil des Serums gegen glycosylierte Peptide gerichtet ist oder konformationsspezifisch bindet. Diese Epitope konnten nicht kartiert werden. Es gibt Evidenzen, dass der C-terminale Bereich des Proteins nicht durch Zucker maskiert wird (Langedijk *et al.*, 2001). Dies könnte erklären, weshalb

dieser Bereich bei der verwendeten Methode, der Präsentation von Peptiden auf *E. coli* Bakterien, besonders häufig gefunden wurde. Es kann daraus jedoch nicht geschlossen werden, dass dieser Bereich die hauptantigene Determinante des Proteins ist. Nur unter Vernachlässigung von Glycopeptiden ist diese Aussage zutreffend. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es zusätzlich zu den drei mit dem polyklonalen Serum gefundenen Epitopen noch weitere gibt. Die hohe Konzentration der Antikörper, die gegen den C-Terminus gerichtet sind, führte dazu, dass fast ausschließlich Bakterien angereichert wurden, die diesen Teil des Proteins auf ihrer Oberfläche präsentierten. Um alle von dem Serum erkannten Epitope zu bestimmen, hätten entweder ungleich mehr Klone analysiert werden müssen oder die Antikörper, die gegen den C-Terminus gerichtet sind, hätten aus dem Serum entfernt werden müssen. Durch letzteres wäre der Anteil der Antikörper, die andere Bereiche des Proteins erkennen, am Gesamtpool gestiegen, und es wären häufiger andere Epitope, sofern sie denn vorhanden sind, gefunden worden. Solche Versuche wurden aufgrund geringer Serummenge und weil die hauptantigene Determinante bei Betrachtung von linearen unglycosylierten Peptiden bereits identifiziert war nicht unternommen.

In den Abschnitten 4.1.2.-4.1.4 konnte gezeigt werden, dass die intiminvermittelte Zelloberflächenpräsentation von linearen Peptiden geeignet war, die Interaktion von linearen Peptiden, die Teile eines vorgegebenen Proteins waren, mit Antikörpern zu bestimmen. Es wurden insgesamt drei Proteine nach Epitopen durchgemustert, dabei wurden 14 unterschiedliche Epitopsequenzen bestimmt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die isolierten Klone als Affinitätsmatrix zur Reinigung monospezifischer Antikörper geeignet waren (vergl. Abschnitt 4.1.4). Interessant war, ob sich dieses System zur Bestimmung von Antigen-Antikörper Wechselwirkungen von einzelnen Proteinen auf ganze Proteome oder große Bereiche daraus ausdehnen ließ. Um dies zu untersuchen, wurde in Abschnitt 4.1.5.2 ein Proteomabschnitt aus pathogenen *Pseudomonas aeruginosa* Bakterien gewählt. Der Abschnitt wurde von einem hypervariablen Bereich im Genom kodiert. Dieser Bereich enthielt beim untersuchten *P. aeruginosa* Klon C die Geninsel PAGI2(C) (vergl. Abschnitt 4.1.5.1). Dieser Klon war ein Klinikisolat aus der Lunge eines CF-Patienten. Es ist bekannt, dass in den Seren von CF-Patienten ein hoher Antikörpertiter gegen *P. aeruginosa* Bakterien vorhanden ist (vergl. Abschnitt 4.1.5.1). Es war durchaus denkbar, dass von dieser Geninsel Proteine kodiert wurden, die vom Immunsystem von CF-Patienten erkannt werden. Die Geninsel PAGI2(C) lag subkloniert auf 5 Cosmiden vor (vergl. 4.1.5.1). Diese Cosmide umfassten insgesamt 158.230 bp *P. aeruginosa* DNA. Diese DNA wurde in Fragmenten (Länge 50-400 bp) in den Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 kloniert. Anschließend wurden die resultierenden Bakterienbibliotheken mit dem Serum eines CF-Patienten nach Epitopen durchgemustert. Bei dieser Durchmusterung konnten Klone angereichert werden, die eine erhöhte Fluoreszenz aufwiesen. Bei der genaueren Analyse von einzelnen Klonen wurde festgestellt, dass die überwiegende Mehrheit dieser Klone nicht mit den Antikörpern des CF-Patientenserums, sondern mit dem anti-Human-Serum (Biotinkonjugat) interagierten (vergl. Tab. 4.3). Nach der Sequenzanalyse von insgesamt 11 Klonen, die mit Antikörpern aus dem CF-Patientenserum interagierten, wurde festgestellt, dass nur ein Klon ein Peptid, das von einem offenen Leserahmen kodiert wurde, präsentierte. Bei der Herstellung der

Fragmentbibliotheken werden DNA-Fragmente in allen sechs Leserastern kloniert, wodurch statistisch jeder sechste Klon ein DNA-Fragment im Leseraster eines offenen Leserahmens im Sequenzkontext des Intimings enthält. Bei den vorherigen Kartierungen wurden keine Klone isoliert, die mit den zweiten Antikörpern interagierten, und es wurden ebenso keine Klone isoliert, die für ein Peptid kodierten, das, hervorgerufen durch ein falsches Leseraster, nicht Teil des untersuchten Proteins war. Offenbar enthielten die Patientenserum - wenn überhaupt - nur zu einem geringen Anteil Antikörper, die gegen Proteine der untersuchten Geninsel gerichtet sind. Dabei lässt sich nicht unterscheiden, ob das gefundene Peptid eine antigene Determinante eines *Pseudomonas aeruginosa* Proteins darstellt oder ob es von kreuzreagierenden Antikörpern erkannt wird, die mit einer Immunantwort auf *P. aeruginosa* Infektionen nichts zu tun haben.

Aus diesem Befund wird deutlich, dass bei einer Epitopkartierung mittels Antikörperdurchmusterung gen- oder genombasierter Peptidbibliotheken die Kenntnis der annotierten Sequenz der untersuchten Proteine zur Identifizierung von Epitopen unabdingbar ist, und dass die sichere Identifizierung eines antigenen Proteins bzw. einer antigenen Determinante nur dann möglich ist, wenn mehrere verschiedene Epitope eines Proteins identifiziert werden oder ein und dasselbe Epitop mehrfach aufgefunden wird.

4.2 Erzeugung und Isolierung nicht natürlicher Interaktionspartner

4.2.1 Allgemeine Vorgehensweise

Dieser zweite Teil der Arbeit verfolgte das Ziel, mit Hilfe der intiminvermittelten Zelloberflächenpräsentation neue, nicht natürliche Interaktionspartner zu isolieren. Dazu sollten Peptidbibliotheken, die nicht auf Fragmentierung eines natürlichen Gens (vergl. 4.1), sondern auf randomisierte Oligonukleotide zurückzuführen sind, auf *Escherichia coli* Bakterien präsentiert werden. In solchen Peptidbibliotheken sollten, je nach Größe der Bibliothek, nahezu beliebige Interaktionspartner zu vorgegebenen Proteinen vorhanden sein. Diese werden durch die intiminvermittelte Zelloberflächenpräsentation einer Abfrage ihrer Eigenschaften zugänglich gemacht. Das Ziel ist es, auf diese Weise Bindungspartner für in der Natur vorkommende Proteine zu isolieren. Diese Bindungspartner können im Idealfall Inhibitoren der natürlichen Funktion dieser Proteine sein.

Der Wahl des strukturellen Grundgerüsts kommt bei einem solchen Ansatz eine entscheidende Rolle zu. Sie ist abhängig von den gesuchten Funktionen. Das genetisch zu verändernde Ausgangsprotein sollte Eigenschaften aufweisen, die den gesuchten möglichst nahe kommen. Als Ausgangsbasis für Bindemoleküle eignet sich die Klasse der Cystinknoten-Proteine (vergl. 1.2.2). Dabei handelt es sich um sehr kleine und kompakte sogenannte Mikroproteine von nur wenigen Dutzend Aminosäuren. Im Gegensatz zu linearen Peptiden besitzen diese Mikroproteine aber eine geordnete Faltung. Die kleinsten Vertreter dieser Klasse der Cystinknotenproteine stellen die *Squash* Inhibitoren dar. Ein sehr gut charakterisiertes Mikroprotein aus dieser Gruppe ist der Trypsininhibitor EETI-II (*Ecballium elaterium* Trypsininhibitor II) aus der Spritzgurke *Ecballium elaterium*. Dieses 28 Aminosäuren lange Polypeptid besteht aus einem peripheren η -Strang [I], einer 3_{10} Helix, einem weiteren peripheren η -Strang [II] und einem zentralen η -Strang [III] (s. Abb. 4.22). Die Faltung erfolgt wie bei allen Vertretern der *Squash* Inhibitoren: Es wird durch zwei Disulfidbrücken ein Ring gebildet, der schließlich von einer dritten (bei EETI-II zwischen den Cysteinen #2 und #19) durchspannt wird. Durch Schließen dieser letzten Disulfidbrücke wird eine Schleife zwischen den Cysteinen #2 und #9 aufgespannt. Diese Schleife, die sogenannte Inhibitorschleife, ist für die Interaktion mit Trypsin verantwortlich. Die Inhibition wird durch den Kontakt des Arginins #4 von EETI-II mit dem Serin #194 des Trypsins hervorgerufen. Die Verknüpfung durch drei Disulfidbrücken macht diese Mikroproteine sehr rigide und verleiht ihnen eine hohe Stabilität.

Es wurde gezeigt, dass Veränderungen der Aminosäuresequenz in der Inhibitorschleife die Faltung des Grundgerüsts nicht beeinflussen (Wentzel *et al.*, 1999; Christmann *et al.*, 1999). Somit würde bei zufälligen Austausch von Aminosäureresten in der Inhibitorschleife eine Peptidbibliothek entstehen, die im Gegensatz zu zufälligen linearen Peptiden konformationell eingeschränkt und stabilisiert ist. Die Verwendung einer solchen Bibliothek, basierend auf dem Strukturgerüst des Trypsininhibitors EETI-II mit randomisierter Inhibitorschleife, sollte es ermöglichen, Mikroproteine mit neuen Bindungseigenschaften zu isolieren.

generieren, ohne allerdings auf ein bestimmtes strukturelles Grundgerüst zurückzugreifen, lässt sich einfach durch die Verwendung von randomisierten Peptiden, die von Cysteinen flankiert werden, realisieren. Diese Cysteine könnten unter oxidativen Bedingungen, wie sie im extrazellulären Medium herrschen, eine Disulfidbrücke ausbilden und die zufällige Peptidsequenz zu einer Schleife aufspannen (s. Abb. 4.23).

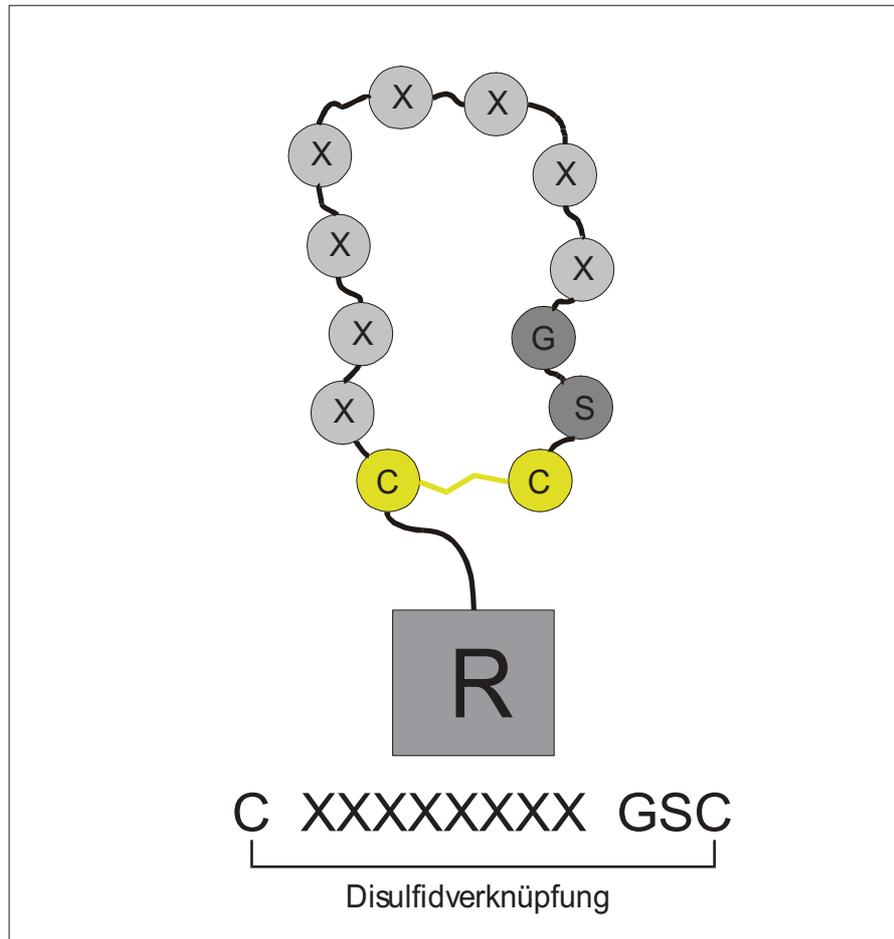


Abb. 4.23: Schematische Darstellung einer möglichen Peptidkonformation gebildet aus 8 zufälligen Aminosäureresten, die von zwei Cysteinen flankiert werden und die Aminosäuresequenz. Jede Aminosäure ist als Kugel dargestellt. X, jede der 20 natürlichen Aminosäuren; G, Glycin; S, Serin; C, Cystein; R, N-terminale Membranverankerungsdomäne (Intimin). Die lineare Peptidkette wird durch Ausbildung einer Disulfidbrücke (dargestellt als gezackte gelbe Linie) zu einer Schleife auf der Membranverankerungsdomäne aufgespannt und zum extrazellulären Medium exponiert. Die konstant gehaltenen Aminosäuren G und S (dunkler dargestellt) wurden auf DNA-Ebene zu Klonierzwecken eingeführt (vergl. Abschn. 4.2.2).

Solche Schleifen sind konformationell flexibler als die entsprechenden Schleifen der Mikroproteine. Somit stehen solche Bibliotheken konzeptionell zwischen linearen Peptiden, die viele Freiheitsgrade aufweisen, und den Cystinknoten-Proteinen. In dieser Arbeit sollten beide Ansätze experimentell verfolgt werden. Es sollten sowohl Mikroprotein- als auch Peptidschleifenbibliotheken hergestellt werden, und mit diesen sollten unter Verwendung der intiminvermittelten Zelloberflächenpräsentation

Peptide mit neuen Bindungseigenschaften isoliert werden. Dies soll durch die Klonierung von randomisierten Genbibliotheken in den Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 in den Sequenzkontext des Intimings geschehen (s. Abb. 4.24). Durch Induktion der Proteinproduktion entsteht ein bipartites Fusionsprotein aus dem Intimin und dem zu der klonierten DNA-Sequenz korrespondierenden Peptid bzw. Mikroprotein. Dieses Peptid/Mikroprotein wird nach Verankerung des Intimins in der äußeren Bakterienmembran zum extrazellulären Medium exponiert und einer Abfrage seiner Bindungseigenschaften zugänglich gemacht. Durch magnetische und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung sollen solche Bakterien isoliert werden, die ein Peptid/Mikroprotein auf ihrer Oberfläche präsentieren, das die gewünschten Bindungseigenschaften besitzt. Anschließend kann die kodierende DNA in ein Expressionsplasmid kloniert werden und das Mikroprotein/Peptid in löslicher Form zur weiteren Analyse produziert werden.

4.2.2 Erzeugung von randomisierten Peptidbibliotheken

Es sollten zwei konzeptionell verschiedene Peptidbibliotheken angelegt werden. Eine sollte auf dem Strukturgerüst des Trypsininhibitors EETI-II basieren (s. Abb. 4.22), die andere sollte aus einem Bereich von acht randomisierten Resten, der auf jeder Seite von einem Cystein flankiert wird, zusammengesetzt sein (s. Abb. 4.23). Die Diversität musste auf DNA-Ebene eingeführt werden. Dazu sollten Oligonukleotide, die an den betreffenden Positionen zufällig gekoppelte Nukleotide besaßen, verwendet werden. Diese Oligonukleotide hatten an den betreffenden Codonen die Sequenz NNS, wobei N für jedes der 4 Nukleotide und S für G oder C steht. Dadurch werden die Stoppcodone *ochre* und *opal* (TAA und TGA) nicht zugelassen und die Anzahl der möglichen Codone von 64 auf 32, die aber noch für alle Aminosäuren kodieren können, reduziert. Eine elegantere Einbringung der Variationen wäre die Verwendung von Trinukleotiden bei der Synthese der Oligonukleotide (Virnekäs *et al.*, 1994). Dadurch ließe sich die Anzahl der möglichen Codone auf 20 reduzieren, einhergehend mit einer höheren Diversität bei gleicher Klonzahl. Der gesamte Sequenzraum (Anzahl theoretisch möglicher Sequenzen) würde bei Verwendung nach dem NNS Verfahren bei der Oligonukleotidsynthese 32^N betragen, demgegenüber würde die Verwendung von Trinukleotiden bei der Synthese den Sequenzraum auf 20^N verringern (wobei N die Anzahl der zu verändernden Codone angibt). Die Verwendung von Trinukleotid-Oligonukleotiden kam jedoch aufgrund mangelnder Verfügbarkeit nicht in Betracht. Der Sequenzraum für die drei in dieser Arbeit erzeugten Bibliotheken ist in Tab. 4.4 zusammengefasst.

Aus der Tabelle 4.4 wird ersichtlich, dass es nicht möglich ist, den theoretischen Sequenzraum bei zufälliger Kodierung von sechs Aminosäuren durch Transformation von *Escherichia coli* Bakterien abzudecken. Selbst bei der Verwendung von Trinukleotidoligonukleotiden wären bei der Mikroproteinbibliothek mit 10 zufälligen Aminosäureresten in der Inhibitorschleife etwa 10¹⁰ unterschiedlicher Mikroproteinvarianten möglich.

Bibliothek	NNS	Trinukleotide
6x	$1,1\Delta 10^9$	$6,4\Delta 10^7$
8x	$1,1\Delta 10^{12}$	$2,6\Delta 10^{10}$
10x	$1,1\Delta 10^{15}$	$1\Delta 10^{13}$

Tab. 4.4: Größe des Sequenzraums der geplanten Peptid bzw. Mikroproteinbibliotheken unter Verwendung von Trinukleotidoligonukleotiden bzw. bei Verwendung von Mononukleotiden nach dem Codonmuster NNS bei der Synthese der Zufallsoligonukleotide.

Eine vollständige Abdeckung des Sequenzraums ist aber nicht die Voraussetzung für die Isolierung von Bindemolekülen. Vielmehr zeigen zahlreiche Experimente (z.B. Smith *et al.*, 1998), dass aus Bibliotheken, die nur einen Bruchteil der möglichen Sequenzen beinhalten, viele unterschiedliche Bindemoleküle isoliert werden können.

Zur Herstellung der teilrandomisierten Gene wurden drei, an den betreffenden Positionen nach dem NNS-Schema (s.o.), synthetisierte Oligonukleotide eingesetzt. Um eine mögliche Sequenzverschiebung während der ersten Amplifikationsrunden zu verhindern, sollte die Matrizen-DNA nicht den zu randomisierenden Bereich umfassen. Deshalb wurde zuerst eine erste PCR unter Verwendung der Oligonukleotide Reptemp_up und Cat-Hind_lo mit dem *eti-wt* Gen als Matrize durchgeführt. Das Oligonukleotid Reptemp_up hybridisiert 3' von der zu randomisierenden Sequenz. Dadurch wird dieser Bereich nicht amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit *NheI* gespalten. Das so entstehende überhängende 3' Ende des unteren Stranges wurde anschließend mit ddCTP aufgefüllt. Dadurch wurde gewährleistet, dass diese Matrizen-DNA bei der anschließenden PCR nicht in diese Richtung aufgefüllt wurde. Die so erhaltene DNA diente als Matrize für die PCR mit den randomisierten Oligonukleotiden. Sie umfasste das *eti*-Gen ohne die kodierende Sequenz für die Inhibitorschleife. Die vollständigen Gene für die Klonierung wurden durch eine zweite PCR-Reaktion unter Verwendung des konstanten Oligonukleotids Cat-Hind_lo und dem jeweiligen Zufallsoligonukleotid erzeugt. Die Zufallsoligonukleotide waren ETIRand6 für die 6x, ETIRand10 für die 10x und C-Mix8-Cup für die 8x Bibliothek. Alle Zufallsoligonukleotide hybridisieren an die gleiche Matrizen-DNA. Die Sequenz der durch diese PCR entstehenden 8x Zufallsgene lautet:

```

                                     BamHI
                                     |
gggtgcnnnsnnnsnnnsnnnsnnnsnnnsnnsggatcctgctaa
1  -----+-----+-----+-----+----- 42
cccacgnsnnnsnnnsnnnsnnnsnnnsnnscctaggacgatt

G C X X X X X X X X G S C *

```

Wobei N für alle 4 Basen, S für G oder C und N für alle 20 natürlichen Aminosäuren steht. Das Oligonukleotid C-Mix8-Cup führt für spätere Klonierungen eine *BamHI* Schnittstelle und ein Stoppcodon, das die Translation in die weitere Sequenz des *eti*-Gens verhindert, ein. Die Gensequenz der Mikroproteine ist auf der nächsten Seite angeführt und lautete:

```

GGGTGCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNSTGCAAACAGGACTCCGACTGCCTGGCTGGCTGCGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCACGNNSNNSNNSNNSNNSNNSNSACGTTTGTCTGAGGCTGACGGACCGACCGACGCAA

G C X X X X X X C K Q D S D C L A G C V

      Bsp120I                      BamHI
      |                             |
TGCGGGCCCAACGGTTTCTGCGGATCC
-----+-----+-----+-----+-----+
ACGCCCGGGTTGCCAAAGACGCCTAGG

C G P N G F C G S

```

Die dargestellte Sequenz entspricht den 6x Genen, das Oligonukleotid ETIRand10 führt entsprechend noch vier zusätzliche NNS Codone ein. Die entstandenen PCR-Produkte wurden mit *Cfr9I* und *HindIII* gespalten und anschließend einer Phenol/Chloroform Extraktion unterzogen. Danach wurden sie in einen mit *AvaI* und *BamHI* gespaltenen pASKInt100-eti4+4 Vektor ligiert. Das in diesem Vektor enthaltene *eti-4+4* Gen wurde durch den Verdau aus dem Plasmid ausgeschnitten und durch Sucrosedichte-zentrifugation (vergl. 3.2.7) vom Vektorrückrad abgetrennt. Der Ausgangsvektor enthielt keine *Bsp120I* Schnittstelle. Diese wurde durch die randomisierten Gene in den Vektor eingeführt (s. Sequenz oben). Anhand der *Bsp120I* Erkennungssequenz ließ sich der Transformationshintergrund nach der Klonierung, der durch unvollständig gespaltenen und religierten Vektor erzeugt wurde, bestimmen. Die Vorgehensweise der Klonierung ist in Abb. 4.24 schematisch zusammengefaßt.

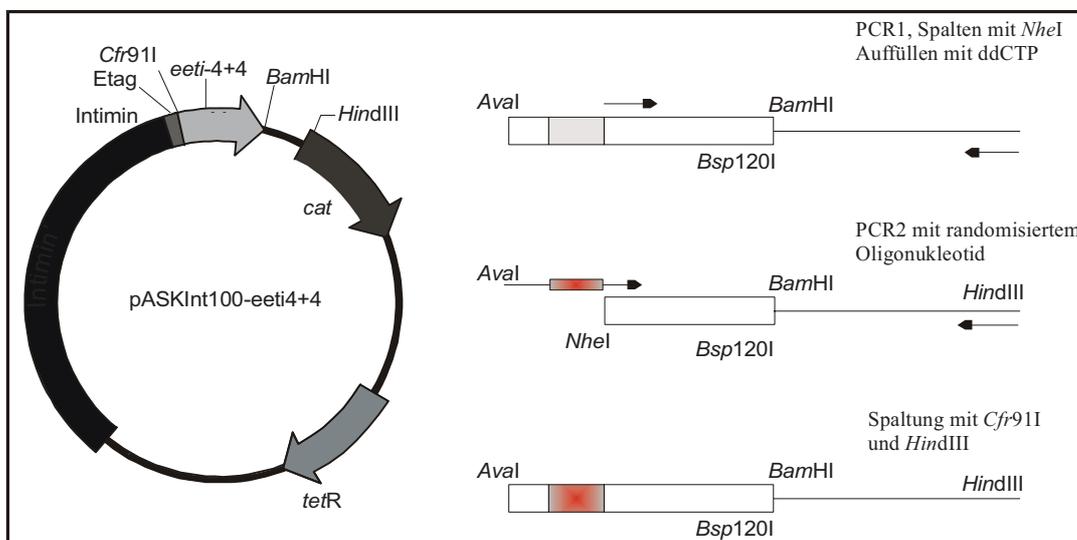


Abb. 4.24: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Herstellung und Klonierung der randomisierten Gene. Zuerst wurde die Matrizen-DNA durch eine erste PCR mit den Oligonukleotiden Reptemp_up und Cat-Hind-lo erzeugt (PCR1). Diese PCR-Produkte wurden anschließend mit *NheI* gespalten und mit ddCTP aufgefüllt. Diese DNA-Fragmente dienen dann als Matrize für die PCR mit den Zufallsoligonukleotiden (PCR2). Die aus dieser PCR resultierenden Produkte wurden mit *Cfr9II* und *HindIII* gespalten und mit dem mit *AvaI/HindIII* gespaltenen und Sucrosegradienten gereinigten Vektor pASKInt100-eti4+4 (ein Derivat des pASKInt100, vergl. Abb. 2.2) ligiert.

