

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. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	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. ZUSAMMENFASSUNG	128
6. LITERATUR.....	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