

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Selektion von Proteinen.....	1
1.1.1 <i>In vivo</i> versus <i>in vitro</i> Selektion.....	2
1.2 Zellfreie Translation: Der Schlüssel zur <i>in vitro</i> Selektion von Proteinen.....	4
1.3 <i>In vitro</i> Selektionsstrategien.....	6
1.3.1 SELEX.....	6
1.3.2 ‘Ribosome Display’	7
1.3.2.1 Prinzip des ‘Ribosome Displays’	8
1.3.2.2 Das ‘Ribosome Display’ Konstrukt	11
1.3.3 Weitere Systeme zur <i>in vitro</i> Selektion von Proteinen.....	13
1.3.3.1 ‘mRNA Display’	13
1.3.3.2 „Wasser in Öl Emulsionen“	14
1.4 Streptavidin	14
1.4.1 Streptavidinbindende Peptide	16
2 Zielsetzung.....	17
3 Methoden.....	18
3.1 Mikrobiologische Methoden.....	18
3.1.1 Zellanzucht von <i>E. coli</i> in Flüssigkultur	18
3.1.2 Zellanzucht von Einzelkolonien.....	18
3.1.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	18
3.2 Methoden zur Präparation, Aufreinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	19
3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	19
3.2.2 Ethanol- und Isopropanol-Präzipitation.....	19
3.2.3 Phenolextraktion.....	20
3.2.4 Gelfiltration.....	21
3.2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	21
3.3 Gelelektrophorese.....	21
3.3.1 Agarosegel-Elektrophorese von DNA und RNA	22
3.3.2 Elution von DNA aus nativen Agarosegelen.....	23
3.3.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	23
3.3.4 Denaturierende PAGE von DNA und RNA.....	24

3.3.4.1	Probenvorbereitung für die denaturierende PAGE	25
3.3.4.2	Polyacrylamidgele für die DNA-Sequenzierung	26
3.3.4.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	27
3.4	Enzymatische DNA-Synthese	28
3.4.1	Komplementärstrang-Synthese	28
3.4.2	Reverse Transkription	29
3.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
3.4.3.1	Standard PCR	30
3.4.3.2	PCR nach reverser Transkription	31
3.5	<i>In vitro</i> DNA-Rekombinationstechniken	31
3.5.1	Restriktionsenzymspaltung	31
3.5.2	Dephosphorylierung	32
3.5.3	Phosphorylierung	32
3.5.4	DNA-Ligation	33
3.5.5	Transformation von <i>E. coli</i> JM109-Zellen	33
3.6	DNA-Sequenzierung	34
3.7	<i>In vitro</i> Transkription	35
3.8	<i>In vitro</i> Proteinbiosynthese	37
3.9	Fällung von Protein und RNA mittels Trichloressigsäure	40
3.10	Detektion von β -Strahlung	41
3.10.1	Szintillationszählung	41
3.10.2	Autoradiographie	41
3.11	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen	41
3.11.1	Strep-tag II Affinitätschromatographie	42
3.11.2	His-tag Affinitätschromatographie	43
3.12	‘Ribosome Display’	43
3.13	Bestimmung von Bindungskonstanten	44
3.13.1	Bestimmung von Dissoziationskonstanten durch ‘SPR’-Spektroskopie	45
3.13.2	Verwendung des NTA Sensor-Chips	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Etablierung des ‘Ribosome Display’	48
4.1.1	Design von Genen für das ‘Ribosome Display’	48
4.1.1.1	Konstruktion von Plasmiden für das ‘Ribosome Display’	50
4.1.2	Untersuchungen zur Entstehung von PRM-Komplexen	51

4.1.3 Isolierung von PRM-Komplexen mittels Strep-tag II	53
4.1.4 Abtrennung von PRM-Komplexen mittels His-tag.....	57
4.1.4.1 Optimierung der Abtrennung von PRM-Komplexen.....	61
4.1.4.2 Durchführung von Testselektionen.....	66
4.2 Konstruktion von DNA-Bibliotheken für das ‘Ribosome Display’	69
4.2.1 Design von Genen zur Generierung einer ‘Ribosome Display’ Bibliothek	71
4.2.1.1 Konstruktion von pSEL4 als Basis für eine Bibliothek	71
4.2.1.2 Konstruktion von pFALinklpp als Basis für eine Bibliothek	72
4.2.1.3 Löslichkeit der Proteine SEL4 und FALinklpp	73
4.2.2 Präparation und Vorbereitung der Vektoren.....	74
4.2.3 Erzeugung und Vorbereitung der randomisierten DNA-Fragmente	75
4.2.4 Insertion der randomisierten DNA-Fragmente in die Vektoren.....	76
4.2.5 Qualität der erhaltenen Bibliotheken.....	80
4.3 Durchführung der Selektion.....	81
4.3.1 Verlauf der Selektion mit SELx	83
4.3.2 Verlauf der Selektion mit FAX	85
4.4 Klonierung und Sequenzierung.....	86
4.4.1 SELx-Sequenzen.....	87
4.4.2 FAX-Sequenzen.....	88
4.5 Streptavidin-Bindungspeptide.....	89
4.5.1 Bestimmung der Bindungskonstanten.....	89
4.5.2 Bindungstest an Streptavidin-Sepharose	93
4.5.3 FAX-Peptid 3 als Affinitätspeptid.....	95
5 Diskussion	97
5.1 Die Selektionsmethode.....	97
5.1.1 Etablierung des ‘Ribosome Display’	98
5.2 Konstruktion der DNA-Bibliotheken.....	101
5.3 Selektion streptavidinbindender Peptide.....	104
5.4 Charakterisierung der selektierten Moleküle	106
5.5 Einfluß der verwendeten Bibliotheken.....	108
5.6 Ausblick	109

6 Zusammenfassung	110
7 Literaturverzeichnis	112
8 Anhang.....	118
8.1 Geräte	118
8.2 Chemikalien, Biochemica, Lösungsmittel.....	118
8.3 Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren.....	120
8.4 Kits.....	120
8.5 Sonstiges.....	120
8.6 Verwendete Oligonukleotide.....	121
8.7 Konstruierte Plasmide zur Generierung der Bibliotheken.....	122
8.8 Abkürzungen.....	125
8.9 Eigene Publikationen.....	128
8.10 Danksagung.....	129