Nach der Ligation wurden die Produkte mit Ethanol gefällt und anschließend wurde mit diesen Plasmiden BMH 71-18 P' transformiert (Elektroporation). Für jede Transformation wurden 350 ng ligiertes Plasmid eingesetzt. Nach der Kur der Zellen wurden die gesamten Transformationsansätze auf Agarplatten mit dem Selektivantibiotika (Chloramphenicol) plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurden Verdünnungsausstriche angefertigt, um die Transformationsausbeuten zu bestimmen. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit dYT-Medium von den Platten abgeschwemmt und anschließend bei -80 °C als DMSO Kulturen gelagert.

Um den Transformationshintergrund, der durch Religation von nicht vollständig gespaltenem Ausgangsvektor hervorgerufen werden konnte, zu bestimmen, wurden Kolonie-PCRs von Klonen, die auf den Verdünnungsplatten gewachsen waren, angefertigt. Dazu wurden die Oligonukleotiden Etag-PvuII-up und Cat-Hind-10 verwendet. Die entstehenden PCR-Produkte wurden dann mit *Bsp120I* verdaut. Diese Restriktionsschnittstelle wurde durch die randomisierten Gene eingeführt. Durch Agarosegelelektrophorese der gespaltenen PCR-Produkte konnte so die Zahl der positiven Transformanten bestimmt werden. Tabelle 4.5 faßt die Transformationsergebnisse zusammen.

Genbibliothek	Anzahl der durchgeführten Transformationen	Anzahl der positiven Transformanten
10x	8	$1,05 \cdot 10^8$
8x	25	$2,04 \cdot 10^8$
6x	24	$8,61 \cdot 10^8$

Tab. 4.5: Zusammengefaßt sind die Anzahl der unabhängig erzeugten Transformanten mit einem varianten Genfragment und die Anzahl der durchgeführten Transformationen für die jeweilige Bibliothek.

Insgesamt wurden so mehr als eine Milliarde unabhängiger Bakterienklone hergestellt. Jede dieser Bakterien enthielt ein randomisiertes Gen, das entweder für ein Cystinknoten-Mikroprotein mit varianter Inhibitorschleife (6x, 10x) oder für eine Peptidschleife mit flankierenden Cysteinen (8x) kodierte. Dazu wurden insgesamt 57 Transformationsansätze mit jeweils 350 ng Ligationsprodukt benötigt. Dies entspricht ca. 20 µg ligierter Plasmid-DNA. Die Anzahl der unterschiedlichen Klone repräsentierte nur einen Bruchteil des gesamten Sequenzraums der jeweiligen Bibliothek (vergl. Tab. 4.4). Diesen kann man nicht durch Plasmidtransformation abdecken.

4.2.3 Allgemeine Überlegungen zur Wahl eines geeigneten Zielproteins, für das aus den Peptidbibliotheken Interaktionspartner isoliert werden sollten

Aus den hergestellten Bibliotheken sollten Moleküle isoliert werden, die mit natürlichen Proteinen interagierten. Im Idealfall könnten solche Moleküle Inhibitoren der natürlichen Funktion dieser Proteine sein. Daher wurde nach Zielproteinen gesucht, deren Inhibition einen wünschenswerten Effekt hat. In Betracht kamen so verschiedene bakterielle Pathogenitätsfaktoren. Idealerweise sollte die Interaktion mit

diesen Pathogenitätsfaktoren dazu führen, dass die Pathogenität der Bakterien herabgesetzt oder sogar gänzlich aufgehoben wird.

Mikrobiell verursachte Infektionskrankheiten stellen heutzutage wieder ein bedeutendes Gesundheitsrisiko dar (vergl. Abschnitt 4.1.2.1). Insbesondere die rasante Verbreitung von multiresistenten Keimen führt zu erhöhter Mortalität von betroffenen Patienten. Daher ist die Suche nach immer neuen Ansätzen der Bekämpfung von pathogenen Bakterien eine der dringendsten Aufgaben der Forschung. Bei den nosokomialen bakteriellen Erkrankungen tritt immer häufiger *Pseudomonas aeruginosa* auf (vergl. Abschnitt 4.1.5.1). So sind 10 % aller weltweit während eines Krankenhausaufenthaltes erworbenen Infektionen auf *P. aeruginosa* zurückzuführen. Im einzelnen ist der Erreger für 16 % aller nosokomial erworbenen Lungenentzündungen, für 12 % der erworbenen Harnwegsinfektionen, für 8 % der operativen Wundinfektionen und für 10 % der Sepsis-Fälle verantwortlich (Van Delden und Iglewski, 1998). Außerdem ist *P. aeruginosa* für die hohe Mortalitätsrate von Patienten mit Cystischer Fibrose mitverantwortlich. Das erhebliche humanpathogene Potential von *P. aeruginosa* ist auf eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren zurückzuführen. Insbesondere sind hier die Proteine Exo A, Exo S sowie Elastase und alkalische Protease zu nennen, die an der Zerstörung des humanen Gewebes beteiligt sind (Frank, 1997).

Die Bekämpfung von pathogenen Bakterien erfolgt in der Regel durch die Gabe von Antibiotika. Diese unterscheiden nicht zwischen pathogenen oder symbiontisch vorkommenden Bakterien. Dadurch wird ein enormer Selektionsdruck hin zur Bildung von Resistenzen an alle Bakterien angelegt. Wünschenswert wäre eine gezieltere Bekämpfung der pathogenen Keime. Dies würde voraussetzen, dass diese infektiösen Bakterien sich in ihrer genetischen Ausstattung von nicht pathogenen unterscheiden und dass eine molekulare Beeinflussung dieser Unterschiede eine Abschwächung der Pathogenität zur Folge hat. *P. aeruginosa* verfügt über einen wissenschaftlich äußerst interessanten Mechanismus. Die Bakterien messen ihre Besiedlungsdichte und steuern so gezielt und koordiniert die Expression der für eine Infektion benötigten frühen Gene. Dieser Prozess wird als *Quorum sensing* bezeichnet (Fuqua *et al.*, 1994). Als Botenstoffe zwischen den Bakterien dienen Homoserinlactone. Die Konzentration dieser Stoffe reguliert die Expression der extrazellulären Virulenzfaktoren (Van Delden und Iglewski, 1998). Im Gegensatz zu den meisten Bakterien, die ihre Besiedlungsdichte über Homoserinlactone messen, verfügt *Pseudomonas aeruginosa* über zwei *Quorum sensing* Systeme. Die beiden Systeme, das *lasI/R* und das *rhlI/R* System (Parsek und Greenberg, 1999) sind hierarchisch angeordnet. Das *LasI* katalysiert die Bildung des Homoserinlactons, welches von *LasR*, einem Transkriptionsregulator, gebunden wird und so die Genexpression beeinflusst. Das *lasI/R* System wird für die Bildung der Biofilme (vergl. Abschnitt 4.1.4.1) benötigt (De Kievit *et al.*, 2001). Da die Bildung dieser Biofilme mit der Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber vielen antimikrobiellen Stoffen einhergeht, sind die Schlüsselenzyme der *Quorum sensing* Systeme ideale Zielproteine für neue Wirkstoffe (Costerton *et al.*, 1999). Die bis zum jetzigen Zeitpunkt charakterisierten Schlüsselenzyme des *Quorum sensing* sind intrazelluläre Proteine. Es könnte durchaus versucht werden, Peptide oder Mikroproteine aus den klonierten Bibliotheken gegen diese Schlüsselenzyme zu isolieren. Bei tatsächlichen

Infektionen hätten diese Peptide, sofern sie in der Lage wären, *in vitro* die enzymatische Funktion dieser Enzyme zu inhibieren, keine Wirkung, da die Zielproteine für Peptide nicht erreichbar wären. Durch funktionelle Analysen wird derzeit sehr intensiv nach allen Proteinen, die an dem Prozess des *Quorum sensing* beteiligt sind, gesucht. Möglicherweise fördert die Suche nach solchen Proteinen in naher Zukunft Zielproteine zutage, deren Funktion von Mikroproteinen beeinflusst werden kann.

Da zur Zeit der Anfertigung dieser Arbeit keine gut charakterisierten Proteine aus den *Quorum sensing* Systemen als Ziele für Mikroproteine oder Peptide vorhanden waren, fiel die Wahl auf andere Proteine, die für die Pathogenität von Bakterien notwendig sind. Die meisten gram-negativen pathogenen Bakterien enthalten in ihrem Chromosom oder auf einem separaten Plasmid zusammenhängende Sequenzabschnitte - sogenannte Pathogenitätsinseln - welche eine Reihe von Virulenzgenen sowie die Gene für die Translokationsmaschinerie enthalten. Diese sind notwendig, um die Effektormoleküle in das extrazelluläre Medium oder direkt in die Wirtszelle zu schleusen. Eine solche Translokation der Virulenzfaktoren über zwei bakterielle Membranen ins Medium oder direkt in die eukaryontische Zielzelle wird als Typ III Sekretion bezeichnet. Diese Sekretion ist unabhängig vom *sec* Sekretionsweg. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Typ III Sekretionssysteme bei pathogenen Bakterien findet man bei Hueck, 1998. Auch *P. aeruginosa* verfügt über eine solche Pathogenitätsinsel, das Exo S Regulon. Von dieser Geninsel werden eine ganze Reihe von Proteinen kodiert, die bei der Infektion eine mehr oder weniger gewichtige Rolle spielen (Frank, 1997). Die kodierten Virulenzfaktoren und die Proteine der Translokationsmaschinerie von *P. aeruginosa* sind homolog zu den sehr gut charakterisierten von pathogenen *Yersinien* (s. Abb. 4.25).

Aus der Abbildung 4.25 geht hervor, dass die sekretierten Proteine durch einen Kanal direkt in die Zielzelle transloziert werden. In der äußeren Bakterienmembran bildet YscC einen multimeren Komplex, durch den die Virulenzfaktoren geschleust werden (Koster *et al.*, 1997). Für *P. aeruginosa* wurde gezeigt, dass Bakterien mit defektem PscC (dem homologen zum *Yersinia* YscC, vergl. Abb. 4.25) defizient in der Typ III Sekretion sind (Nicas *et al.*, 1985; Yahr *et al.*, 1997). Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor von *P. aeruginosa* ist das zum *Yersinia* LcrV homologe PcrV. Dieses Protein inseriert in die Eukaryontenmembran und formt eine Pore (Holmstrom *et al.*, 2001). Diese Pore führt schließlich zur Oncose der betroffenen Zellen. Oncose von Makrophagen ist ein chemotaktisches Signal für *P. aeruginosa* und löst das sogenannte *pack swarming* aus. Die Bakterien „kreisen“ den betroffenen Makrophagen ein, sekretieren mehr Pathogenitätsfaktoren, was zur vollständigen Zerstörung der Eukaryontenzelle führt (Dacheux *et al.*, 2001). Antikörper gegen PcrV verhindern die Translokation von Typ III Proteinen (Sawa *et al.*, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen man eine ansonsten letale Dosis *P. aeruginosa* Bakterien in die Lunge appliziert hatte, durch intravenöse Gabe eines anti PcrV Kaninchenserums überlebten (Shime *et al.*, 2001).

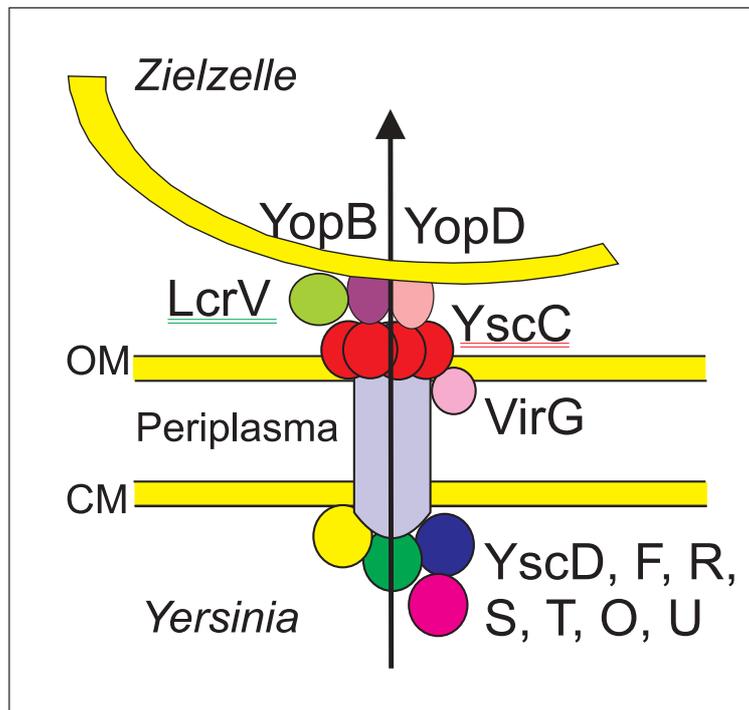


Abb. 4.25: Schematische Darstellung der Typ III Sekretionsmaschinerie und der translozierten Proteine aus *Yersinia* spp. (nach Cornelis, 2000). Die in die eukaryontische Zielzelle translozierten Proteine werden über einen noch nicht genau charakterisierten Translokationskanal über die beiden bakteriellen Membranen geschleust. Zielzelle, eukaryontische Zelle; OM, äußere Bakterienmembran; Periplasma, Periplasmatischer Raum; CM, Cytoplasmamembran; Yersinia, Cytoplasma der Bakterien. Die für die Sekretion bzw. Infektion besonders wichtigen Faktoren YscC und LcrV sind unterstrichen.

Das PcrV Protein ist für die erste Phase der Infektion notwendig, um die Abwehrmechanismen des Wirtes auszuschalten. Da Mikroproteine, was die Bindung an Zielmoleküle angeht, ähnliche Funktionen wie Antikörper einnehmen können (vergl. Einleitung), schienen beide Proteine, das PscC und das PcrV, ideale Ziele für die Isolierung inhibitorischer Mikroproteine zu sein. Im Idealfall ließen sich aus den in Abschnitt 4.2.2 hergestellten Bibliotheken Moleküle isolieren, die mit einem der beiden Proteine interagieren. Diese Moleküle wären dann Kandidaten, um zu testen, ob sie die natürliche Funktion der beiden Proteine bei der Infektion beeinflussen können. Da die Infektion von Mäusen mit den Erregern durch Applizieren eines Kaninchen anti-PcrV Serums gestoppt werden kann (Shime *et al.*, 2001), ist es durchaus plausibel anzunehmen, dass Mikroproteine oder Peptide den gleichen Effekt hervorrufen können. Dieses müßte im Einzelfall getestet werden. Ebenso ist es plausibel anzunehmen, dass die Translokationspore, die vom PscC gebildet wird, (Abb. 4.25) durch Andocken von Mikroproteinen/Peptiden verschlossen werden kann und eine Sekretion der Virulenzfaktoren verhindert wird. Beide Proteine sind im Gegensatz zu den bis heute charakterisierten Komponenten der *Quorum sensing* Systeme von außen für Mikroproteine/Peptide zugänglich und waren aus diesem Grund lohnendere Kandidaten für die Isolierung von Bindemolekülen. Das PcrV ist im Gegensatz zum PscC kein Bestandteil der äußeren *Pseudomonas* Bakterienmembran. Eine rekombinante Produktion des Proteins in *E. coli* schien daher unproblematisch zu

sein. Aus diesen Gründen wurde das PcrV als Zielmolekül für die Isolierung von Mikroproteinen/Peptiden, die die Infektion von *P. aeruginosa* beeinflussen, ausgewählt.

4.2.4 Klonierung und Expression des *Pseudomonas aeruginosa* *pcrv*-Gens in *Escherichia coli* Bakterien

Um die Mikroprotein/Peptid Bibliotheken nach Molekülen zu durchmustern, die mit dem *Pseudomonas aeruginosa* PcrV Protein interagierten, mußte dieses Protein in löslicher Form hergestellt werden. Die Herstellung sollte in rekombinanten *E. coli* Bakterien erfolgen. Die Klonierung des Gens ist schematisch in Abb. 4.26 dargestellt.

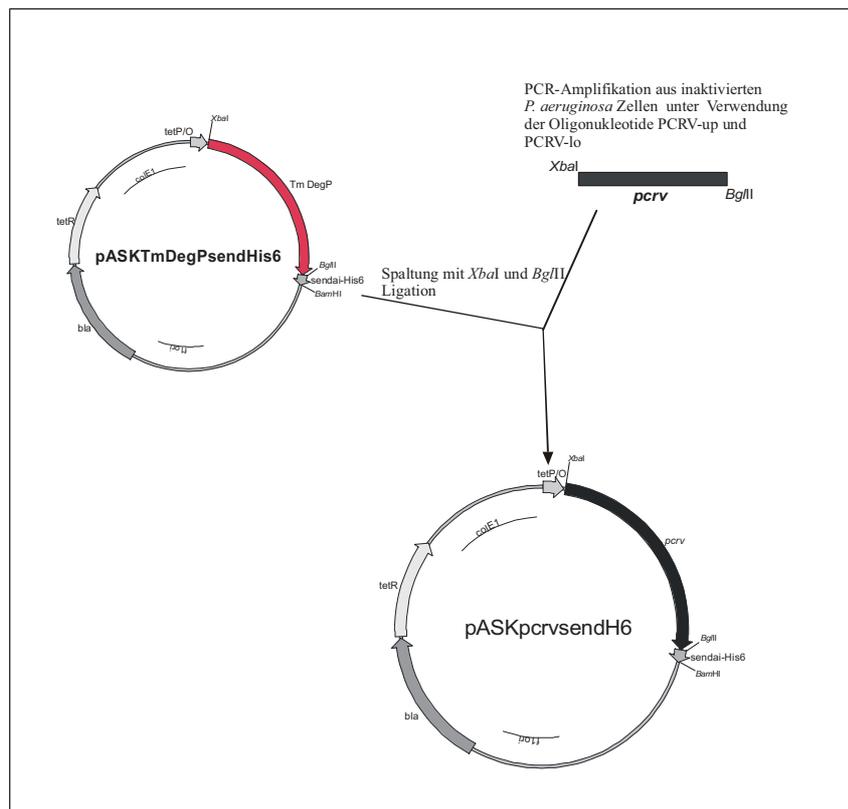


Abb. 4.26: Schematische Darstellung der Klonierung des *pcrv*-Gens. Das Gen wurde mittels PCR amplifiziert, wobei die Oligonukleotide die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *XbaI* und *BglII* einführen. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit *XbaI* und *BglII* gespalten und mit dem identisch geschnittenen Vektor pASKTmDegPsendHis6 ligiert. Das resultierende Plasmid pASKpcrvsendH6 kodiert für das *pcrv*-Gen unter Kontrolle der tet Promotor/Operatorregion mit C-terminalem Sendai-Epitop und 6 Histidinen.

Da es sich bei diesem Protein um einen Virulenzfaktor handelte, wurden alle Arbeiten mit den rekombinanten Bakterien unter Bedingungen der biologischen Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Das *pcrv*-Gen wurde aus abgetöteten *Pseudomonas aeruginosa* Zellen unter Verwendung der Oligonukleotide PCRV-up und PCRV-lo amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit *XbaI* und *BglII* geschnitten und in den ebenso gespaltenen Vektor pASKTmDegPsendHis6 ligiert. Dieser Vektor enthielt das für die DegP-Protease kodierende Gen aus *Thermotoga maritima*. Durch den Verdau mit den beiden Enzymen wurde dieses Gen ausgeschnitten. Das nach der Ligation entstandene Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus dem PcrV und

C-terminalem Sendai-Epitop und 6 Histidinen unter Kontrolle des Tetracyclin-promotors. Nach der Ligation wurde mit diesen Plasmiden *E. coli* DH5 ζ transformiert (Elektroporation). Positive Transformanten wurden durch eine Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden PCRV-up und PCRV-loneu identifiziert. Von 4 Klonen, die ein Plasmid mit dem *pcrv*-Gen enthielten, wurde die Vektor-DNA isoliert und unter Verwendung der Oligonukleotide pASK-upIR und pASK-downIR auf einem Licor-DNA Sequenziergerät von beiden Richtungen (5' und 3') sequenziert. Es stellte sich heraus, dass einer der vier Klone für ein korrektes PcrV-Protein kodierte.

Das C-terminale Sendai Epitop (vergl. Abb. 4.26) war notwendig, um die oberflächenpräsentierten Bibliotheken nach Bindemolekülen gegen das PcrV zu durchmustern. Für andere Untersuchungen des Proteins, wie z.B. der Strukturanalyse durch Röntgenkristallographie, ist das Epitop hinderlich. Daher wurde ausgehend von dem positiven Klon ein weiterer erstellt, bei dem die für das Sendai-Epitop kodierende DNA deletiert wurde. Dies konnte durch einfaches Spalten mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI/*Bgl*II und anschließender Religation erfolgen. Die überhängenden Enden, die durch Spalten mit diesen beiden Enzymen entstehen, sind kompatibel.

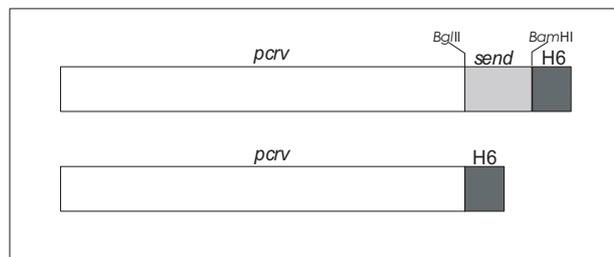
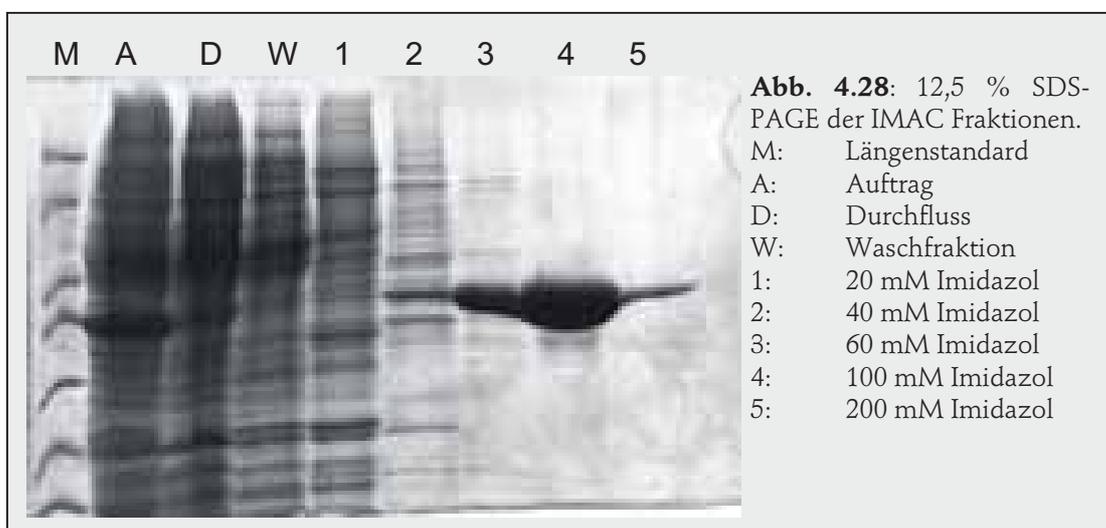


Abb. 4.27: Schematische Darstellung der beiden hergestellten *pcrv*-Gene. Ein Gen sollte für die Produktion des Proteins zur Durchmusterung der Bibliotheken dienen (mit Sendai-Epitop), das andere wurde durch Spalten des Vektors pASKpcrvsendH6 mit *Bgl*II und *Bam*HI und anschließender Religation erhalten. Diesem Gen fehlte die kodierende Sequenz für das Sendai-Epitop.

Um das Protein zu reinigen wurde eine 1l Kultur DH5 ζ / pASKpcrvsendH6 angezogen und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 mit Anhydrotetracyclin für 18 Stunden induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels *french pressing* aufgeschlossen. Der Überstand wurde über immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt (s. Abb. 4.28).



Die 100 und 200 mM Imidazol Fraktionen wurden vereinigt und gegen 20 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) dialysiert. Anschließend wurde das PcrV-SendH6 Protein mittels Anionenaustauschchromatographie weiter gereinigt. Dies geschah bei unterschiedlichen Präparationen wahlweise mit einer *Pharmacia FPLC-Anlage* oder mit einer *Biocat-Vision Workstation* (vergl. Methode 3.3.5). Die Abbildung 4.29 zeigt eine typische Reinigung mit der *Pharmacia Anlage*. Der Laufpuffer A war 20 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), der Elutionspuffer B war 1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0).

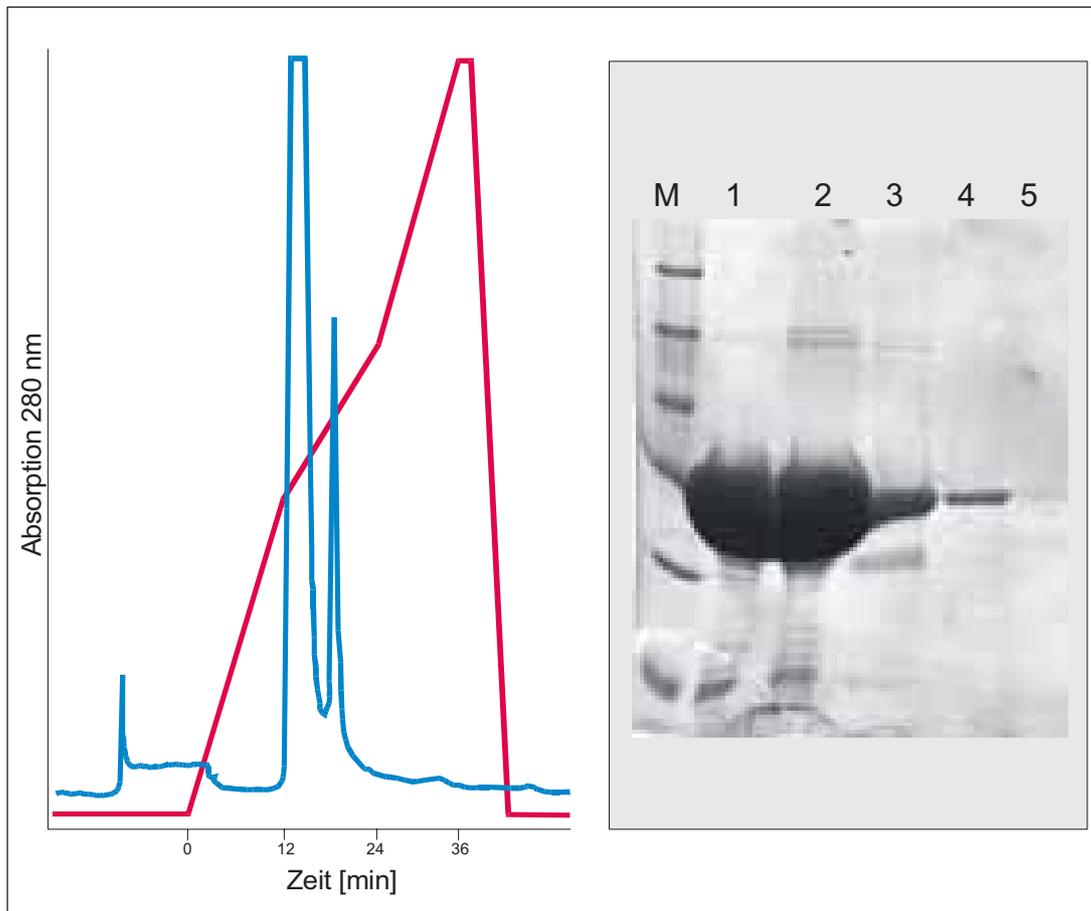


Abb. 4.29: Reinigung von PcrV-SendH6 durch Anionenaustauschchromatographie mit der *Pharmacia-FPLC Anlage*. Verwendet wurde eine MonoQ-Säule (vergl. 3.3.5). Links: Chromatogram (durchgepaust). Der NaCl Gradient (rot) ging von 20 mM (Laufpuffer A) bis 1 M. Die bei 280 nm gemessene Absorption ist blau wiedergegeben. Das Programm lautete: 0 min, 0% B; 12 min, 40% B; 24 min, 60% B; 35 min 100% B; 40 min, 0% B; Flußgeschwindigkeit 2 ml/min. Rechts: 12,5 % SDS-PAGE der Fraktionen aus dem Bereich des Absorptionsgipfels des Chromatographielaufes. M, Längenstandard; 1-5 gesammelte Fraktionen.

Die Abbildung 4.28 zeigt, dass die IMAC Fraktionen nahezu kein weiteres Protein enthielten. Auch der zweite große Absorptionsgipfel enthielt das PcrV-SendH6 (Abb. 4.28 rechts Spur 4). In den Spuren 1-3 (Abb. 4.29 rechts) sind deutlich kürzere Banden zu sehen, die wahrscheinlich auf Abbau des Proteins beruhen. Diese Banden beinhalten aber nur einen geringen Teil der gesamten Proteinmenge.

Nach der Chromatographie wurde die Konzentration des gereinigten Proteins bestimmt und das PcrV-SendH6 eingelagert (vergl. 3.3.9). Die Ausbeuten betragen bei allen Reinigungen zwischen 30 mg und 40 mg Protein pro Liter Bakterienkultur. Die Abbildung 4.30 zeigt die Reinigung der IMAC-Fractionen mit einer *Biocat Vision Workstation*.

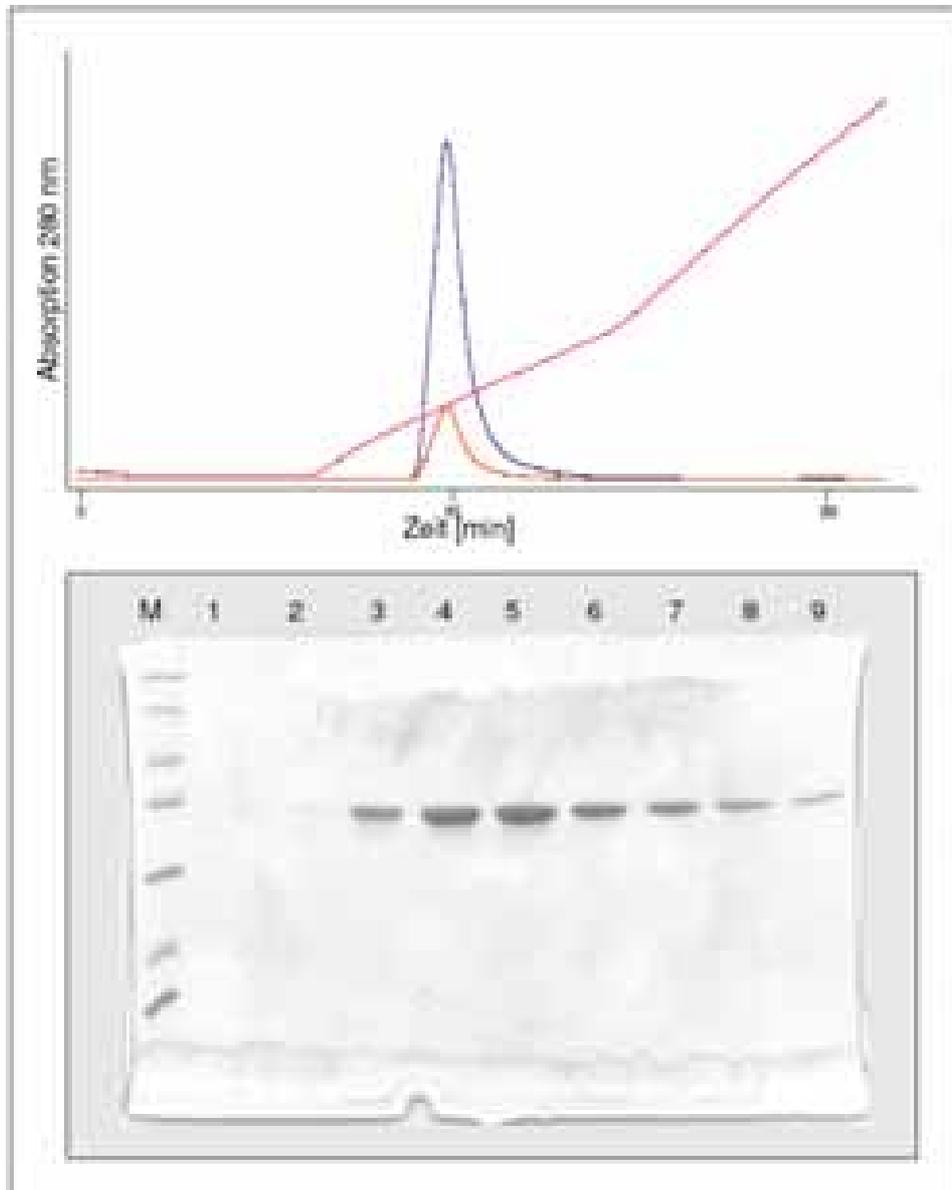


Abb. 4.30: Reinigung der IMAC-Fractionen durch Anionenaustauschchromatographie mit der *Biocat-Vision Workstation*. Oben: Chromatogram der Reinigung, die Absorption bei 280 nm ist in blau eingezeichnet, die bei 260 nm in rot. Die Leitfähigkeit (T^{-1} , entspricht dem tatsächlich vorliegenden NaCl Gradienten) ist in mangenta dargestellt. Die Säule war mit einem HQ-Poros Material gepackt (7,8 ml). Der Laufpuffer war 20 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). Das Programm lautete: Gradient 1 von 2% A, 98 % C nach 2 % A, 10 % B, 88 % C in 8 Säulenvolumen; Gradient 2 von 2 % A, 10 % B, 88 % C nach 2 % A, 33 % B, 65 % C in 8 Säulenvolumen; Flußgeschwindigkeit 5 ml/min. A, 1 M Tris pH 8; B 3 M NaCl; C, H_2O . Unten: 12,5 % SDS-PAGE der eluierten Fractionen. M, Längenstandard; 1-9, Fractionen aus dem Bereich des Absorptionsgipfels (oben).

Beide Methoden der Anionenaustauschchromatographie waren erfolgreich und lieferten gleich gute Ergebnisse. Die in Abb. 4.29 unten sichtbaren Abbauprodukte kann man in Abb. 4.30 nicht erkennen. Allerdings ist die Menge des aufgetragenen Proteins auch deutlich geringer. Die Proteinmenge in Abb. 4.30 unten entspricht in etwa der in Abb. 4.29 Spur 4, wo ebenfalls keine Abbauprodukte sichtbar sind. Auffällig ist jedoch, dass das PcrV-SendH6 bei Verwendung des HQ-Poros Materials bei niedrigerer NaCl Konzentration eluierte.

4.2.5 Durchmusterung der Mikroprotein/Peptid Bibliotheken nach Molekülen mit definierten Bindungseigenschaften

Die Reinigung des *Pseudomonas aeruginosa* PcrV Proteins mit C-terminalem Sendai-Epitop und Hexa-Histidinanhängsel ließ sich problemlos bewältigen (s.o.). Es standen für die nachfolgend beschriebenen Experimente, die das Ziel hatten, aus den in Abschnitt 4.2.2 hergestellten Bibliotheken Moleküle mit neuen definierten Bindungseigenschaften zu isolieren, ausreichende Mengen des Proteins zur Verfügung. Die Vorgehensweise zur Isolierung von Bindemolekülen sollte ähnlich wie bei der Isolierung von epitopräsentierenden Bakterien sein (vergl. Abschnitte 4.1.1 ff). Die Abbildung 4.31 veranschaulicht schematisch die Vorgehensweise zur Markierung der Bakterien.

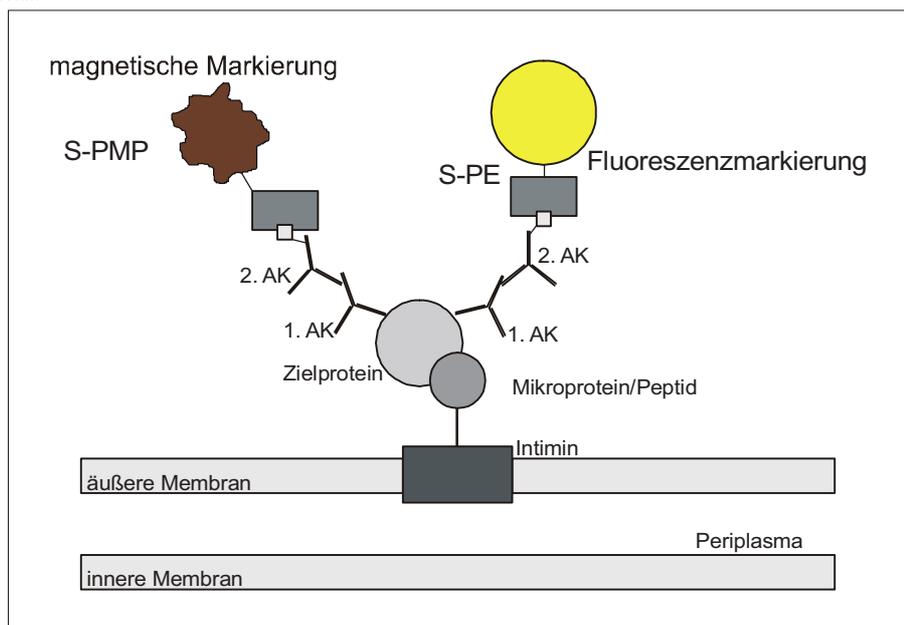
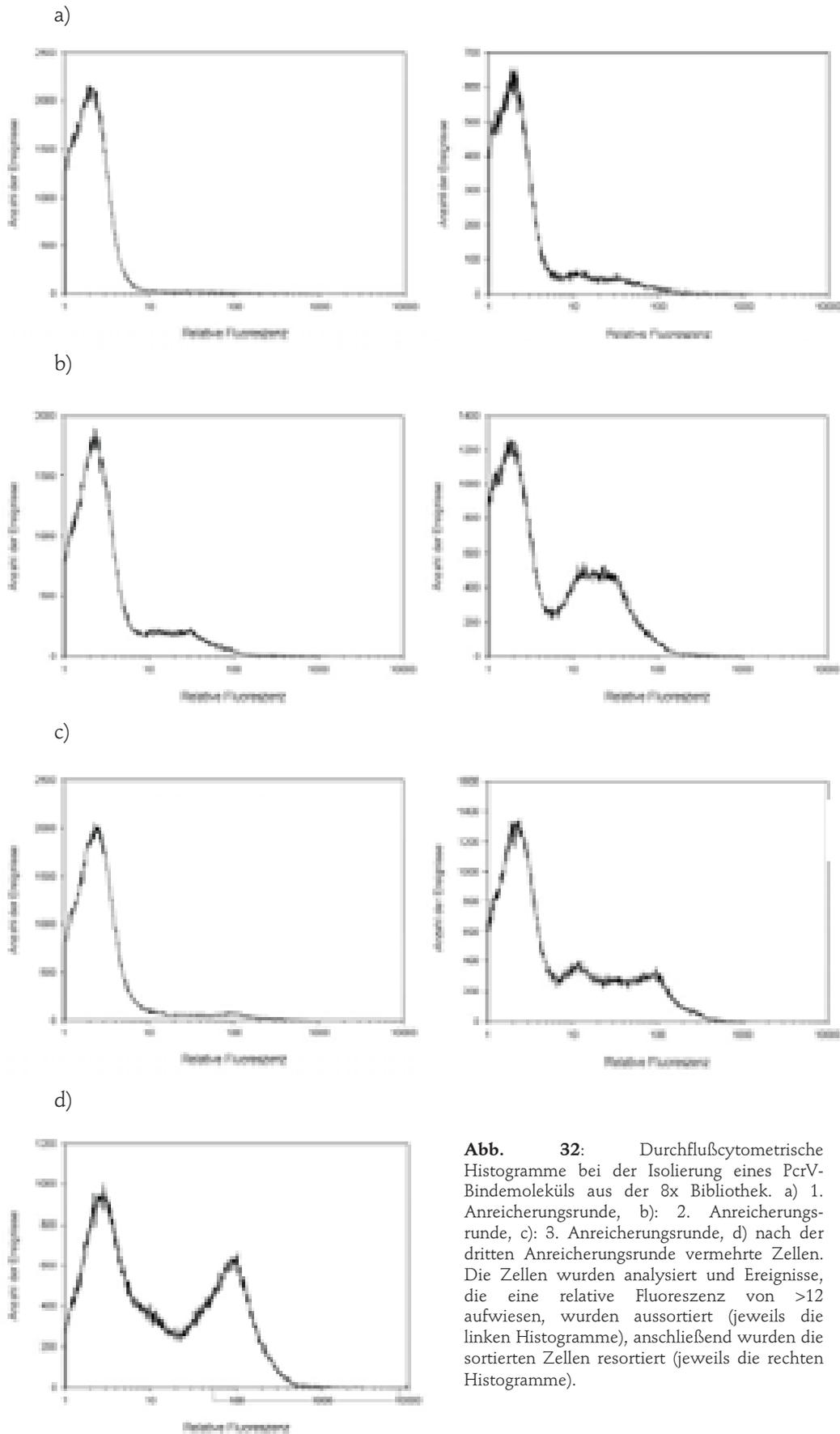


Abb. 4.31: Schematische Darstellung der Markierung von Mikroprotein/Peptid präsentierenden Bakterien. Die induzierten Zellen werden mit dem Zielprotein (hier PcrV-SendH6) inkubiert, anschließend mit dem 1. AK (hier der monoklonale anti-Sendai-Antikörper), daraufhin mit dem 2. AK (hier ein polyklonales anti-Maus Serum [Biotinkonjugat]). Wenn die Zellen ein Mikroprotein/Peptid auf ihrer Oberfläche präsentieren, das mit dem Zielprotein interagiert, so wird über das Protein und die Antikörper Biotin auf den Bakterien deponiert. Isolierbar werden die Zellen anschließend durch wahlweise Inkubation mit Streptavidin-paramagnetischen-Partikeln (für magnetische Zellsortierung), oder mit Streptavidin-R-Phycoerythrin (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung). 1. AK, anti-Sendai Antikörper; 2. AK, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat); S-PE, Streptavidin-R-Phycoerythrin; S-PMP, Streptavidin-paramagnetische-Partikel.

Zuerst wurde die 8x Bibliothek nach Bindungspartnern des in Abschnitt 4.2.4 gereinigten PcrV-SendH6 durchmustert. Dazu wurden bei der 1. Anreicherungsrunde $8 \Delta 50$ ml dYT mit $1,4 \Delta 10^9$ lebenden Zellen der 8x Bibliothek beimpft. Die Kulturen wurden bis zu einer $OD_{600}=0,4$ wachsen gelassen und anschließend für 1h mit Anhydrotetracyclin induziert. Anschließend wurden die Zellen für 3 h auf Eis gelagert und dann fluoreszenzmarkiert. Die Konzentration des PcrV-SendH6 bei der Markierung betrug $2,2 \Delta 10^{-5}$ M. Die induzierten Bakterien wurden für 10 min mit dem Protein auf Eis inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurden sie mit dem anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. In der ersten Sortierrunde wurden insgesamt $1,2 \Delta 10^9$ Ereignisse im Durchflußcytometer analysiert, und $2,2 \Delta 10^7$ Ereignisse, die eine höhere relative Fluoreszenz als 12 aufwiesen, wurden aussortiert (s. Abb. 32 a) und plattiert. Von diesen Ereignissen bildeten $1,3 \Delta 10^7$ eine Kolonie (60 %). Die Kolonien wurden am nächsten Tag von den Platten abgeschwemmt und die Zellen erneut angeimpft, induziert und markiert. Insgesamt wurden in der zweiten Runde $1,3 \Delta 10^8$ Zellen analysiert, davon wurden $1,5 \Delta 10^7$ Ereignisse, die in die Fluoreszenzkanäle >12 fielen, aussortiert und anschließend resortiert (s. Abb. 4.32 b). Insgesamt wurden $5 \Delta 10^6$ Ereignisse plattiert, davon bildeten $2,2 \Delta 10^5$ eine Kolonie (4,4 %). Es wurden noch zwei weitere Anreicherungsrounden in genau der gleichen Art durchgeführt. Nach der dritten Runde wurden 21.000 Kolonien erhalten. Von diesen Zellen wiesen nach Induktion und Markierung 46 % eine relative Fluoreszenz >12 auf (s. Abb. 32 d). Somit hatte eine Anreicherung fluoreszierender Bakterien stattgefunden. Dies bedeutete allerdings nicht automatisch, dass unter den angereicherten Bakterien auch solche sind, die ein 8x Peptid präsentierten, welches mit dem Zielmolekül PcrV-SendH6 interagiert. Vielmehr konnte die Bindung auch mit allen anderen bei der Markierungsreaktion verwendeten Komponenten erfolgen. Es konnten unter den isolierten Klonen also sowohl solche sein, die mit PcrV-SendH6, mit dem anti-Sendai Antikörper, mit Antikörpern aus dem polyklonalen anti-Maus-Serum (Biotinkonjugat) oder mit Streptavidin-R-Phycoerythrin interagierten. Um zu untersuchen, wie die Verteilung der angereicherten Klone bezüglich ihrer Bindungseigenschaften zu den oben genannten Proteinen ist, wurde die induzierte Population nach der 3. Anreicherungsrunde (Abb. 4.32 d) separat mit den einzelnen Komponenten markiert (s. Abb. 4.33).



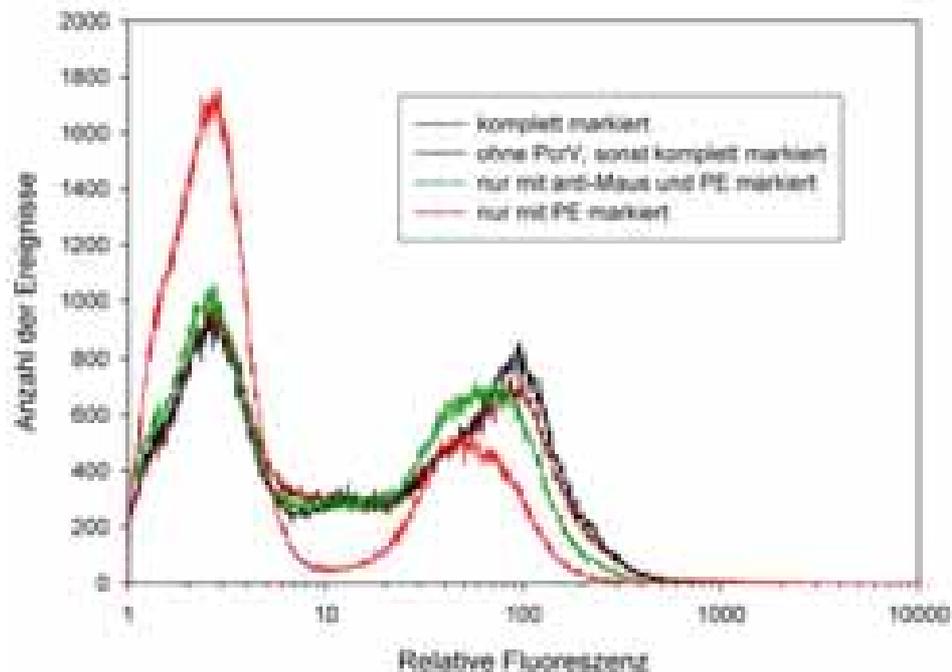
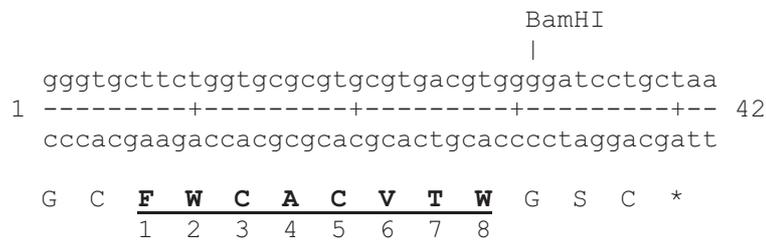


Abb. 4.33: Übereinandergelegte Histogramme durchflußcytometrischer Analysen der Zellpopulation nach drei Anreicherungsrounds. Braun: Zellpopulation markiert mit PcrV-SendH6, anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin; schwarz: Zellpopulation markiert mit anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin; grün: Zellpopulation markiert mit anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin; rot: Zellpopulation markiert mit Streptavidin-R-Phycoerythrin. PE in der Legende: Streptavidin-R-Phycoerythrin.

Die Abbildung 4.33 zeigt das Ergebnis der unterschiedlichen Markierungsreaktionen der angereicherten Zellpopulation (s.o.). Das braune, schwarze und das grüne Histogramm unterscheiden sich nicht wesentlich. Auffällig ist das rote Histogramm (Zellen nur mit Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert). Aus ihm geht hervor, dass Bakterien isoliert wurden, die ein Peptid präsentierten, das entweder an Streptavidin oder an das konjugierte Phycoerythrin bindet. Weiterhin ist aus den Histogrammen zu sehen, dass es Bakterien gibt, die Peptide präsentieren, welche von Antikörpern aus dem polyklonalen anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) erkannt werden. Diese Zellen liegen im Bereich einer relativen Fluoreszenz zwischen 6 und 20 (Abb. 4.33). Bei der Markierung nur mit Streptavidin-R-Phycoerythrin sind in diesem Fluoreszenzbereich fast keine Ereignisse analysiert worden, bei allen drei anderen Markierungen fallen in etwa gleich viele Ereignisse in diesen Bereich. Durch die unterschiedliche Markierung können diese Ereignisse erhöhter relativer Fluoreszenz eindeutig dem anti-Maus-Serum (Biotinkonjugat) zugewiesen werden. Diese Bakterien wurden nicht weiter untersucht. Der Abschnitt 4.1 dieser Arbeit hat gezeigt, dass sich durch intimin-vermittelte Zelloberflächenpräsentation von Proteinfragmenten Epitope von polyklonalen Seren kartieren lassen. Es ist plausibel anzunehmen, dass sich durch

Präsentation von zufallsmäßig zusammengesetzten Peptiden solche isolieren lassen, die eine Kreuzreaktion der Antikörper hervorrufen, sofern die Diversität der Peptide groß genug ist. Interessant schienen hingegen die Bakterien, die ein Peptid präsentierten, das entweder an das Streptavidin oder an das Phycoerythrin bindet. Solche Peptide wären für verschiedene Anwendungen interessant. So könnte ein phycoerythrinbindendes Peptid für viele Nachweisreaktionen eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurden die Ereignisse einer relativen Fluoreszenz >20 in Abb. 33, rote Kurve (vorherige Seite), aussortiert und plattiert. Am nächsten Tag wurden Einzelklone von dieser Sortierung angeimpft, induziert und mit Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert. Von acht Klonen, bei denen durch Fluoreszenzmikroskopie eine Bindung von Streptavidin-R-Phycoerythrin an die Zelloberfläche nachgewiesen wurde, wurde die Plasmid-DNA präpariert. Anschließend wurden diese Plasmide unter Verwendung des IRD-800 markierten Oligonukleotids Etag-seq-up auf einem Licor Sequenziergerät sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass alle 8 Klone das gleiche Peptid präsentierten. Die DNA und die Peptid Sequenz lautete:



Der randomisierte Peptidbereich (vergl. auch Abb. 4.23) ist in Fettdruck und unterstrichen wiedergegeben. Der Bereich der Zufallssequenz ist hydrophob. Von den acht Aminosäuren sind drei aromatisch. Die Positionen #1, #2 und #8 werden von einem Phenylalanin und je einem Tryptophan eingenommen. Auch die anderen Aminosäuren sind ungeladen. Zusätzlich zu den zwei konstanten Cysteinen, die die randomisierte Sequenz flankierten, waren zwei weitere in der Sequenz enthalten (Positionen #3 und #5). Dadurch ergeben sich weitere denkbare Konformationen des Peptids. Die flankierenden Cysteine können nicht nur untereinander eine Disulfidbrücke bilden, sondern ebensogut mit den Cysteinen aus dem Schleifenbereich. Somit ergeben sich fünf verschiedene Möglichkeiten der Disulfidverknüpfung der kurzen Peptidschleife. Ob überhaupt eine Oxidation der Cysteine für die Bindung an Streptavidin-R-Phycoerythrin notwendig war, konnte aus den vorliegenden Daten nicht abgelesen werden.

Um zu bestimmen, ob die Bindung des Peptids an R-Phycoerythrin oder an Streptavidin erfolgte, wurde der Klon angeimpft und induziert. Anschließend wurden die Bakterien mit R-Phycoerythrin (kein Streptavidinkonjugat) fluoreszenzmarkiert und im Durchflußcytometer analysiert. Wenn das Peptid mit Streptavidin interagiert, sollten die Zellen keine erhöhte relative Fluoreszenz aufweisen. Wenn die Bindung aber an das R-Phycoerythrin erfolgte, so müßten die Bakterien fluoreszieren. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 4.34 dargestellt.

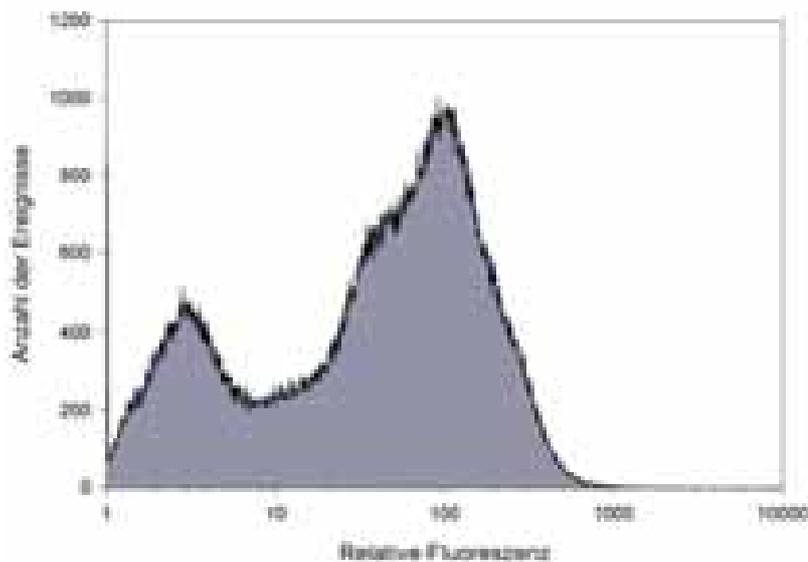


Abb. 4.34: Durchflußcytometrische Analyse des isolierten Klon, der mit Streptavidin-R-Phycoerythrin interagierte. Die Zellen wurden induziert und anschließend mit R-Phycoerythrin (kein Streptavidinkonjugat) markiert.

Aus der Abbildung 4.34 geht hervor, dass das isolierte Peptid mit Phycoerythrin und nicht mit Streptavidin interagierte. Die Zellen wiesen nach Markierung mit R-Phycoerythrin eine deutlich erhöhte relative Fluoreszenz auf. In diesem speziellen Experiment bindet ein Teil der Bakterien kein Phycoerythrin. Da es sich um einen Einzelklon handelte, ist dies entweder auf die Markierung oder auf unvollständige Induktion zurückzuführen. Somit wurde ein Peptid mit neuen Bindungseigenschaften isoliert. Es interagierte mit R-Phycoerythrin und wurde aufgrund dieser Eigenschaft im weiteren Verlauf dieser Arbeit als PhycoA Bindepeptid bezeichnet.

Das eigentliche Ziel dieses Anreicherungs-experiments war es, Peptide zu isolieren, die PcrV binden. Daher wurde versucht, aus der Population nach der 3. Anreicherungs-runde (vergl. Abb. 33, schwarze Kurve) einen Klon zu isolieren, der ein solches 8x Peptid präsentierte. Aus der Abb. 33 geht hervor, dass solche Klone in der Population noch nicht sehr stark angereichert sein konnten. Ihre Anreicherung auf die bis dorthin durchgeführte Weise war aufgrund der starken Anreicherung von Bakterien, die PhycoA präsentierte, auch nicht möglich. Durch Markierung mit PcrV-SendH6, anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin würden PhycoA präsentierte Zellen aufgrund ihrer Häufigkeit und ihrer hohen relativen Fluoreszenz bis zur Homogenität angereichert werden. Daher wurde die Population nur mit Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert und Ereignisse mit einer niedrigen relativen Fluoreszenz (zwischen zwei und drei) wurden aussortiert. Diese Zellen sollten kein PhycoA präsentieren. Die Gegenselektion von nicht fluoreszierenden Zellen wurde über zwei Anreicherungs-runden durchgeführt und anschließend wurde die daraus entstehende Population wieder mit PcrV-SendH6, anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass keine Bakterien angereichert werden konnten, die mit dem PcrV interagierten.

Somit ist es bei diesem ersten Anreicherungsexperiment nicht gelungen, Peptide aus der 8x Bibliothek zu isolieren, die in der Lage waren, an das Zielmolekül PcrV anzudocken. Demgegenüber wurde deutlich, dass das Prinzip der Isolierung von Peptiden mittels intiminbasierter Zelloberflächenpräsentation erfolgversprechend war. Es konnten Bakterien angereichert werden, die mit den Antikörpern aus dem anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) kreuzreagierten. Ebenso wurde das PhycoA Peptid isoliert, von dem nachgewiesen wurde, dass es mit R-Phycoerythrin interagiert (vergl. Abb. 4.34). Dieses isolierte PhycoA war für verschiedene Anwendungen, wo ein Nachweis mittels Fluoreszenz wünschenswert ist, interessant. Aus diesem Grund sollte dieses Peptid im weiteren Verlauf weiter charakterisiert werden. Weshalb keine Peptide isoliert wurden, die mit PcrV wechselwirkten, lässt sich nicht eindeutig aussagen. Es ist durchaus möglich, dass solche Peptide nicht in der Bibliothek vorhanden waren. Ebenso ist es denkbar, dass die Bindung so schwach ist, dass die Moleküle bis zur Sortierung von der Bakterienoberfläche abdiffundieren. Möglich wäre auch, dass die Klone während der Sortierung, insbesondere während der ersten Anreicherungsrounden, verloren wurden.

Diese erste Anreicherung zeigte, dass sehr schnell Moleküle mit neuen Bindungseigenschaften mittels der intiminvermittelten Zelloberflächenpräsentation von randomisierten Peptiden isoliert werden können. Sie verdeutlicht aber auch, dass die isolierten Peptide nicht unbedingt die gewünschten Eigenschaften aufweisen müssen. Vielmehr ist genau darauf zu achten, wie die Anreicherung experimentell durchgeführt wird, um möglichst zielgerichtet Moleküle mit den gesuchten Funktionen zu erhalten. Insbesondere müssen die Experimente so angelegt sein, dass eine Gegenselektion unerwünschter Bindungseigenschaften möglich ist.

Die Anreicherung wurde unter leicht veränderten experimentellen Bedingungen erneut durchgeführt. Die 6x und die 10x Bibliothek (vergl. Abb. 4.22) wurden noch nicht nach solchen Bindemolekülen durchmustert. Aber auch in der 8x Bibliothek konnten noch bindefähige Moleküle sein, die bei dem ersten Anreicherungsexperiment nicht isoliert wurden (s.o.). Die Durchmusterung wurde parallel mit allen drei Bibliotheken durchgeführt. Um zu verhindern, dass ein Peptid/Mikroprotein, das mit Streptavidin-R-Phycoerythrin wechselwirkt, während der Anreicherung isoliert wird, wurde dieses Mal mit magnetischer Zellsortierung begonnen. Somit ist kein Phycoerythrin während der ersten Anreicherungsrounden an der Markierung beteiligt (vergl. Abb. 4.31).

Für die erste Anreicherungsrounde wurden 2Δ500 ml dYT mit den 6x Bakterien und je 500 ml dYT mit den 10x und den 8x Bakterien beimpft. Die Kulturen wurden bei Erreichen einer OD_{600} von 0,5 mit Anhydrotetracyclin induziert. Nach einstündiger Induktion wurden die Bakterien für 3 h auf Eis inkubiert und anschließend wurden sie mit PcrV-SendH6, anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin paramagnetischen Partikeln markiert. Die so behandelten Bakterien wurden magnetisch sortiert (vergl. 3.4.7). Anschließend wurden die Bakterien plattiert. Es wurden Aliquots vor und nach der magnetischen Zellsortierung abgenommen und Verdünnungsausstriche durchgeführt. Die Anreicherung mittels magnetischer Zellsortierung wurde noch eine weitere Anreicherungsrounde durchgeführt. Die

Tabelle 4.6 faßt die Anzahl der untersuchten Bakterien bei der Zellsortierung zusammen.

	6x vor	6x nach	8x vor	8x nach	10x vor	10x nach
Sortierung 1	$2\Delta 10^9$	$3\Delta 10^7$	$9\Delta 10^9$	$5\Delta 10^6$	$3\Delta 10^9$	$1\Delta 10^6$
Sortierung 2	$8,2\Delta 10^8$	$7,1\Delta 10^5$	$5,1\Delta 10^8$	$1,7\Delta 10^6$	$7,4\Delta 10^8$	$1,2\Delta 10^6$

Tabelle 4.6: Anzahl der magnetisch sortierten Bakterien für die drei Bibliotheken jeweils bevor (vor, Anzahl magnetisch markierter Zellen) und nachdem (nach, Anzahl der von der Säule eluierten Zellen) die Zellen sortiert wurden.

Nach den zwei magnetischen Sortierungen wurden die erhaltenen Bakterienpopulationen vor der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung einer Gegenselektion gegen antikörperbindende Peptide unterzogen. Die Bakterien wurden ohne PcrV-SendH6 magnetisch markiert. Dadurch werden alle Bakterien, die ein Peptid/Mikroprotein auf ihrer Oberfläche präsentieren, das mit den Antikörpern der Markierungsreaktion interagiert, magnetisch markiert. Anschließend wurden diese Bakterien auf eine Magnetsäule aufgetragen und der Durchfluß, der nicht magnetische Zellen enthielt, wurde direkt mit PcrV-SendH6, anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden die so vorbereiteten Bakterien im Durchflußcytometer vermessen, und durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung wurden Ereignisse, die eine relative Fluoreszenz >12 aufwiesen, aussortiert und resortiert.

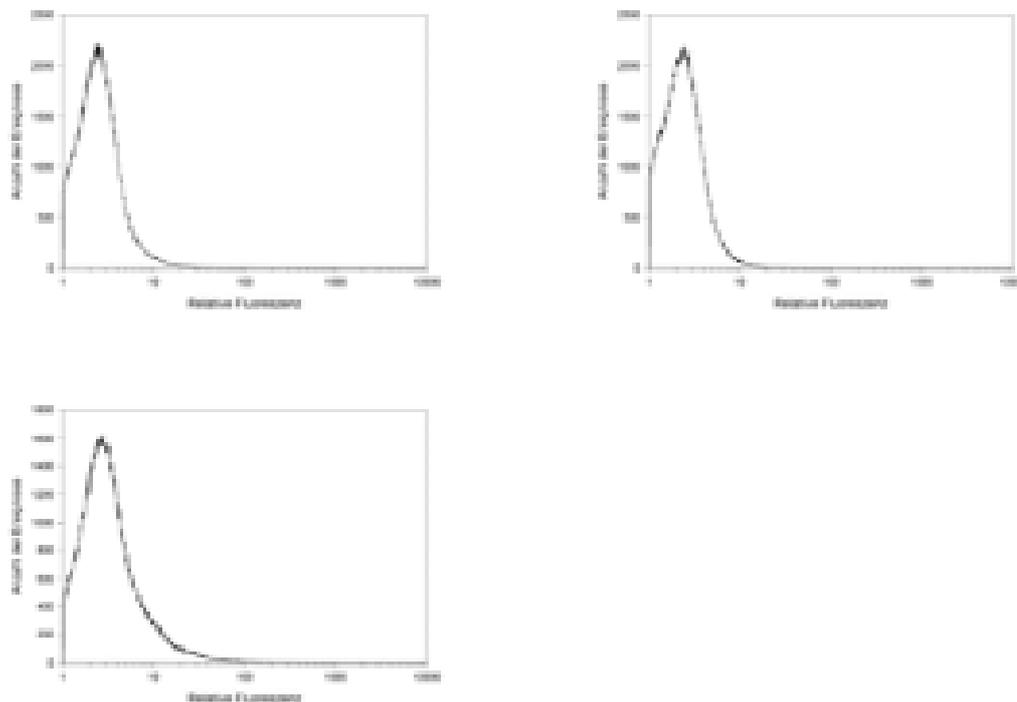


Abb. 4.35: Durchflußcytometrische Histogramme der Zellpopulationen nach zwei magnetischen Sortierungen (s. Tab. 4.6) und einer fluoreszenzaktivierten Zellsortierung. Oben links 6x Bibliothek, oben rechts 10x Bibliothek, unten 8x Bibliothek. Markierung mit PcrV-SendH6, anti-Sendai Antikörper, Anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin.

Nach dieser Sortierung wurden die Bakterien plattiert, am nächsten Tag abgeschwemmt, erneut induziert, wie oben beschrieben gegenselektiert und durch

Fluoreszenzmikroskopie und Durchflußcytometrie analysiert. In Abbildung 4.35 (vorherige Seite) sind die durchflußcytometrischen Analysen gezeigt. Nur in der angereicherten 8x Bibliothek konnten Bakterien mit einer erhöhten relativen Fluoreszenz festgestellt werden. Demgegenüber konnten keine Ereignisse erhöhter relativer Fluoreszenz in den Populationen der 6x und 10x Bibliotheken gemessen werden. Auch bei der Analyse im Fluoreszenzmikroskop konnten in den beiden Populationen der Mikroproteinbibliotheken keine Zellen mit einer erhöhten Fluoreszenz identifiziert werden. In der Population der angereicherten 8x Bibliothek ließen sich bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse Bakterien mit leicht erhöhter Fluoreszenz erkennen. Diese Bakterien wurden aussortiert (vergl. Abb. 4.35 unten links) und plattiert. Am nächsten Tag wurden 10 Einzelklone angeimpft, induziert und mit PcrV-SendH6, anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse dieser 10 Klone stellte sich heraus, dass einer eine erhöhte Fluoreszenz durch die Markierung aufwies. Anschließend wurden induzierte Zellen dieses Klons einmal mit anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin und einmal mit PcrV-SendH6, anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert. Die Bakterien, die mit PcrV-SendH6 und die ohne dieses Protein markiert wurden, wurden anschließend nacheinander im Durchflußcytometer vermessen. In Abb. 4.36 sind die Histogramme dieser Analyse abgebildet.

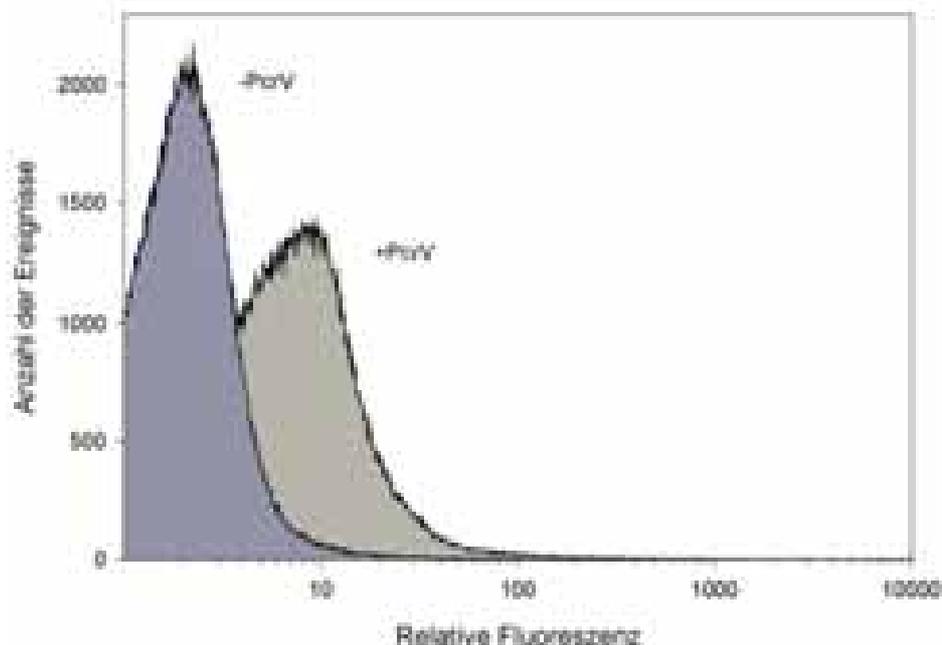


Abb. 4.36: Durchflußcytometrische Histogramme des isolierten 8x Klons markiert mit und ohne PcrV-SendH6. Induzierte Zellen des isolierten Klons wurden einmal ohne PcrV-SendH6 aber mit anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert (dunkle Kurve) und einmal mit PcrV-SendH6, anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert (helle Kurve).

Aus der Abbildung 4.36 wird ersichtlich, dass der isolierte Klon ein Peptid präsentierte, das ausschließlich mit dem PcrV-Protein interagiert. Die Zellen wiesen nur dann eine erhöhte relative Fluoreszenz auf, wenn als erste Komponente PcrV-SendH6 in der Markierungsreaktion verwendet wurde. Daher konnte eine Interaktion mit den anderen Komponenten, die bei der Fluoreszenzmarkierung eingesetzt wurden, ausgeschlossen werden. Von diesem Klon wurde die Plasmid-DNA präpariert und unter Verwendung des IRD-800 markierten Oligonukleotids Etag-seq-up auf einem Licor Sequenziergerät sequenziert. Die Sequenz des im weiteren Verlauf dieser Arbeit als PC9A bezeichneten Peptids und der kodierenden DNA lautete:

```

                                BamHI
                                |
GGGTGCGAGTGGTTGATCTTGCTCATCATGGGATCCTGCTAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----
CCCACGCTCACCAACTAGAACGAGTAGTACCCTAGGACGATT
G C E W L I L L I M G S C * -

```

Die flankierenden Cysteine, die acht randomisierten Reste und die durch Einfügen der *Bam*HI Schnittstelle entstehenden Reste Glycin und Serin sind hervorgehoben. Im Gegensatz zu dem vorher isolierten Peptid PhycoA enthielt das PC9A keine zusätzlichen Cysteinreste in der Schleifenregion. Ebenso wie schon das PhycoA weist die Schleife einen hohen Anteil an hydrophoben Resten auf. Lediglich an der ersten randomisierten Position befand sich ein geladener Rest (Glutamat). Somit wurden bei den Anreicherungen zwei 8x Peptide isoliert, eines, das mit dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff interagiert (PhycoA) und eines, das in der Lage war, mit dem Zielprotein PcrV-SendH6 zu interagieren. Es hätten auch Moleküle isoliert werden können, die von den Antikörpern aus dem polyklonalen anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) erkannt werden (vergl. Abb. 4.33, grüne, braune und schwarze Kurve). Es wurden keine Moleküle gefunden, die eine Kreuzreaktion des anti-Sendai Antikörpers hervorgerufen hätten. Somit wurden mit Ausnahme des monoklonalen Antikörpers gegen alle bei der Markierung eingesetzten Komponenten bindefähige Moleküle aus der 8x Bibliothek isoliert. Es wurden keine Mikroproteine aus der 6x und der 10x Bibliothek gefunden, die in der Lage waren, an das Zielmolekül PcrV anzudocken. Dies war insofern verwunderlich, da die 6x Bibliothek die größte Diversität aufwies (vergl. Tab. 4.5). Aus den bislang durchgeführten Experimenten kann allerdings nicht abgeleitet werden, dass keine Bindemoleküle gegen die bei der Markierung eingesetzten Komponenten enthalten waren. Bei der Durchmusterung der beiden Mikroproteinbibliotheken wurde zuerst magnetisch sortiert. Dadurch wurden keine Bakterien isoliert, die über ein präsentierte Peptid mit dem Phycoerythrin wechselwirkten. Bei der anschließenden fluoreszenzaktivierten Zellsortierung wurde stringent gegen solche Moleküle selektiert, die von den Antikörpern erkannt werden. Somit konnten bei der Anreicherung, die mit den Mikroproteinbibliotheken durchgeführt wurde, nur PcrV Bindemoleküle oder solche, die von dem anti-Sendai Antikörper gebunden werden, isoliert werden. Solche Mikroproteine wurden nicht gefunden.

Dass die Mikroproteinbibliothek eine hinreichende Diversität für die Isolierung von Bindemolekülen aufwies, wurde in einem anderen Experiment verifiziert, bei dem ein

Bindepeptid isoliert wurde (in Zusammenarbeit mit Dr. H. Kolmar). Dieses Mikroprotein interagiert wie PhycoA mit Streptavidin-R-Phycoerythrin. Um zu untersuchen, ob dieses Mikroprotein wie schon das 8x Peptid PhycoA an das R-Phycoerythrin andockte, wurde der Klon angeimpft, induziert und anschließend wurde ein Aliquot der Bakterien mit Streptavidin-R-Phycoerythrin und ein zweites mit R-Phycoerythrin (kein Streptavidinkonjugat) markiert. Anschließend wurden die Bakterien im Durchflußcytometer analysiert (s. Abb. 4.37).

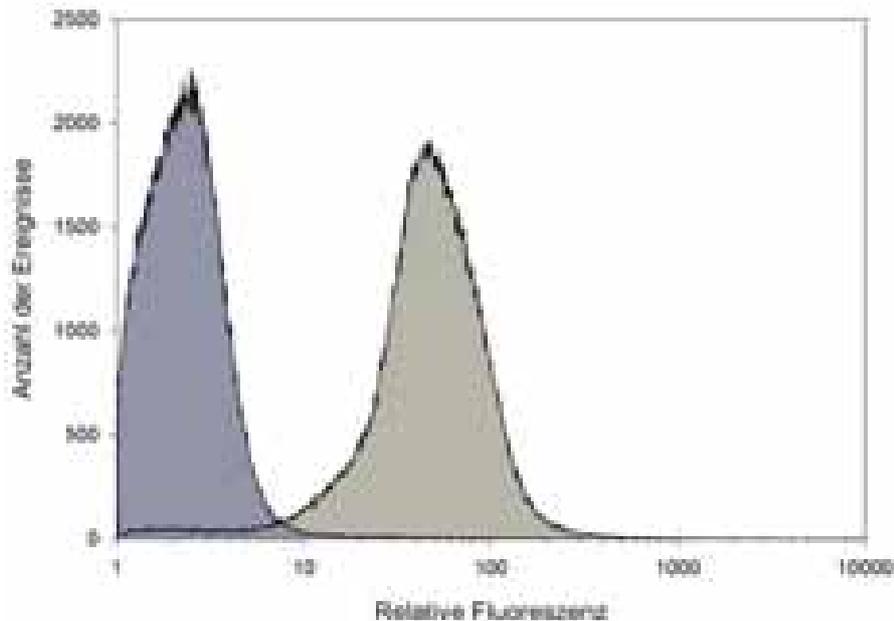


Abb. 4.37: Durchflußcytometrische Analyse des isolierten Klon, der ein Mikroprotein präsentierte, das mit Streptavidin-R-Phycoerythrin interagiert. Die dunkle Kurve ist die Vermessung von induzierten Zellen markiert mit Phycoerythrin (kein Streptavidinkonjugat). Die helle Kurve gibt die Analyse von induzierten Zellen die mit Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert wurden wieder.

Aus der Abbildung 4.37 geht hervor, dass der Klon ein Mikroprotein präsentierte, das augenscheinlich an Streptavidin andockte. Allerdings bestand noch die Möglichkeit, dass das Mikroprotein mit einer Grenzfläche des Konjugates interagiert und so beide Proteine für die Interaktion notwendig waren. Von diesem Klon wurde die Plasmid-DNA isoliert und unter Verwendung des Oligonukleotids Etag-pvuII-up sequenziert. Die DNA und die Peptidsequenz dieses Mikroproteins, das aufgrund seiner Eigenschaften im weiteren Verlauf als Strep1 bezeichnet wurde, lautete:

```
GGGTGCCGGCCGGTGTGGGTGATGTGCAAACAGGACTCCGTCTGCCTGGCTGGCTGCGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCACGGCCGGCCACACCCACTACACGTTTGTCTGAGGCAGACGGACCGACCGACGCAA
G C R P V W V M C K Q D S V C L A G C V -
                BamHI
                |
TGCGGGCCCAACGGTTTCTGCGGATCCTAA
-----+-----+-----+
ACGCCGGGTTGCCAAAGACGCCTAGGATT
C G P N G F C G S *
```

Der variante Teil zwischen den Cysteinen #2 und #9 ist hervorgehoben. Um zu überprüfen, ob die Aminosäuren der varianten Inhibitorschleife mit der Bindungstasche des Streptavidins interagierten, wurde der Klon angeimpft und induziert. Nach der Induktion wurden die Bakterien mit Streptavidin-R-Phycoerythrin fluoreszenzmarkiert und in zwei Aliquots aufgeteilt. Eines der beiden Aliquots wurde noch mit Biotin versetzt (10 mM Endkonzentration) und anschließend wurden beide für 15 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die beiden Aliquots mit PBS gewaschen und separat im Durchflußcytometer analysiert (s. Abb. 4.38).

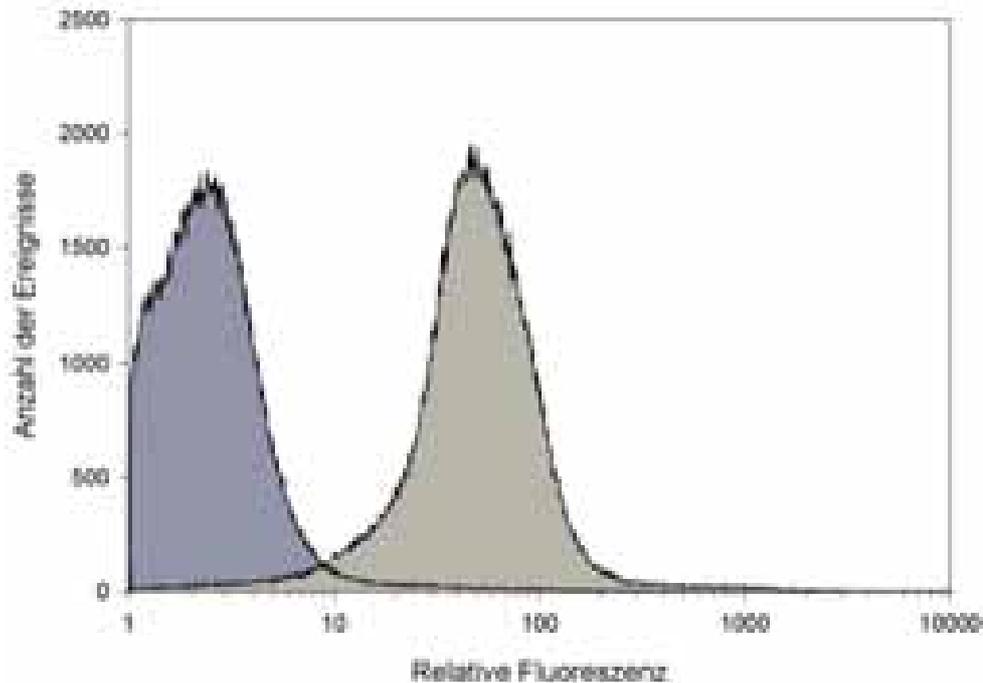


Abb. 4.38: Durchflußcytometrische Analysen von Strep1 präsentierenden Bakterien. Die induzierten Bakterien wurden mit Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert. Anschließend wurden sie in zwei Teile aufgeteilt und ein Teil wurde bis zu einer Endkonzentration von 10 mM mit d-Biotin versetzt. Daraufhin wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert, mit PBS gewaschen und im Durchflußcytometer analysiert. Helle Kurve: Strep1 Präsentierende Bakterien markiert mit Streptavidin-R-Phycoerythrin. Dunkle Kurve: Strep1 Präsentierende Bakterien markiert mit Streptavidin-R-Phycoerythrin, nach der Markierung in d-Biotin Lösung inkubiert.

Aus Abbildung 4.38 geht hervor, dass das Streptavidin-R-Phycoerythrin nach Zugabe von Biotin von den Zellen abdissoziierte (dunkle Kurve Abb. 4.38). Dies deutet daraufhin, dass die Bindung des Mikroproteins an die Biotin-Bindungstasche des Streptavidins erfolgt. Durch die sehr hohe Affinität des Biotins zu Streptavidin ($K_D 10^{-15}$ M) werden sämtliche Bindungsstellen des Streptavidins nach und nach mit Biotin besetzt, das Mikroprotein verdrängt, und das Molekül diffundiert von der Zelloberfläche.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass in diesem Abschnitt sowohl Mikroproteine als auch Peptidschleifen mit neuen Bindungseigenschaften isoliert werden konnten. Es konnte gezeigt werden, dass sich die intimvermittelte

Zelloberflächenpräsentation von randomisierten Mikroproteinen/Peptiden zur Isolierung von Molekülen mit neuen Bindungseigenschaften eignet. Es wurde ein Peptid isoliert, das in der Lage ist, R-Phycoerythrin zu binden (PhycoA), eines, das mit dem Pathogenitätsfaktor PcrV aus *P. aeruginosa* wechselwirkte (PC9) und ein Mikroprotein, das mit seiner varianten Schleife in die Bindungstasche von Streptavidin dockt (Strep1).

4.2.6 Analyse der isolierten Peptide PhycoA, PC9A und des Mikroproteins Strep1

Das Ziel der nachfolgenden Experimente war, die in Abschnitt 4.2.5 isolierten Peptide bezüglich ihrer Eigenschaften gegenüber ihren Bindungspartnern näher zu charakterisieren.

4.2.6.1 Durchflußcytometrische Analysen der Peptide PhycoA und PC9A sowie davon abgeleiteter Varianten

Die 8x Bibliothek war so beschaffen, dass die acht randomisierten Aminosäuren von je einem Cystein auf jeder Seite flankiert wurden. Diese Cysteine sollten die varianten Reste zu einer Schleife aufspannen und ihnen somit eine gewisse Konformation, die nicht so eingeschränkt ist wie bei den Mikroproteinschleifen, geben (vergl. Abschnitt 4.2.1). Die 8x Gene waren so angelegt, dass ihre Sequenz durch das Oligonukleotid C-Mix8-Cup in den Bereich der kodierenden Sequenz für die Inhibitorschleife des *eti*-Gens gelegt wurde (vergl. Abschnitt 4.2.2). Dieses Oligonukleotid führte zusätzlich eine *Bam*HI Schnittstelle vor die für das zweite Cystein kodierende DNA-Sequenz ein. Weiterhin wurde durch dieses Oligonukleotid ein Stoppcodon hinter das Codon für das terminale Cystein definiert, um die Translation in das *eti*-Gen zu verhindern. Dieser Sequenzbereich ist hier für alle 8x Klone exemplarisch anhand der Sequenz des PC9A gezeigt:

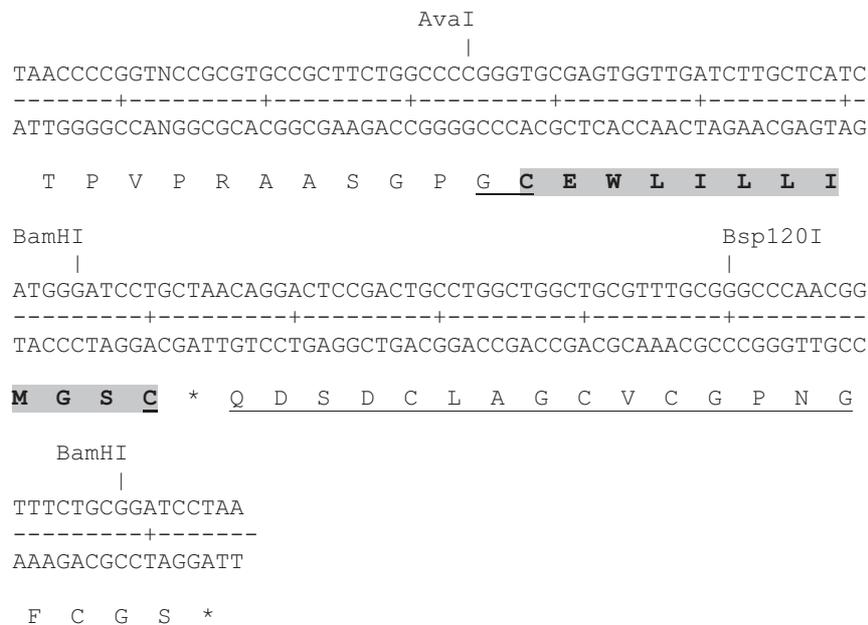


Abb. 4.39: Sequenzbereich um die 8x Gene exemplarisch am *pc9a*. Das *pc9a* (grau hervorgehoben) ist im Bereich der Inhibitorschleife des *eti*-Gens (unterstrichen). Hinter dem TGC Codon für das terminale Cystein war ein Stopp-Codon definiert, so dass eine Translation in den hinteren Bereich des *eti* nicht möglich war.

Die durch das Zufallsoligonukleotid C-Mix8-Cup eingeführte *Bam*HI Schnittstelle machte es möglich, durch Spalten mit dieser Endonuklease in allen 8x Genen die kodierende Sequenz für das zweite Cystein zu entfernen. Da sich hinter der kodierenden Sequenz für das *eti*-Gen ebenfalls eine *Bam*HI Schnittstelle gefolgt von einem Stoppcodon befindet, wird nach Religation ein 8x Gen ohne kodierende Sequenz für das zweite Cystein entstehen (s. Abb. 4.39). Wenn man die um das Cystein verkürzten Peptide PhycoA und PC9A auf Bakterien präsentiert, kann man bestimmen, ob dieses Cystein, möglicherweise durch konformationsgebende Eigenschaften, für die Funktion notwendig ist.

Um dies zu überprüfen, wurden die Vektoren pASKInt100-phycoA und pASKInt100-pc9A mit *Bam*HI gespalten und religiert. Mit diesen religierten Plasmiden wurde BMH 71-18 P' durch Elektroporation transformiert. Positive (verkürzte) Klone wurden durch Kolonie PCR unter Verwendung der Oligonukleotide Etag-pvuII-up und Cat-Hind-lo, anschließender Spaltung mit *Bsp*120I (spaltet in dem deletierten Bereich, s. Abb. 4.39) und Agarosegelelektrophorese, identifiziert. Von je zwei verkürzten Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und unter Verwendung des IRD-800 Oligonukleotids Etag-seq-up auf einem Licor DNA-Sequenziergerät sequenziert. Beide erwarteten Sequenzen konnten bestätigt werden. Die verkürzten Peptide wurden in Anlehnung an die vollständigen Peptide PhycoA und PC9A als

PhycoB: **G C F W C A C V T W G S**
 PC9B: **G C E W L I L L I M G S**

bezeichnet. Um zu überprüfen, ob das carboxyterminale Cystein einen Beitrag zur Bindung lieferte, wurden die Klone BMH 71-18P'/pASKInt100-phycoA, BMH 71-18P'/pASKInt100-phycoB, BMH 71-18P'/pASKInt100-pc9A und BMH 71-18P'/pASKInt100-pc9B angeimpft und induziert. Anschließend wurden die Bakterien, die PhycoA oder PhycoB präsentierten, separat mit Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert. Die Zellen, die PC9A bzw. PC9B präsentierten, wurden separat mit PcrV-SendH6, anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert. Die so markierten Zellen wurden einzeln im Durchflußcytometer vermessen (s. Abb. 4.40).

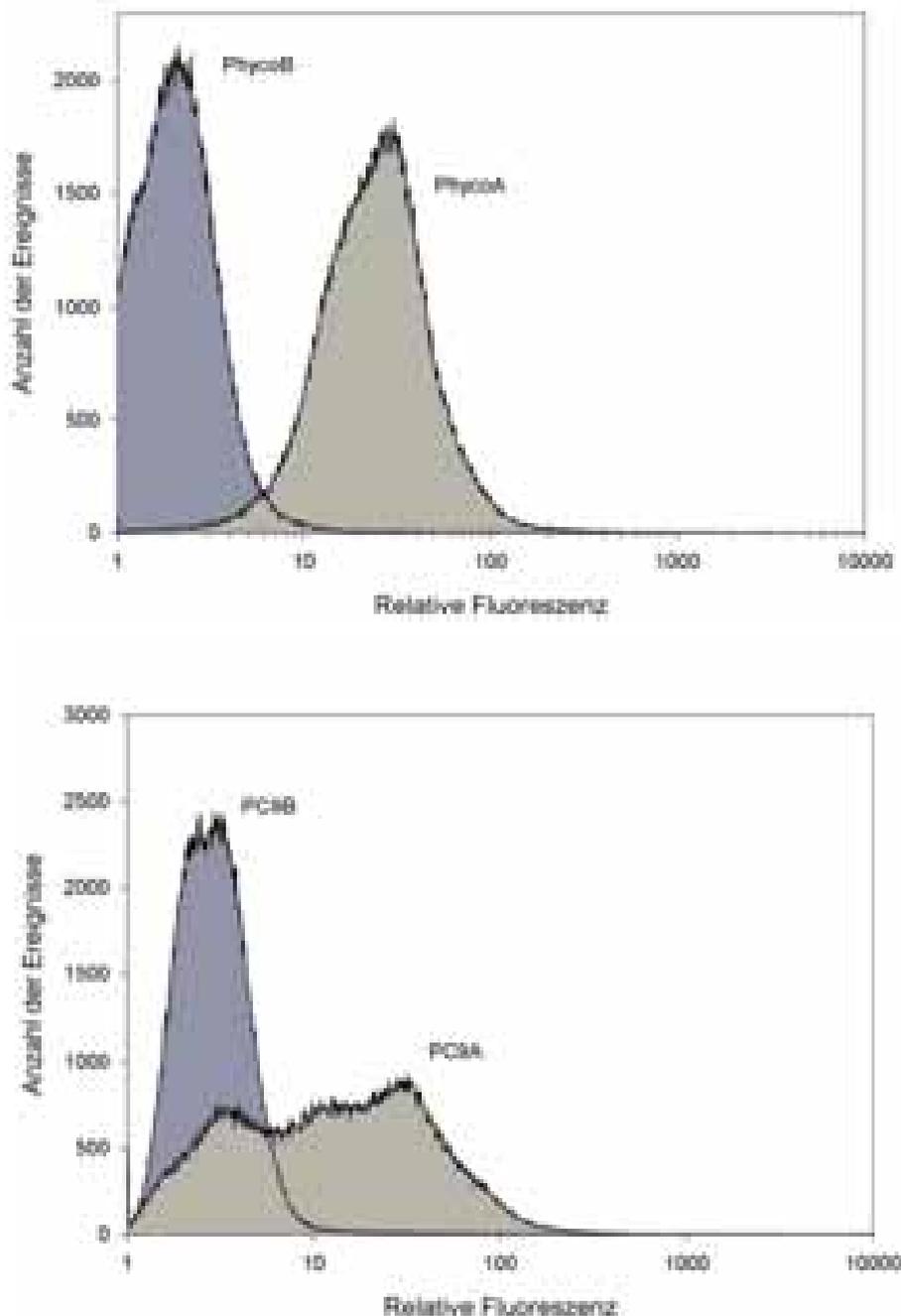


Abb. 4.40: Durchflußcytometrische Histogramme von Bakterien, die die Peptide PhycoA, PhycoB, PC9A und PC9B präsentierten. Oben: Übereinandergelegte Histogramme von Zellen, die PhycoA (helle Kurve) oder PhycoB (dunkle Kurve) präsentierten; markiert mit Streptavidin-R-Phycoerythrin. Unten: Übereinandergelegte Histogramme von Zellen, die PC9A (helle Kurve) oder PC9B (dunkle Kurve) präsentierten; markiert mit PcrV-SendH6, anti-Sendai Antikörper, anti-Maus Serum (Biotinkonjugat) und Streptavidin-R-Phycoerythrin.

Aus der Abb. 4.40 wird deutlich, dass beide um das terminale Cystein verkürzten Peptide die Bindungseigenschaften der vollständigen Peptide komplett verloren hatten. Zellen, die PhycoB präsentierten, wiesen keine erhöhte relative Fluoreszenz auf (Abb. 4.40 oben, dunkle Kurve). Ebenso wurde keine erhöhte Fluoreszenz bei Bakterien, die

PC9B präsentierten, gemessen (Abb. 4.40 unten, dunkle Kurve). Die Peptide PhycoA und PC9A haben verschiedene Bindungspartner und wurden unabhängig voneinander isoliert. Bei beiden führte die Deletion des letzten Cysteins, das die Peptide zu einer Schleife aufspannen sollte, zum vollständigen Verlust der Bindungseigenschaften. Obwohl nicht gezeigt wurde, dass sämtliche 8x Peptide nach der Verankerung auf der äußeren *E. coli* Membran zu einer Schleife aufgespannt werden, gibt dieses Experiment starke Evidenz für eine Schleifenbildung durch Verknüpfung der Cysteine. In beiden Fällen führt die Deletion zum Totalverlust der Bindung. Wenn die Cysteine keine strukturgebende Funktion hätten, wäre dieser kaum zu erklären. Es scheint eher unwahrscheinlich, dass in beiden Fällen das C-terminale Cystein den größten energetischen Beitrag zur Bindung leistet. Vielmehr scheint es plausibel, dass dieses Cystein die Peptide in eine mehr oder weniger definierte Konformation zwingt, die für das Andocken an die Bindungspartner unabdingbar ist.

4.2.6.2 Bindungsstudien der isolierten Peptide PhycoA, PC9A und des Mikroproteins Strep1 mittels Oberflächen Plasmonresonanz

Aus den in Abschnitt 4.2.2 hergestellten Peptidbibliotheken ließen sich in den daran anschließenden Abschnitten Peptide mit neuen definierten Bindungseigenschaften durch bakterielle Zelloberflächenpräsentation sowie magnetischer und fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung isolieren. Das 8x Peptid PhycoA interagierte mit R-Phycoerythrin, das 8x Peptid PC9 dockte an den Pathogenitätsfaktor PcrV aus *P. aeruginosa* an und das Mikroprotein Strep1 war in der Lage, mit der Bindungstasche von Streptavidin Wechselwirkungen einzugehen. Die Bindung von allen drei isolierten Polypeptiden an ihre Zielmoleküle konnte mittels Durchflußcytometrie und Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden.

Die Bestimmung der genauen Bindungskonstanten der isolierten Polypeptide ist auf den Bakterienzellen nicht möglich. Um diese zu messen, sollten die den Peptiden korrespondierenden DNA-Sequenzen in einen Expressionsvektor kloniert und die Peptide als Fusionsproteine mit *E. coli* Maltose-Bindeprotein (MalE) produziert werden. Mit diesen löslichen Varianten sollten Bindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz unter Verwendung eines Biacore Gerätes durchgeführt werden.

Die Plasmide pASKInt100-PC9, pASKInt100-PhycoA und pASKInt100-Strep1 wurden mit *Sma*I und *Bam*HI verdaut. Dadurch werden die für die Bindepeptide kodierenden DNA-Fragmente ausgespalten. Diese Fragmente wurden mit dem *Sma*I/*Bam*HI gespaltenen Vektor pMXETIetag (vergl. 2.3) ligiert. Durch Induktion der Klone mit IPTG wurde ein bipartites Fusionsprotein aus MalE und dem jeweiligen Polypeptid produziert. Von jedem entstandenen Klon BMH 71-18 P'/ pMX-phycoA, pMX-pc9 und pMX-strep1 wurde je eine 1l Kultur angeimpft und diese über Nacht mit IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen mittels *french pressing* aufgeschlossen und die Überstände wurden mittels immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC, vergl. 3.3.4) aufgereinigt.

Die Messung der Bindungskonstanten erfolgte auf einem Biacore 1000. Verwendet wurde der Sensorchip CM5. Dieser Chip ist mit einem carboxylierten Dextran beschichtet, das durch Zugabe von NHS/EDC aktiviert werden kann. Nach der Aktivierung wird das zu koppelnde Protein durch die Flusszelle geleitet. Dieses wird

über Aminogruppen (Lysinreste) kovalent an die aktivierte Matrix gebunden. Anschließend werden nicht besetzte Bindungsstellen durch Zugabe von 1 M Ethanolamin abgesättigt.

Zuerst sollten die Bindungskonstanten für die beiden 8x Peptide PhycoA und PC9A bestimmt werden. Dazu wurde je eine Flusszelle eines Sensorchips CM5 mit PcrV-SendH6 bzw. mit MalE-PhycoA beschichtet. Dabei wurden je 1000 µg/ml der beiden Proteine in 10 mM Acetat-Puffer pH 5,0 bei einer Flussrate von 5 µl/min über die zuvor aktivierte Chipoberfläche geleitet. Die Aktivierung des carboxylierten Dextrans geschah durch einen 7 minütigen Puls von 50 mM NHS/200 mM EDC bei einer Flussrate von 5 µl/min. Nach der Kopplung wurden nicht besetzte aktivierte Gruppen durch einen 7 minütigen Puls von 1 M Ethanolamin (pH 8,5) abgesättigt. Die Sensogramme der beiden Kopplungsreaktionen sind in Abb. 4.41 dargestellt.

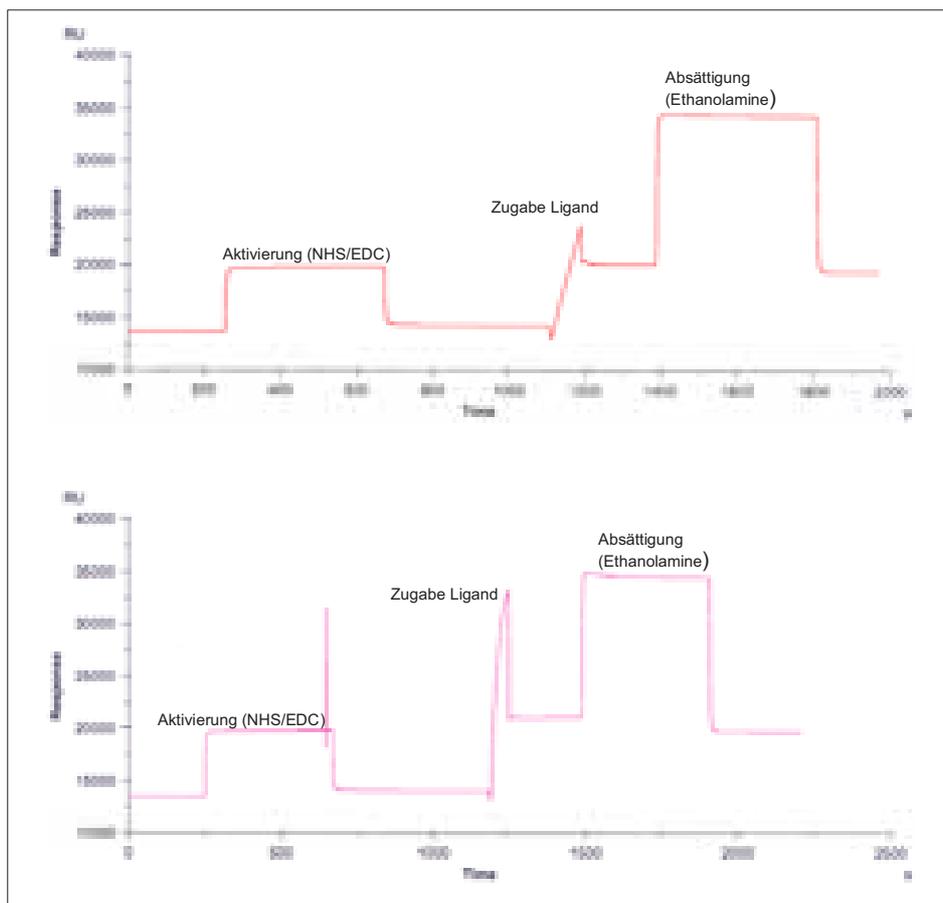


Abb. 4.41: Biacore Sensogramme der Kopplung von PcrV-SendH6 (oben) und MalE-PhycoA (unten). Die jeweiligen Schritte sind angegeben.

Nach der Kopplung der beiden Proteine sollte die Änderung des Refraktionsindex bei Durchfluss der jeweiligen Bindungspartner durch die Flusszelle gemessen werden. Die Analyten (Bindungspartner) wurden dazu zuvor gegen HBS-Puffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,4) dialysiert. Anschließend wurde der jeweilige Analyt in die Flusszelle mit seinem Bindungspartner und anschließend in die zweite mit dem jeweiligen anderen Protein injiziert (Kontrollmessung). Die Kontrollmessung diente dazu, unspezifische Effekte des jeweiligen Analyten mit der Chipoberfläche aus den Messergebnissen zu bereinigen. Die Flussrate bei den kinetischen Messungen war

20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Dabei wurde keine Assoziation der Analyten Streptavidin-R-Phycoerythrin und MalE-PC9A an die gekoppelten Bindungspartner gemessen. Dies war unerwartet, da beide Peptide - präsentiert auf den Bakterien - zweifelsfrei mit ihren Bindungspartnern interagierten (vergl. Abschnitt 4.2.6.1). Diese Bindung wurde bei den löslichen MalE-Fusionsproteinen nicht beobachtet.

Zur Messung der Bindung von MalE-Strep1 an Streptavidin wurde eine Flusszelle eines Sensorchips CM5 mit Streptavidin beschichtet. Dabei wurden 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptavidin in 10 mM Acetat-Puffer pH 5,0 in einem sieben minütigen Puls bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ über die zuvor mit einem identischen NHS/EDC Puls (50 mM NHS, 200 mM EDC) aktivierte Chipoberfläche geleitet. Anschließend wurden freie aktivierte Gruppen durch einen sieben minütigen Ethanolamin (1 M, pH 8,5) Puls bei identischer Flussrate abgesättigt. Anschließend wurde in der gleichen Weise eine weitere Flusszelle des gleichen Chips mit dem anti-Sendai Antikörper belegt. Danach wurde die Änderung der *Response Units* [RU] bei Durchfluß des MalE-Strep1 Fusionsproteins (gegen HBS Puffer dialysiert) durch die beiden Flusszellen gemessen. Die Flussgeschwindigkeit bei den kinetischen Messungen betrug 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Nach jeder Messung wurde die Chipoberfläche durch einen kurzen Puls von 10 mM Glycin (pH 2,0) regeneriert. Insgesamt wurde die Änderung bei vier MalE-Strep-1 Konzentrationen gemessen ($1,71 \cdot 10^{-5}$ M, $1,28 \cdot 10^{-5}$ M, $8,55 \cdot 10^{-6}$ M und $4,27 \cdot 10^{-6}$ M), s. Abb. 4.42.

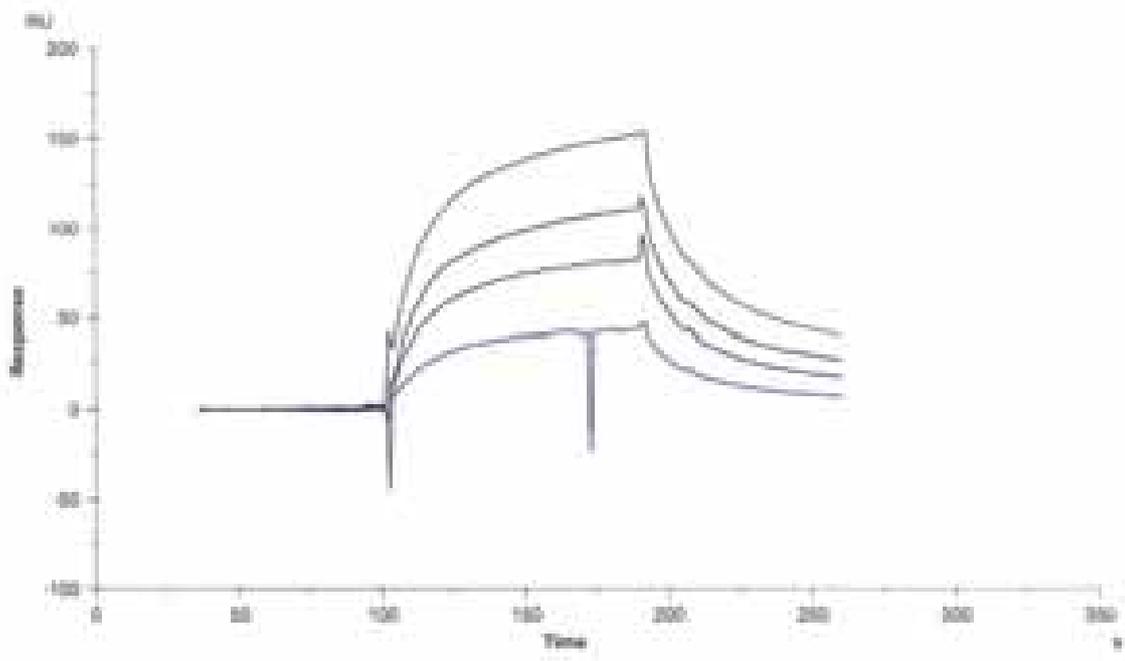


Abb. 4.42: Biacore Sensogramme zur Bestimmung der Bindungskonstante des Strep1 mit seinem Interaktionspartner Streptavidin. Die Sensogramme geben die Differenz zwischen dem Durchfluß von MalE-Strep1 durch eine mit Streptavidin gekoppelte Flusszelle und einer Kontrollflußzelle (mit gekoppeltem anti-Sendai Antikörper) bei unterschiedlichen MalE-Strep1 Konzentrationen wieder. Der Laufpuffer war HBS, das MalE-Strep1 war ebenfalls in HBS. Die Proteinkonzentrationen betragen $1,71 \cdot 10^{-5}$ M (größte Response); $1,28 \cdot 10^{-5}$ M (zweitgrößte Response), $8,55 \cdot 10^{-6}$ M (drittgrößte Response) und $4,27 \cdot 10^{-6}$ M (geringste Response).

Nach den Messungen wurden mittels der *Biaevaluations Software* die Injektionszeitpunkte auf 100 Sekunden gesetzt. Die Verschiebung der unterschiedlichen Injektionszeitpunkte war notwendig, um die Kontrollmessungen subtrahieren zu können. Anschließend wurden die Response Units der Kontrollmessungen (Flusszelle beschichtet mit anti-Sendai-Antikörper) von den für die jeweilige Proteinkonzentration gemessenen Sensogrammen der Streptavidin gekoppelten Flusszelle abgezogen. Dadurch wurden unspezifische Effekte des Proteins mit der Chipoberfläche ausgeglichen. Die so vorbereiteten Sensogramme (s. Abb. 4.42) wurden für die Berechnung der Bindungskonstanten verwendet.

Die um die unspezifische Response bereinigten Sensogramme zeigen, wie erwartet, ein konzentrationsabhängiges Verhalten. Die Response nahm bei Zugabe des Analyten MalE-Strep1 (in Abb. 4.42 bei 100 s) in Abhängigkeit von der Konzentration zu, was für eine Bindung des Fusionsproteins an das gekoppelte Streptavidin spricht. Um die Dissoziationsraten-Konstante k_d zu bestimmen, wurden die Daten für jedes Sensogram unter Verwendung der *Biaevaluation Software* wie folgt gefittet:

$$R | R_0 \Delta e^{4kd/t4t_0}$$

Dabei ist R die gemessene Response, R_0 die Response am Startpunkt der Dissoziation, k_d die Dissoziationsraten-Konstante, t die Zeit und t_0 der Dissoziations-Startpunkt. Dieses Modell geht von einem exponentiellen Abfall der Response bis $R=0$ bei t_c aus. Daher war es notwendig, die Basislinie vor der Berechnung auf $R=0$ zu setzen (s.o. und Abb. 4.42). Die Dissoziation ist nach obiger Gleichung konzentrationsunabhängig. Nach Berechnung von Ratenkonstante für die Dissoziation konnte die Assoziationsraten-Konstante für jede Strep1 Konzentration unter Verwendung der *Biaevaluations Software* durch Fitten der Daten nach folgendem Modell bestimmt werden:

$$R | R_{eq} / 14 e^{4/kaC2kd(t-t_0)}$$

Wobei R die gemessene Response, R_{eq} die Response im Gleichgewicht, k_a die Assoziationsraten-Konstante, C die Konzentration des Analyten, k_d die Dissoziationsraten-Konstante, t die Zeit und t_0 die Zeit zu Beginn der Assoziation ist. Dieses Modell benötigt den k_d -Wert für die jeweilige Konzentration, weshalb die Dissoziationsphase zuerst gefittet wurde. Anschließend wurde die Bindungskonstante K_D für das Strep1 zum Streptavidin ausgedrückt durch das Verhältnis k_d/k_a berechnet. Die Tabelle 4.7 fasst die jeweiligen Werte zusammen.

Konzentration Strep1	k_d [1/s]	k_a [1/Ms]	K_D [M]
$1,71 \cdot 10^{-5}$ M	0,0354	$1,08 \Delta 10^3$	$3,27 \Delta 10^{-5}$
$1,28 \cdot 10^{-5}$ M	0,0394	$1,17 \Delta 10^3$	$3,37 \Delta 10^{-5}$
$8,55 \cdot 10^{-6}$ M	0,0420	$1,29 \Delta 10^3$	$3,26 \Delta 10^{-5}$
$4,27 \cdot 10^{-6}$ M	0,0497	$3,99 \Delta 10^3$	$1,25 \Delta 10^{-5}$

Tab. 4.7: Zusammenfassung der Biacore Bindungsstudien mit immobilisiertem Streptavidin und löslichem MalE-Strep1.

Die Bindungskonstante des MalE-Strep1 liegt im mikromolaren Bereich (Tab. 4.7). Wenn man die letzte Messung (Konzentration $4,27 \cdot 10^{-6}$ M), die deutlich von den ersten dreien abweicht, nicht berücksichtigt, so ergibt sich eine gemittelte Bindungskonstante K_D von $33 \Delta 10^{-6}$ M.

4.2.7 Diskussion der Isolierung von Peptiden mit neuen Bindungseigenschaften

In dem Abschnitt 4.2 sollten Peptide bzw. Cystinknoten Mikroproteine hergestellt und isoliert werden, die an vorgegebene Zielproteine binden. Die Herstellung erfolgte durch Klonierung von mit randomisierten Oligonukleotiden erzeugten PCR-Produkten in den Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 (vergl. Abschnitt 4.2.2). Es wurden drei unterschiedliche Bibliotheken kloniert. Zwei basierten auf dem strukturellen Grundgerüst des *Ecballium elaterium* Trypsininhibitors EETI-II (mit sechs bzw. zehn varianten Resten in der Inhibitorschleife), die dritte Bibliothek basierte auf acht randomisierten Resten, die von je einem Cystein flankiert wurden. Insgesamt wurden mehr als 10^9 unabhängige Klone erzeugt (vergl. Tab. 4.5). Aus dieser Sammlung von unterschiedlichen Varianten sollten Liganden zu vorgegebenen Proteinen durch intiminvermittelte Zelloberflächenpräsentation isoliert werden. Als Zielprotein wurde das *Pseudomonas aeruginosa* PcrV Protein gewählt. Das Protein wurde mit einem Epitop und 6 Histidinen als Anhängsel aus rekombinanten *E. coli* Bakterien gereinigt. Anschließend wurden die hergestellten Bibliotheken nach Liganden für das gereinigte PcrV-SendH6 Protein durchmustert. Bereits nach wenigen Runden fluoreszenzaktivierter bzw. magnetischer Zellsortierung wurden Klone isoliert, die nach der Fluoreszenzmarkierung eine erhöhte relative Fluoreszenz aufwiesen. Bei genauerer Analyse der Bindungseigenschaften der gefundenen Varianten zeigte sich jedoch, dass nicht nur Bindeproteine erhalten wurden, die PcrV binden, sondern zu einem großen Anteil auch solche, die mit Proteinen interagieren, die bei der Markierungskaskade eingesetzt werden. So wurde ein Klon erhalten, der ein 8x Peptid (PhycoA) präsentierte, der R-Phycoerythrin zu binden vermochte und einer, der ein vom EETI-II abgeleitetes Mikroprotein exponierte (Strep1), das spezifisch mit Streptavidin interagierte. Ein 8x Peptid (PC9) interagierte mit dem PcrV-Protein. Das PhycoA enthielt im Gegensatz zum PC9A zwei zusätzliche Cysteinreste in der varianten Schleife. Dadurch sind zusätzlich zu einer einfachen Schleifenbildung (vergl. Abb. 4.23) noch weitere, durch Disulfidbrückenbildung fixierte Konformationen denkbar. Bei beiden isolierten 8x Peptiden wurde das C-terminale Cystein genetisch deletiert und Zellen, die die resultierenden Peptide PhycoB und PC9B auf ihrer Oberfläche präsentierten, wurden bezüglich ihrer Bindungseigenschaften zu den jeweiligen Zielproteinen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Entfernung des C-terminalen Cysteins in beiden Fällen zu einem Kompletverlust der Interaktionsfähigkeit führte (s. Abb. 4.40). Dies legt nahe, dass dieses Cystein tatsächlich, wie geplant, eine strukturelle und die konformationellen Freiheitsgrade einschränkende Funktion ausübt (vergl. Abb. 4.23). Es scheint unwahrscheinlich, dass ein Cysteinrest den gesamten energetischen Beitrag für die Bindung leistet. Dies wäre wohl nur zu erwarten, wenn die Bindung durch kovalente Verknüpfung mittels einer

Disulfidbrücke ausgebildet würde. Diese Möglichkeit scheidet, zumindestens für das PC9A Peptid, vollständig aus, da das Zielprotein PcrV keine Cysteinreste enthält. Viel wahrscheinlicher ist, dass die beiden 8x Peptide durch diese Cysteine konformationell fixiert werden und diese Konformation für die Bindung an das jeweilige Zielmolekül notwendig ist. Für weitere Bindungsstudien wurden die drei Peptide PhycoA, PC9A und Strep1 in löslicher Form als C-terminale MalE Fusionsproteine produziert. Biacore Messungen haben gezeigt, dass die Peptide PhycoA und PC9A nicht an ihre auf der Oberfläche eines Sensorchips immobilisierten Zielproteine banden. Für beide Peptide war gezeigt worden, dass die Bindung an das Zielprotein die Anwesenheit des C-terminalen Cysteins erfordert. Eine mögliche Erklärung für die substantiellen Unterschiede in der Ligandenbindung könnte darin liegen, dass bei bakterieller Oberflächenpräsentation der Peptide intermolekulare Disulfidbrücken gebildet werden, während die löslichen Varianten intramolekular verknüpft sind. Die erstgenannte könnte die einzige sein, die zu einer Bindung mit dem Zielprotein führt. Da dieser Befund (Verlust der Bindungsfähigkeit) bei beiden Peptiden gleich war, ist es durchaus wahrscheinlich, dass dies ein generelles Problem der 8x Peptide auf Bakterienzellen ist. Es wäre interessant, den Verknüpfungspartner, sofern es ihn gibt, zu isolieren. Dazu wäre es erforderlich, Membranpräparationen unter oxidativen Bedingungen mit anschließender Isolierung des Intimininfusionsproteins anzufertigen. Anschließend müssten die Verknüpfungspartner unter reduzierenden Bedingungen isoliert werden. Abschließend lässt sich zu den beiden 8x Peptiden festhalten, dass die Isolierung von Bindepeptiden durch Oberflächenpräsentation mit einem Intiminsockel möglich ist. Allerdings gibt es experimentelle Evidenz, dass die Art der konformationellen Fixierung der Bindungsschleife auf der Zelloberfläche nicht ohne weiteres auf die Produktion von löslichen Varianten übertragbar ist.

Zusätzlich zu den beiden Peptiden PhycoA und PC9A wurde ein optimiertes Mikroprotein (Strep1) isoliert, das in der Lage war, an Streptavidin zu binden (vergl. Abb. 4.37). Von diesem Mikroprotein kann angenommen werden, dass es nahe oder in der Bindungstasche für Biotin an das Streptavidin andockt. Diese Folgerung gründet sich auf die Tatsache, dass das Mikroprotein durch Zugabe von Biotin von dem Streptavidin verdrängt wird (Abb. 4.38). Die Wechselwirkung des Strep1 Bindepeptids mit Streptavidin kann sowohl durch die Konformationsänderung des Streptavidins, die mit der Bindung von Biotin einhergeht (Pahler *et al.*, 1987; Chu *et al.*, 1998), als auch durch direkte Verdrängung aus der Bindungstasche aufgehoben werden. Die Sequenz der Inhibitorschleife des Strep1 (R P V W V M) hat keine Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz von in anderen Arbeiten isolierten Streptavidin Bindepeptiden (Devlin *et al.*, 1990). Dort wurden mittels *Phage Display* Peptide isoliert, die als Konsensussequenz ein drei Aminosäuren langes Motiv (H P Q) aufwiesen, welches in Gegenwart von Biotin nicht an Streptavidin bindet.

Das Mikroprotein Strep1 wurde - wie die beiden Peptide PhycoA und PC9A - als C-terminales Fusionsprotein mit *E. coli* MalE produziert. Von diesem Fusionsprotein konnte die Bindungskonstante mit Streptavidin am Biacore bestimmt werden (s. Abb. 4.42 und Tab. 4.7), sie betrug $3,3 \Delta 10^{-5}$ M. Die Bindungskonstante war moderat, was darauf hindeutet, dass mit dem Verfahren der Oberflächenpräsentation nicht nur, aber auch, schwache Bindemoleküle isoliert werden können. Um Bindemoleküle mit einer

höheren Affinität zu generieren, würden sich unterschiedliche Vorgehensweisen anbieten. Sofern noch weitere Varianten mit den gewünschten Eigenschaften isoliert würden, könnte versucht werden, diese über PCR-Methoden zu rekombinieren. Dazu würde man *crossover* Ereignisse, die während einer PCR-Reaktion auftreten können (Meyerhans *et al.*, 1990), ausnutzen. Ebenso wäre die Verwendung von DNA-*shuffling* (Stemmer, 1994) denkbar. Die daraus resultierenden Varianten müssten anschließend erneut nach Bindemolekülen durchmustert werden. *Error prone* PCR-Methoden (z.B.: Spee *et al.*, 1993; Fromant *et al.*, 1998) erscheinen bei Genlängen von 100 bp, von denen 18 bp variiert werden sollen, eher ungeeignet. Demgegenüber scheint die Verwendung von Trinukleotid Oligonukleotiden (Virnekäs *et al.*, 1994), denen bei der Synthese bei jedem Kopplungsschritt zusätzlich zum wildtyp Codon noch alle weiteren in einem vorgegebenen Verhältnis beigemischt wurden, erfolgversprechender. Aus den resultierenden Varianten, die auf der Sequenz des Ausgangsklones beruhen, könnten möglicherweise affinere Binder isoliert werden. Diese Vorgehensweise war in dieser Arbeit aufgrund mangelnder Zugänglichkeit für solche Oligonukleotide nicht möglich. Es konnte aber gezeigt werden, dass die intimvermittelte Zelloberflächenpräsentation zur Isolierung von Liganden für vorgegebene Zielproteine geeignet ist. Sie bietet insbesondere sowohl für lineare Peptide als auch für im Rahmenwerk eines Cystinknotens eingespannte Peptide eine Plattform für die Analyse von Protein/Protein Interaktionen.

5. Zusammenfassung

Alle Prozesse in lebenden Organismen unterliegen den Gesetzen der Physik und der Chemie. Sie werden durch die Interaktion von Molekülen gesteuert. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, einen methodischen Beitrag zur Aufklärung solcher Wechselwirkungen zu leisten. In einem evolutiven Ansatz sollten Interaktionen zwischen Peptiden und Proteinen studiert und auf immunbiologische und biotechnologische Fragestellungen angewendet werden. Insbesondere stand die Isolierung und anschließende Charakterisierung von Ligandenmolekülen im Vordergrund. Der methodische Beitrag war die Validierung eines neuartigen Verfahrens der Genotyp/Phänotyp Kopplung. Dieses beruhte auf der Verankerung von Peptiden oder Proteinen auf der Oberfläche von *E. coli* Bakterien mit einem verkürzten Intiminprotein als Membranverankerungsdomäne. Es sollte überprüft werden, ob durch die Exposition der Peptide/Proteine zum äußeren Medium ihre Funktion, die Interaktion mit anderen Proteinen, abgefragt werden kann.

Um die Eignung des intiminbasierten Oberflächenpräsentationssystems zur Durchmusterung auch großer Variantenbibliotheken zu überprüfen, wurden im ersten Abschnitt genfragmentbasierte Peptidbibliotheken auf Bakterienzellen präsentiert. Diese Peptide wurden dann mit Antikörpern, die gegen das ganze Protein gerichtet waren, nach antigenen Determinanten (Epitopen) durchgemustert. Die Epitopsequenzen wurden anschließend indirekt durch Sequenzierung der Plasmid-DNA von Bakterienklonen, die von den Antikörpern gebunden wurden, bestimmt. Die Anreicherung solcher Klone geschah in einem Hochdurchsatzverfahren mittels eines FACS-Gerätes, das es erlaubte, bis zu 10^5 individuelle Bakterien pro Sekunde auf ihre Eigenschaften hin zu untersuchen. Auf diese Weise wurden Epitope der η -Lactamase, des PMS1 Proteins aus *Sacharomyces cerevisiae* und des E^{ms} Proteins, einem Glycoprotein des Schweinepesteregers CSFV, identifiziert. Anschließend konnte gezeigt werden, dass sich die Präsentation von genbasierten Peptiden durch Intimin-Fusion prinzipiell eignet, auch große Proteomabschnitte eines Organismus nach antigenen Determinanten zu durchmustern. Dazu wurden sämtliche kodierten Proteine einer *Pseudomonas aeruginosa* Geninsel in Peptidfragmenten auf Bakterienzellen präsentiert und nach Epitopen, die von Seren infizierter Patienten erkannt werden, durchgemustert. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit muss davon ausgegangen werden, dass diese Geninsel keine immunrelevanten Proteine kodiert.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde gezeigt, dass sich das Intiminpräsentationsverfahren von Peptiden und Proteinen auf Bakterien auch für die Isolation von neuen nicht natürlichen Bindeproteinen eignet. Dazu wurden unterschiedliche Molekülbibliotheken generiert, die entweder auf dem Trypsininhibitor EETI-II mit zufälligen Aminosäureaustauschen im Bereich der Inhibitorschleife, oder auf durch Disulfidbrücken konformationell eingeschränkten Peptiden basierten. Insgesamt wurden mehr als 10^9 unterschiedliche Varianten erzeugt. Aus solchen Bibliotheken konnten Interaktionsmoleküle zu vorgegebenen Zielproteinen isoliert werden, die

R-Phycoerythrin, Streptavidin und den *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenitätsfaktor PcrV zu binden vermochten.

Damit wurde die Gewinnung von Interaktionsmolekülen mit gänzlich neuen Bindungseigenschaften durch die Präsentation zufallsmäßig variiertes Proteine oder Peptide auf der Oberfläche von *E. coli* Bakterien und ihre Durchmusterung durch magnetische und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung erstmalig gezeigt.

6. Literatur

Adda C.G., Anders R.F., Tilley L., Foley M. (2002): Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. *Comb. Chem. High. Throughput Screen* **5**:1-14

Agterberg M., Adriaanse H., van Bruggen A., Karperien M., Tommassen J. (1990a): Outer membrane PhoE protein of *E. coli* K-12 as an exposure vector: possibilities and limitations. *Gene* **88**:37-45

Agterberg M., Adriaanse H., Lankhof H., Meloen R., Tommassen J. (1990b): Outer membrane PhoE protein of *E. coli* as a carrier for foreign antigenic determinants: immunogenicity of epitopes of foot and mouth disease virus. *Vaccine* **8**:85-91

Arber W. (2000): Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:1-7

Armengol E., Wiesmüller K.H., Wienhold D., Buttner M., Pfaff E., Jung G., Saalmüller A. (2002): Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. *J. Gen. Virol.* **83**:551-560

Ashton G.H., McGrath J.A., South A.P. (2002): Strategies to identify disease genes. *Drugs Today* **38**:235-244

Baquero, Blázquez (1997): Evolution of antibiotic resistance. *Trends. Ecol. Evol.*, **12**: 482-487

Bardwell JC, McGovern K, Beckwith J. (1991): Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* **67**:581-589

Boder E.T., Wittrup K.D. (1997): Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* **15**:553-557

Boder E.T., Midelfort K.S., Wittrup K.D. (2000): Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:10701-1075

Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., Boyer H.W. (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**:95-113

Brett M.M., Ghoneim A.T., Littlewood J.M. (1986): Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* **61**:1114-1120

Brown S. (1992): Engineered iron oxide-adhesion mutants of the *Escherichia coli* phage lambda receptor. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **89**:8651-8655

- Bruschke C.J., Moormann R.J., van Oirschot J.T., van Rijn P.A.** (1997): A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine virus diarrhea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. *Vaccine* **15**:1940-1945
- Bryant P.W., Lennon-Dumenil A.M., Fiebiger E., Lagaudriere-Gesbert C., Ploegh H.L.** (2002): Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules. *Adv. Immunol.* **80**:71-114
- Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A.** (1995): A functional classification scheme for η -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**:1211-1233
- Charbit A., Boulain J.C., Ryter A., Hofnung M.** (1988): Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface. *EMBO J.* **5**:3029-3037
- Charbit A., Molla A., Saurin W., Hofnung M.** (1988): Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of gram negative bacteria. *Gene* **70**:181-189
- Chiche L., Gaboriaud C., Heitz A., Mornon J.P., Castro B., Kollman P.A.** (1989): Use of restrained molecular dynamics in water to determine three-dimensional protein structure: prediction of the three-dimensional structure of *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II. *Proteins* **6**: 405-417
- Chiche L., Heitz A., Padilla A., Le-Nguyen D., Castro B.** (1993): Solution conformation of a synthetic bis-headed inhibitor of trypsin and carboxypeptidase A: new structural alignment between the squash inhibitors and the potato carboxypeptidase inhibitor. *Protein Eng.* **6**: 675-682
- Cho J.J., Schroth M.N., Kominos S.D., Green S.K.**, (1975): Ornamental plants as carriers of *Pseudomonas aeruginosa*. *Phytopathology* **65**:425-431
- Christmann A., Walter K., Wentzel A., Krätzner R., Kolmar H.**, (1999). The cystine knot of a squash-type protease inhibitor as a structural scaffold for *Escherichia coli* cell surface display of conformationally constrained peptides. *Protein Eng.* **12**, 797
- Christmann A., Wentzel A., Meyer C., Meyers G., Kolmar H.** (2001): Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by *Escherichia coli* cell surface display of gene-derived random peptide libraries. *J. Immunol. Methods* **257**:163-173
- Chu V., Freitag S., Le Trong I., Stenkamp R.E., Stayton P.S.** (1998): Thermodynamic and structural consequences of flexible loop deletion by circular permutation in the streptavidin-biotin system. *Protein. Sci.* **7**:848-859
- Clarke L., Carbon J.** (1976): A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell.* **9**:91-99
- Cohen M.L.** (2000): Changing patterns of infectious disease. *Nature* **406**:762-767

- Cornelis G.R.** (2000): Molecular and cell biology aspects of plague. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:8778-8783
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.** (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-1322
- Cull M.G., Miller J.F., Schatz P.J.** (1992): Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:1865-1869
- Dacheux D., Goure J., Chabert J., Usson Y., Attree I.** (2001): Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol. Microbiol.* **40**:76-85
- Dandekar T., Sauerborn R.** (2002): Comparative genome analysis and pathway reconstruction. *Pharmacogenomics* **3**:245-256
- Daugherty P.S., Olsen M.J., Iverson B.L., Georgiou G.** (1999): Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface. *Protein. Eng.* **12**:613-621
- Davies J.** (1994): Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, **264**:375-382
- De Kievit T.R., Gillis R., Marx S., Brown C., Iglewski B.H.** (2001): Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1865-1873
- de la Cruz F., Davies J.** (2000): Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends. Microbiol.*; **8**:128-133
- Delahay R.M., Knutton S., Shaw R.K., Hartland E.L., Pallen M.J., Frankel G.** (1999): The coiled-coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion translocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**:35969-35974
- Devlin J.J., Panganiban L.C., Devlin P.E.** (1990): Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* **249**:404-406
- Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W.** (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic. Acids. Res.* **16**:6127-6145
- Drees B.L.** (1999): Progress and variations in two-hybrid and three-hybrid technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**:64-70
- Edwards S, Fukusho A, Lefevre PC, Lipowski A, Pejsak Z, Roehe P, Westergaard J.** (2000): Classical swine fever: the global situation. *Vet. Microbiol.* **73**:103-119

- Farilla L., Tiberti C., Luzzago A., Yu L., Eisenbarth G.S., Cortese R., Dotta F., Di Mario U.** (2002): Application of phage display peptide library to autoimmune diabetes: identification of IA-2/ICA512bdc dominant autoantigenic epitopes. *Eur. J. Immunol.* **32**:1420-1427
- Favel A., Mattras H., Coletti-Previero M.A., Zwilling R., Robinson E.A., Castro B.** (1989): Protease inhibitors from *Ecballium elaterium* seeds. *Int. J. Pept. Protein. Res.* **33**: 202-208
- Fobert A., Samuelson P., Andreoni C., Bachi T., Uhlen M., Binz H., Nguyen T.N., Stahl S.** (1996): Surface display on *staphylococci*: a comparative study. *FEBS Lett.* **390**:327-333
- Francisco J.A., Earhart C.F., Georgiou G.** (1992): Transport and anchoring of η -lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:2713-2717
- Frank D.W.** (1997): The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **26**:621-629
- Frankel G., Phillips A.D., Rosenshine I., Dougan G., Kaper J.B., Knutton S.** (1998): Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.* **30**:911-921
- Frere J.M., Joris B.** (1985): Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **11**:299-396
- Frere, Nguyen-Disteche, Coyette, Joris** in: The chemistry of η -Lactams. Michel I. (ed.), Blackie Academic & Professional 1. Edition, London (1992)
- Frere J.M.** (1995): η -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.* **16**:385-395
- Fromant M., Blanquet S., Plateau P.** (1998) Effects of dNTP and divalent metal ion concentrations on random PCR mutagenesis. In Horton R.M.(ed.), Tait R.C. (ed.) Genetic Engineering with PCR, Horizon Scientific Press Wymondham England, pp. 39-55
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P.** (1994): Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**:269-275
- Geysen H.M., Meloan R.H., Barteling S.J.** (1984): Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:3998-4002
- Ghuysen J.M.** (1991): Serine η -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:37-67

- Götz F.** (1990): *Staphylococcus carnosus*: a new host organism for gene cloning and protein production. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp Ser.* **19**: 49S-53S
- Govan J.R., Deretic V.** (1996): Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* **60**:539-74
- Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, Bye JM, Embleton MJ, McCafferty J, Baier M, Holliger KP, Gorick BD, Hughes-Jones NC** (1993): Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* **12**:725-34
- Heitz A., Chiche L., Le-Nguyen D., Castro B.** (1989): ¹H ²D NMR and distance geometry study of the folding of *Ecballium elaterium* trypsininhibitor, a member of the squash inhibitors family. *Biochemistry* **28**: 2392-2398
- Hanahan D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580
- Hanish J., McClelland M.** (1988): Activity of DNA modification and restriction enzymes in KGB, a potassium glutamate buffer. *Gene Anal. Tech.* **5**:105-107
- Hansson M., Stahl S., Nguyen T.N., Bachi T., Robert A., Binz H., Sjolander A., Uhlen M.** (1992): Expression of recombinant proteins on the surface of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus xylosus*. *J. Bacteriol.* **174**:4239-4245
- Hansson M., Samuelson P., Gunneriusson E., Stahl S.** (2001): Surface display on gram positive bacteria. *Comb. Chem. High. Throughput Screen.* **4**:171-84
- Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Nataro J.P.** (1998): The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends. Microbiol.* **6**:370-378
- Heuer T., Burger C., Tümmler B.** (1998): Smith/Birnstiel mapping of genome rearrangements in *Pseudomonas aeruginosa*. *Electrophoresis* **19**:495-499
- Ho K.L., Yusoff K., Seow H.F., Tan W.S.** (2003): Selection of high affinity ligands to hepatitis B core antigen from a phage-displayed cyclic peptide library. *J. Med. Virol.* **69**:27-32
- Hoess R., Brinkmann U., Handel T., Pastan I.** (1993): Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3. *Gene* **128**:43-49
- Holmstrom A., Olsson J., Cherepanov P., Maier E., Nordfelth R., Pettersson J., Benz R., Wolf-Watz H., Forsberg A.** (2001): LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* **39**:620-632
- Hoogenboom H.R.** (2002): Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods. Mol. Biol.* **178**:1-37
- Hueck C.J.** (1998): Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:379-433

- Jensen P., Johansen H.K., Langg S., Hoiby N.** (2001): Relative Increase in IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* 60-kDa GroEL in prediabetic patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Res.* **49**:423-8.
- Jose J., Kramer J., Klauser T., Pohlner J., Meyer T.F.** (1996): Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga η autotransporter pathway *Gene* **178**:107-110
- Kelly G.** (1999): Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic *E. coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 313-318
- Kieke M.C., Cho B.K., Boder E.T., Kranz D.M., Wittrup K.D.** (1997): Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein. Eng.* **10**:1303-1310
- Klauser T., Pohlner J., Meyer T.F.** (1990): Selective extracellular release of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease η -domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *EMBO J.* **9**:1991-1999
- Klauser T., Pohlner J., Meyer T.F.** (1992): Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* IgA η -mediated outer membrane transport. *EMBO J.* **11**:2327-2335
- Klauser T., Pohlner J., Meyer T.F.** (1993): The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram negative bacteria. *Bioessays* **15**:799-805
- Kleining H., Sitte P.** (1992): Zellbiologie, 3. Auflage, Gustaf Fischer Verlag Stuttgart; Jena; New York Seite 453 ff.
- König M., Lengsfeld T., Pauly T., Stark R., Thiel H.J.** (1995): Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J. Virol.* **69**:6479-6486
- Konieczny M.P., Suhr M., Noll A., Autenrieth I.B., Alexander Schmidt M.** (2000): Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**:321-332
- Kosmidou A., Ahl R., Thiel H.J., Weiland E.** (1995): Differentiation of classical swine fever virus (CSFV) strains using monoclonal antibodies against structural glycoproteins. *Vet. Microbiol.* **47**:111-118
- Koster M., Bitter W., de Cock H., Allaoui A., Cornelis G.R., Tommassen J.** (1997): The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol.* **26**:789-797
- Kramer B., Kramer W., Fritz H.J.** (1984) Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. *Cell* **38**: 879-887

- Kramer W., Kramer B., Williamson M.S., Fogel S.** (1989): Cloning and nucleotide sequence of DNA mismatch repair gene PMS1 from *Saccharomyces cerevisiae*: homology of PMS1 to procaryotic MutL and HexB. *J. Bacteriol.* **171**:5339-5346
- Lan R., Reeves PR.** (2000): Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends. Microbiol.* **8**:396-401
- Langedijk J.P., Middel W.G., Meloen R.H., Kramps J.A., de Smit J.A.** (2001): Enzyme-linked immunosorbent assay using a virus type-specific peptide based on a subdomain of envelope protein E(rns) for serologic diagnosis of pestivirus infections in swine. *J. Clin. Microbiol.* **39**:906-912
- Larbig K.D.** (2001): Intraklonale Genomdiversität in *Pseudomonas aeruginosa*. Zur Erlangung des Grades - Dr. rer. Nat. -, Fachbereich Chemie Universität Hannover
- Larbig K.D., Christmann A., Johann A., Klockgether J., Hartsch T., Merkl R., Wiehlmann L., Fritz HJ, Tummler B.** (2002): Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* Clone. *J. Bacteriol.* **184**:6665-6680
- Lattemann C.T., Maurer J., Gerland E., Meyer T.F.** (2000): Autodisplay: functional display of active η -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J. Bacteriol.* **182**:3726-3733
- Lee C.L., Atassi M.Z.** (1976): Delineation of the third antigenic site of lysozyme by application of a novel 'surface-simulation' synthetic approach directly linking the conformationally adjacent residues forming the site. *Biochem. J.* **159**:89-93
- Liang X., Pham X.Q., Olson M.V., Lory S.** (2001): Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**:843-853
- Lockman H., Kaper J.B.** (1983): Nucleotide sequence analysis of the A2 and B subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *J. Biol. Chem.* **258**:13722-13726
- Luo Y., Frey E.A., Pfuetzner R.A., Creagh A.L., Knoechel D.G., Haynes C.A., Finlay B.B., Strynadka N.C.** (2000): Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* **405**: 1073-1077
- Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B.** (2000): Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* **2**:1051-1060
- Marks J.D., Ouweland W.H., Bye J.M., Finnern R., Gorick B.D., Voak D., Thorpe S.J., Hughes-Jones N.C., Winter G.** (1993): Human antibody fragments specific for human blood group antigens from a phage display library. *Biotechnology* **11**:1145-1149

- Matagne A., Lamotte-Brasseur J., Frere J.M.** (1998): Catalytic properties of class A η -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J.* **330**:581-598
- Maurer J., Jose J., Meyer T.F.** (1997): Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J. Bact.* **179**:794-804
- McClelland M., Hanish J., Nelson M., Patel Y.** (1988): KGB: a single buffer for all restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **16**:364
- McDonald N.Q., Hendrickson W.A.** (1993): A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* **73**: 421-424
- Mekalanos J.J., Swartz D.J., Pearson G.D., Harford N., Groyne F., de Wilde M.** (1983): *Cholera* toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature* **306**: 551-557
- Meldrum D.** (2000): Automation for genomics, part two: sequencers, microarrays, and future trends. *Genome Res.* **10**:1288-1303
- Mennuni .C, Santini C., Lazzaro D., Dotta F., Farilla L., Fierabracci A., Bottazzo G.F., Di Mario U., Cortese R., Luzzago A.** (1997): Identification of a novel type 1 diabetes-specific epitope by screening phage libraries with sera from pre-diabetic patients. *J. Mol. Biol.* **268**:599-606
- Meyerhans A., Vartanian J.P., Wain-Hobson S.** (1990) DNA recombination during PCR. *Nucleic. Acids. Res.* **18**: 1687-91
- Meyers G., Thiel H.J.** (1996): Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus. Res.* **47**:53-118
- Miljanich G.P., Ramachandran J.** (1995): Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function and therapeutic implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**:707-734
- Moss J., Ehrmantraut M.E., Banwart B.D., Frank D.W., Barbieri J.T.** (2001): Sera from adult patients with cystic fibrosis contain antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* type III apparatus. *Infect. Immun.* **69**:1185-1198
- Nanninga N.** (1991): Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:791-795
- 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**:3685-92
- Nguyen T.N., Hansson M., Stahl S., Bachi T., Robert A., Domzig W., Binz H., Uhlen M.** (1993): Cell-surface display of heterologous epitopes on *Staphylococcus xylosus* as a potential delivery system for oral vaccination. *Gene* **128**:89-94

- Nguyen T.N., Gourdon M.H., Hansson M., Robert A., Samuelson P., Libon C., Andreoni C., Nygren P.A., Binz H., Uhlen M., et al.** (1995): Hydrophobicity engineering to facilitate surface display of heterologous gene products on *Staphylococcus xylosum*. *J. Biotechnol.* **42**:207-219
- Nicas T.I., Frank D.W., Stenzel P., Lile J.D., Iglewski B.H.** (1985): Role of exoenzyme S in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **4**:175-179
- Nielsen K.J., Alewood D., Andrews J., Kent S.B., Craik D.J.** (1994): An ¹H NMR determination of the three-dimensional structures of mirror-image forms of a Leu-5 variant of the trypsin inhibitor from *Ecballium elaterium* (EETI-II). *Protein Sci.* **3**: 291-302
- Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E.A.** (2000): Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**:299-304
- Oefner P.J., Hunicke-Smith S.P., Chiang L., Dietrich F., Mulligan J., Davis R.W.** (1996): Efficient random subcloning of DNA sheared in a recirculating point-sink flow system. *Nucleic Acids Res.* **24**:3879-3886
- Oi V.T., Glazer A.N., Stryer L.** (1982): Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *J. Cell Biol.* **93**:981-986
- Olivera B.M., Miljanich G.P., Ramachandran J., Adams M.E.** (1994): Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:823-867
- Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T.** (1995): How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**:2411-2423
- Pahler A., Hendrickson W.A., Kolks M.A., Argarana C.E., Cantor C.R.** (1987): Characterization and crystallization of core streptavidin. *J. Biol. Chem.* **262**:13933-13937
- Pallaghy P.K., Nielsen K.J., Craik D.J., Norton R.S.** (1994): A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded η -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci.* **3**:1833-1839
- Pallesen L., Poulsen I.K., Christiansen G., Klemm P.** (1995): Chimeric FimH adhesin of type I fimbriae: a bacterial surface display system for heterologous sequences. *Microbiology* **141**:2839-2848
- Parsek M.R., Greenberg E.P.** (1999): Quorum sensing signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Methods. Enzymol.* **310**:43-55
- Paton D.J., Simpson V., Done S.H.** (1992): Infection of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. *Vet. Rec.* **131**:185-188
- Pearson G.D., Mekalanos J.J.** (1982): Molecular cloning of *Vibrio cholerae* enterotoxin genes in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:2976-2980

- Pellett S., Bigley D.V., Grimes D.J.** (1983): Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:328-332
- Pereboeva L.A., Pereboev A.V., Morris G.E.** (1998): Identification of antigenic sites on three hepatitis C virus proteins using phage-displayed peptide libraries. *J. Med. Virol.* **56**:105-111
- Pereboeva L.A., Pereboev A.V., Wang L.F. Morris G.E.** (2000): Hepatitis C epitopes from phage-displayed cDNA libraries and improved diagnosis with a chimeric antigen. *J. Med. Virol.* **60**:144-151
- Petrosino J, Cantu C. 3rd, Palzkill T** (1998): η -Lactamases: protein evolution in real time *Trends Microbiol.* **8**:323-327.
- Phillips A.D., Frankel G.** (2000): Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *E. coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J. infect. Dis.* **181**:1496-1500
- Pini A., Bracci L.** (2000): Phage display of antibody fragments. *Curr. Protein. Pept. Sci.* **1**:155-169
- Pluimers F.H., de Leeuw P.W., Smak J.A., Elbers A.R., Stegeman J.A.** (1999): Classical swine fever in The Netherlands 1997-1998: a description of organisation and measures to eradicate the disease. *Prev. Vet. Med.* **42**:139-155
- Rahme L.G., Stevens E.J., Wolfort S.F., Shao J., Tompkins R.G., Ausubel F.M.** (1995): Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals *Science* **268**:1899-1902
- Rahme L.G., Ausubel F.M., Cao H., Drenkard E., Goumnerov B.C., Lau G.W., Mahajan-Miklos S., Plotnikova J., Tan M.W., Tsongalis J., Walendziewicz C.L., Tompkins R.G.** (2000): Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**:8815-8821
- Rees D.C., Lipscomb W.N.** (1982): Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **160**:475-498
- Reineke U., Kramer A., Schneider-Mergener J.** (1999): Antigen sequence- and library-based mapping of linear and discontinuous protein-protein-interaction sites by spot synthesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **243**:23-36
- Rice, C.M.** (1996): Fields Virology (Eds. Fields, Knipe, Howley), 3. Ed. pp. 931-959, Lippincott-Raven, Philadelphia
- Roit I.**: Essential Immunology, 7. Auflage 1991, Blackwell Scientific Publications Oxford. Seite 35ff

- Rosenshine I., Donnenberg M.S., Kaper J.B., Finlay B.B.** (1992): Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *EMBO J.* **11**:3551-3560
- Römling U., Greipel J., Tümmler B.** (1995): Gradient of genomic diversity in the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *Mol. Microbiol.* **17**:323-332
- Römling U., Schmidt K.D., Tümmler B.** (1997): Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. *J. Mol. Biol.* **271**:386-404
- Rumbaugh K.P., Griswold J. A., Hamood A.N.** (2000): The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.* **2**:1721-1731
- Rümenapf T., Meyers G., Stark R., Thiel H.J.** (1991): Molecular characterization of hog cholera virus. *Arch Virol Suppl.* **3**:7-18
- Samuelson P., Hansson M., Ahlborg N., Andreoni C., Gotz F., Bachi T., Nguyen T.N., Binz H., Uhlen Stahl S.** (1995): Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*. *J. Bacteriol.* **177**:1470-1476
- Saveanu L., Fruci D., van Endert P.** (2002): Beyond the proteasome: trimming, degradation and generation of MHC class I ligands by auxiliary proteases. *Mol. Immunol.* **39**:203-215
- Sawa T., Yahr T.L., Ohara M., Kurahashi K., Gropper M.A., Wiener-Kronish J.P., Frank D.W.** (1999): Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat. Med.* **5**:392-398
- Schaffitzel C., Hanes J., Jermutus L., Plückthun A.** (1999): Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries. *J. Immunol. Methods.* **231**:119-135
- Schmidt K.D., Schmidt-Rose T., Romling U, Tümmler B.** (1998): Differential genome analysis of bacteria by genomic subtractive hybridization and pulsed field gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**:509-514
- Schreuder M.P., Mooren A.T., Toschka H.Y., Verrips C.T., Klis F.M.** (1996): Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends. Biotechnol.* **14**:115-120
- Sheu T.J., Schwarz E.M., Martinez D.A., O'Keefe R.J., Rosier R.N., Zuscik M.J., Puzas J.E.** (2003): A phage display technique identifies a novel regulator of cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **278**:438-443
- Shime N., Sawa T., Fujimoto J., Faure K., Allmond L.R., Karaca T., Swanson B.L., Spack E.G., Wiener-Kronish J.P.** (2001): Therapeutic administration of anti-PcrV Fab in sepsis associated with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immunol.* **167**:5880-5886

- Skerra A.** (1994): Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**:131-135
- Skerra A.** (2000): Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **13**:167-187
- Smith G.P.** (1985): Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**:1315-1317
- Smith G.P., Patel S.U., Windass J.D., Thornton J.M., Winter G., Griffiths A.D.** (1998): Small binding proteins selected from a combinatorial repertoire of knottins displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **277**:317-332
- Sousa C., Cebolla A., de Lorenzo V.** (1996): Enhanced metalloadorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. *Nat. Biotechnol.* **14**:1017-1020
- Spee J.H., de Vos W.M., Kuipers O.P.** (1993) Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP. *Nucleic Acids Res.* **21**: 777-778
- Steidler L., Remaut E., Fiers W.** (1993): Pap pili as a vector system for surface exposition of an immunoglobulin G-binding domain of protein A of *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:7639-7643
- Stemmer W.P.** (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-91
- Sterky F., Lundeberg J.** (2000): Sequence analysis of genes and genomes. *J. Biotechnol.* **76**:1-31
- Sternberg N., Hoess R.H.** (1995): Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**:1609-1613
- Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik, D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T.** (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature.* **31**:959-964
- Strauss A, Götz F.** (1996): In vivo immobilization of enzymatically active polypeptides on the cell surface of *Staphylococcus carnosus*. *Mol. Microbiol.* **21**:491-500
- Street A.G., Mayo S.L.** (1999): Computational protein design. *Structure Fold. Des.* **7**:R105-109
- Terpstra C., Wensvoort G.** (1988): Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. Vet. Sci.*, **45**:137-142

- The International Human Genome Consortium** (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860-921
- Thiel H.J., Stark R., Weiland E., Rumenapf T., Meyers G.** (1991): Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* **65**:4705-4712
- Thiel H.J., Plagemann, Moennig** (1996): in *Fields Virology* (Eds. Fields, Knipe, Howley), 3. Eds. pp. 1059-1073, Lippincott-Raven, Philadelphia
- Van Delden C., Iglewski B.H.** (1998): Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:551-560
- van Oirschot J.T.** (1999): Diva vaccines that reduce virus transmission. *J. Biotechnol.* **73**:195-205
- Venter J.C. et al.,** (2001):The sequence of the human genome. *Science* **292**:1304-1351
- Vieira J., Messing J.** (1987): Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**:3-11
- Virnekäs B., Ge L., Pluckthun A., Schneider K.C., Wellnhofer G., Moroney S.E.** (1994): Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids. Res.* **22**:5600-5607
- Walsh C.** (1999): Deconstructing vancomycin. *Science* **284**:507-511.
- Watson J.D., Crick F.H.C** (1953): Molecular structure of Nucleic Acids. *Nature* **171**: 737-738
- Westerlund-Wikstrom B, Tanskanen J, Virkola R, Hacker J, Lindberg M, Skurnik M, Korhonen TK.** (1997): Functional expression of adhesive peptides as fusions to *Escherichia coli* flagellin. *Protein Eng.* **10**:1319-1326
- Weiland E., Ahl R., Stark R., Weiland F., Thiel H.J.** (1992):A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.* **66**:3677-3682
- Wengler, Bradley, Collett, Heinz, Schlesinger, Strauss** (1995): Flaviviridae, in: *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, (Eds. Murphy, Fauquet, Bishop, Ghabrial, Jarvis, Martelli, Mayo, Summers), pp. 415-427
- Wentzel A., Christmann A., Krätzner R., Kolmar H.** (1999): Sequence requirements of the GPNG η -turn of the *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. *J. Biol. Chem.* **274**:21037-21043.
- Wentzel A., Christmann A., Adams T., Kolmar H.** (2001): Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA. *J. Bacteriol.* **183**:7273-7284

Westaway E.G., Brinton M.A., Gaidamovich S.Y., Horzinek M.C., Igarashi A., Kaariainen L., Lvov D.K., Porterfield J.S., Russell P.K., Trent D.W. (1985): Togaviridae, *Intervirolgy*; **24**:125-139

Wiedemann B., Kliebe C., Kresken M. (1989): The epidemiology of η -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother. Suppl. B*:1-22

Yahr T.L., Mende-Mueller L.M., Friese M.B., Frank D.W. (1997): Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J. Bacteriol.* **179**:7165-7168

7. Anhang

7.1 DNA-Sequenzen der isolierten η -Lactamase Klone

Bla_1:

```

gctcaccagaaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttggg
1 -----+-----+-----+-----+-----+ 50
cgagtgggtctttgcgaccactttcattttctacgacttctagtcaaccc

A H P E T L V K V K D A E D Q L -

```

Bla_2

```

cttgagagttttcgccccgaagaacgttttcc
1 -----+-----+-----+--- 32
gaactctcaaaagcggggcttcttgcaaaagg

L E S F R P E E R F

```

Bla_3

```

cttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcact
1 -----+-----+-----+-----+----- 45
gaactctcaaaagcggggcttcttgcaaaaggttactactcgtga

L E S F R P E E R F P M M S T -

```

Bla_4

```

gttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgaca
1 -----+-----+-----+-----+----- 48
caactcatgagtgggtcagtgcttttcgtagaatgcctaccgtactgt

V E Y S P V T E K H L T D G M T

```

Bla_5

```

actcgccttgatcgttgggaaccggagct
1 -----+-----+----- 29
tgagcgggaactagcaacccttggcctcga

T R L D R W E P E -

```

Bla_6

```

caattaatagactggatggaggcggataaaagttgca
1 -----+-----+-----+----- 36
gttaattatctgacctacctccgcctatttcaacgt

Q L I D W M E A D K V A

```

Bla_7

```

gaggcggataaaagttgcaggaccacttcttcgctcggcccttccggct
1 -----+-----+-----+-----+----- 48
ctccgcctatttcaacgtcctggtgaagaagcagcgggaaggccga

E A D K V A G P L L R S A L P A

```

Bla_8

```

gcccttccggctggctggtttattgct
1 -----+-----+----- 27
cggaaggccgaccgaccaaataacga

A L P A G W F I A

```

Bla_9

```

actatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactga
1 -----+-----+-----+-----+----- 49
tgatacctacttgctttatctgtctagcgactctatccacggagtgact

T M D E R N R Q I A E I G A S L -

```

7.2 DNA-Sequenzen der isolierten CSFV-*E^{ms}* Klone

7.2.1 Sequenzen die nach Anreicherung mit dem mAb #22 erhalten wurden

mono 22_1

```

acagaaggccctccagataaggagtgtgccgtgacctgcaggtatgacaaaaataccgat
1 -----+-----+-----+-----+-----+----- 60
tgtcttccgggaggtctattcctcacacggcactggacgtccatactgtttttatggcta

T E G P P D K E C A V T C R Y D K N T D

gtcaacgtggtcaccaggccagg
61 -----+-----+----- 84
cagttgcaccagtgggtccgggtcc

V N V V T Q A R

```

22_2

```

tgcaggtatgacaaaaataccgatgtcaacgtggtcaccaggccaggaataggcc
1 -----+-----+-----+-----+-----+----- 56
acgtccatactgtttttatggctacagttgcaccagtgggtccgggtccttatccgg

C R Y D K N T D V N V V T Q A R N R

```

22_3

```

ccagataaggagtgtgccgtgacctgcaggtatgacaaaaataccgatgtcaacgtggtc
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 60
ggctattcctcacacggcactggacgtccatactgtttttatggctacagttgcaccag

P D K E C A V T C R Y D K N T D V N V V

```

22_4

```

tattgacaaaaataccgatgtcaacgtgggtcaccaggccaggaata
1 -----+-----+-----+-----+----- 46
atactgtttttatggctacagttgcaccagtgggtccggctcttat

Y D K N T D V N V V T Q A R N

```

22_5

```

gtgacctgcaggtatgacaaaaataccgatgtcaacgtgggtcaccaggccaggaatagg
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
caactggacgtccatactgtttttatggctacagttgcaccagtgggtccggctcttatcc

V T C R Y D K N T D V N V V T Q A R N R -

ccaactactc
61 -----+ 70
ggttgatgag

P T T

```

7.2.2 Sequenzen die nach Anreicherung mit dem mAb #24/16 erhalten wurden

24/16_1

```

acctgcaggtatgacaaaaataccgatgtcaacgtgggtcaccaggcc
1 -----+-----+-----+-----+----- 48
tggacgtccatactgtttttatggctacagttgcaccagtgggtccgg

T C R Y D K N T D V N V V T Q A

```

24/16_2

```

gccgtgacctgcaggtatgacaaaaataccgatgtcaacgtgggtcaccaggccagg
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 57
cggcactggacgtccatactgtttttatggctacagttgcaccagtgggtccggctcc

A V T C R Y D K N T D V N V V T Q A R

```

24/16_3

```

gtgacctgcaggtatgacaaaaataccgatgtcaacgtgggtcaccaggcc
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 51
caactggacgtccatactgtttttatggctacagttgcaccagtgggtccgg

V T C R Y D K N T D V N V V T Q A

```

24/15_4

```

acagaaggccctccagataaggagtgtgccgtgacctgcaggtatgacaaaaataccgat
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
tgtcttccgggaggtctattcctcacacggcactggacgtccatactgtttttatggcta

T E G P P D K E C A V T C R Y D K N T D

gtcaacgtgggtcaccaggccagg
61 -----+-----+-----+ 84
cagttgcaccagtgggtccggctcc

V N V V T Q A R

```

24/16_5

```

cctccagataaggagtggtgccgtgacctgcaggatgacaaaaataccgatgtcaacgtgg
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ggaggtctattcctcacacggcactggacgtccatactgtttttatggctacagttgcacc

P P D K E C A V T C R Y D K N T D V N V

```

24/16_6

```

tgcaggatgacaaaaataccgatgtcaacgtggcaccagg
1 -----+-----+-----+-----+----- 43
acgtccatactgtttttatggctacagttgcaccagtggtcc

C R Y D K N T D V N V V T Q

```

24/16_7

```

ccagataaggagtggtgccgtgacctgcaggatgacaaaaataccgatgtcaacgtggtc
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ggtctattcctcacacggcactggacgtccatactgtttttatggctacagttgcaccag

P D K E C A V T C R Y D K N T D V N V V

accaggccaggaata
61 -----+----- 76
tgggtccggtccttat

T Q A R N

```

24/16_8

```

tgcaggatgacaaaaataccgatgtcaacgtggcaccaggccaggaataggccaact
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
acgtccatactgtttttatggctacagttgcaccagtggtccggctccttatccggttga

C R Y D K N T D V N V V T Q A R N R P T

actc
61 ---- 64
tgag

T

```

24/16_9

```

cctccagataaggagtggtgccgtgacctgcaggatgacaaaaataccgatgtcaacgtgg
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 61
ggaggtctattcctcacacggcactggacgtccatactgtttttatggctacagttgcacc

P P D K E C A V T C R Y D K N T D V N V

```

24/16_10

```

aacaggacccaaacaaatgtgacagaaggccctccagataaggagtggtgccgtgacctgc
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ttgtcctgggtttgtttaaactgtcttccgggaggtctattcctcacacggcactggacg

N R T Q T N L T E G P P D K E C A V T C

aggatgacaaaaataccgatgtcaacgtggcaccaggcc
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 102
tccatactgtttttatggctacagttgcaccagtggtccgg

R Y D K N T D V N V V T Q A

```

7.2.3 Sequenzen die nach der Anreicherung mit dem polyklonalen Serum erhalten wurden

Ser66_1

```

acctggtttggtgcctatgcc
1 -----+-----+- 21
tggaccaaaccacggatacgg

T W F G A Y A

```

Ser66_3

```

agaagcaaacctggtttggtgcctatgcc
-----+-----+-----+
tcttcgttttggaccaaaccacggatacgg

R S K T W F G A Y A

```

Ser66_2

```

aaatcctggtttggtgcctatgcc
1 -----+-----+----- 24
ttttggaccaaaccacggatacgg

K T W F G A Y A

```

Ser66_4

```

ctagagaggagaagcaaacctggtttggtgcctatgcc
1 -----+-----+-----+----- 39
gatctctctcttcttcgttttggaccaaaccacggatacgg

L E R R S K T W F G A Y A

```

Ser66_5

```

catctggccactgacacggaac
1 -----+-----+----- 22
gtagaccggtgactgtgccttg

H L A T D T E L

```

Ser66_6

```

ctggccactgacacggaactgaaagagatacgcgggatgatggat
1 -----+-----+-----+-----+----- 45
gaccggtgactgtgccttgactttctctatgcgcctactaccta

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

```

Ser66_7

```

tacaacatagacccttgattcagt
1 -----+-----+----- 25
atgttgtatctgggaacctaagtca

Y N I D P W I Q

```

7.3 Sequenzen der isolierten PMS1 Klone

PMS1_kl3

```

gaatggttctgataaatgggtgatggcatagacccttcaaattatgagttcttagctttaaaa
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
cttacaagactattaccactaccgatatctggaagtttaataactcaagaatcgaaatctt

E C S D N G D G I D P S N Y E F L A L K

cattacacatcaa
-----+---- 73
gtaatgtgtagtt

H Y T S

```

PMS1_kl6

```

tattttgatattgatggtgaaaagttccaagaaaaagcg
1 -----+-----+-----+-----+----- 39
ataaaactataactaccacttttcaaggttctttttcgc

Y F D I D G E K F Q E K A

```

PMS1_kl7

```

gactctatatacgcagagattgagccagttgaaatcaatgtgagaactcctctaaagaac
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ctgagatatatgcgctctctaactcgggtcaacttttagttacactcttgaggagatttcttg

D S I Y A E I E P V E I N V R T P L K N

tcacgt
61 ----- 66
agtgca

S R

```

PMS1_kl10

```

accagagtcggttcataatctcagtgaacttgataagccttggaat
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 45
tggctctcagcaagtattagagtcacttgaactattcggaacctta

T R V V H N L S E L D K P W N

```

7.4 Sequenzen der isolierten PAGI2(C) Klone

Nr. 1

```

ggtcagggtccagcgcagcagcagctcgtagccgatgccagcagctcggacatctggccgat
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ c60
ccagtcaggtcgcgggtcgtgcagcatcggctacgggtcgtcgcagcctgtagaccggcta

G Q V Q R Q H V V A D A Q Q L G H L A D

cagctcgtcttgcaagcgcgtcggcgcgaaactcgtcgcctcgtgtcgaactgcgccag
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
gtcgagcagaacgtgcgcgacgccgcttgagcagcgggacgcacagcttgacgcggtc

Q L V L H A L R R E L V A L R V E L R Q

```

cacctcctgaaagaaactgtcgaagtccagcggcag
 121 -----+-----+-----+----- 156
 gtggaggactttctttgacagcttcaggtcgccgtc

 H L L K E T V E V Q R Q

Nr. 2

gtcaccttcggcttctcgacgggcagg
 1 -----+-----+----- 27
 cagtggaagccgaagagctgcccgtcc

 V T F G F S T G R

Nr. 3

atttctgtggttttcagccatgcattgttccttccaaatcgatggatgct
 1 -----+-----+-----+-----+-----+ 50
 taaagacacccaaaagtcggtacgtaacaaggaaggttagctacctacga

 I S V V F S H A L F L P N R W M

Nr. 4

gcaggcatcgtggtgtcacgctCGTCgTTTGGTatGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAA
 1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 cgtccgtagcaccacagtgcgaGCAGcAAACCAtaCCGAAGTAAGTCGAGGCCAAGGGTT

 A G I V V S R S S F G M A S F S S G S Q

 CGATCAAGGCGTTTCCTGACTCTGGCGTCGGTGCTCGTGGGAGGCGTCTCGATATGGC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 118
 GCTAGTTCCGCAAAGGACTGAGACCGCAGCCACGAGCACCCCTCCGACAGCTATACCG

 R S R R F L T L A S V L V G G V S I W

Nr. 5

accagttcgcctcgtcctcgggctatTTTTgccaaggcgcgggaacggccttcATGCCGT
 1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 tgggtcaagcggagcaggagcccgataaaaacggttccgcgccttgccggaagTACGGCA

 T S S P R P R A I F A K A R E R P S C R

 ATCTGCTCAGCGCCATGAAGCCGTCTGGGTCCGGTCGAGCGTGCGGGTCAACCCGGTTTC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 TAGACGAGTCGCGGTACTTCGGCAGACCCAGGCCAGCTCGCACGCCAGTTGGGCCAAAG

 I C S A P * S R L G P V E R A G Q P G F

Nr.6

ggtgggcgcggtgctgtgggcccctcggcgtggcggc
 1 -----+-----+-----+----- 36
 ccaccgcgccacgacaccgggagccgcaccgccg

 G G R G A V G P R R G G

Nr. 7

```

cgaggatggaggccaacggctgacgctgcgcctggctcagcgccacagcgtggccgagc
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
gctcctacctccggttgccgactgcgacgcgaccgagtcgcgggtgtcgcaccggctcg

R G W R P T A D A A P G S A P T A W P S

gcgtgccggtgcggc
61 -----+----- 75
cgcacggccacgccg

A C R C G

```

Nr. 8

```

CGCGAGCTCTGCCAGCAGGACGGTGCTCTCGGCCTTTTCGCCGCCGGCAGAAGTCAGCTT
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GCGCTCGAGACGGTCGTCTGCCACGAGAGCCGAAAAGCGGCGCCGTCTTCAGTCGAA

R E L C Q Q D G A L G L F A A G R S Q L

CGTCGCGGTTTCCGGCGCA
61 -----+----- 79
GCAGCGCCAAAGCCGCGT

R R G F R R

```

Nr. 9

```

GCGTCCCGGTATTTCATCGGCAACGTCGATCGCCTGGAAAAGCGCATCACGCGCGGTACC
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CGCAGGGCCATAAGTAGCCGTTGCAGCTAGCGGACCTTTTCGCGTAGTGCGCGCGCATGG

A S R Y S S A T S I A W K S A S R A R T

GGCGGACG
61 ----- 68
CCGCCTGC

G G

```

Nr. 10

```

CCCGTTGCGATGCGCCACTGCAACTGCCGATAAAGCCAGGTGTCGGGGCGCCACGCTT
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 59
GGGCAACGCTACGCGGTGACGTTGACGGCTATTTTCGGTCCACAGCCCCGCGGGTGCGAA

P V A M R H C N C R * (S Q V S G R P R)

```

Nr 11

```

TGCGCTCGCTGTGCTCGGACCAGGCCCTGGATCGCTGCCTGCAGCAGGCCGGCATCGTGA
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ACGCGAGCGACACGAGCCTGGTCCGGGACCTAGCGACGGACGTCGTCCGGCCGTAGCACT

C A R C A R T R P W I A A C S R P A S *

AGGCATTTCATCAGCCACCCCGGC
61 -----+-----+----- 83
TCCGTAAGTAGTCGGTGGGGCCG

(R H S S A T P)

```

7.5 Abkürzungsverzeichnis

A:	Adenin
Abb.:	Abbildung
Ap:	Ampicillin
APS:	Ammoniumperoxodisulfat
AS:	Aminosäure
ATP:	Adenosintriphosphat
<i>bla</i> :	Gen für β -Lactamase
bp:	Basenpaare
BSA:	Rinderserum-Albumin
bzw.:	beziehungsweise
C:	Cytosin
ca.:	circa
<i>cat</i> :	Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase
Cm:	Chloramphenicol
C-Terminus:	Carboxiterminus
ddNTP:	Didesoxynukleosidtriphosphat
d.h.:	das heißt
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxiribonukleinsäure
dNTP:	Desoxinukleosidtriphosphat
dsDNA:	Doppelsträngige DNA
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
<i>eeti-II</i> :	Gen kodierend für den Trypsininhibitor EETI-II
FACS:	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
G:	Guanin
g:	Gramm
h:	Stunden
HEC:	Hydroxyethyl-Cellulose
Ig:	Immunglobulin
IPTG:	Isopropyl- β -D-thiogalactosid

kbp:	Kilobasenpaare
l:	Liter
M:	Molar
MACS:	Magnetische Zellsortierung
σ :	Mikro (10^{-6})
min:	Minuten
ml:	Milliliter
n:	Nano (10^{-9})
N:	Jedes der vier Nukleotide
Nr.:	Nummer
N-Terminus	Aminoterminus
OD:	Optische Dichte
ori:	Replikations Ursprung
p:	Pico (10^{-12})
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG:	Polyethylenglycol
P/O:	Promoter/Operator
RNA:	Ribonukleinsäure
RT:	Raumtemperatur
s:	Sekunde
S:	Guanin oder Cytosin
SDS:	Natriumdodecylsulphat
ssDNA:	Einzelsträngige DNA
send:	Kodierende Sequenz für das Sendai-Epitop
s.o:	siehe oben
s.u:	siehe unten
T:	Thymin
Tab.:	Tabelle
TEMED:	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
u:	Enzymeinheiten
u/min:	Umdrehungen pro Minute
UV:	Ultraviolett
V:	Volt
vergl.:	vergleiche

Vol:	Volumen
v/v:	Volumen pro Volumen
w/v:	Gewicht pro Volumen
X-gal:	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Thio-Galactopyranosid
z.B.:	zum Beispiel

7.6 Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie der Georg-August Universität Göttingen; in der klinischen Forschergruppe *molecular pathology of cystic fibrosis and pseudomonas genomics* der Medizinischen Hochschule Hannover und im *Göttingen Genomics Laboratory* angefertigt. Allen Mitarbeitern dieser Einrichtungen danke ich für die Unterstützung und den kollegialen Umgang. Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kolmar: Hans-Ulrich Schmoldt, Thorsten Adams und Alexander Wentzel. Frau Bettina Hucke danke ich für den großen Eifer und den unermüdlichen Einsatz den Sie bei der Umsetzung von Experimenten zeigte. Herrn Professor Fritz danke ich für die stets konstruktiv-kritische Betrachtung der Versuche und für das Feuer des Heraklit, ohne ihn hätte ich wahrscheinlich viele Jahre mit dem Messen von Aktionspotentialen verbracht. Herrn Dr. Kramer Danke ich für die Minuten auf dem „Balkon“ während derer man ihm immer Geheimnisse der Bakteriengenetik entlocken konnte. Herrn Dr. Kolmar Danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen und für Andreeeeeeeeeeeeeass!

Der größte Dank gilt meinen Eltern, meinen Schwestern und Christine die meine Unausstehlichkeit während der vergangenen Zeit ertragen haben.

7.7 Lebenslauf

Name:	Andreas Christmann	
Geburtstag und Ort:	29.11.1972, Göttingen	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Familienstand:	ledig	
Eltern:	Karl-Heinz und Jutta Christmann	
Schulbildung:	1979-1992	Freie Waldorfschule Göttingen Abschluß Allgemeine Hochschulreife
Grundwehrdienst:	1992-1993	Osterode
Studium:	1993-1999	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
	1998-1999	Diplomarbeit am Institut für Molekulare Genetik der Georg August-Universität Göttingen
Promotion:	Seit Anfang 2000 Beginn der Arbeiten am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie	