

Entwicklung von neuen Verfahren zur Ultra- Hochdurchsatz-Durchmusterung von kombinatorischen Oxidase- und Antikörperbibliotheken

Vom Fachbereich Chemie



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Tim Heiseler

aus Bernkastel-Kues

Referent: Prof. Dr. Harald Kolmar

Korreferent: Prof. Dr. Heribert Warzecha

Tag der Einreichung: 20. Februar 2013

Tag der mündlichen Prüfung: 15. April 2013

Darmstadt 2013

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	7
1.1	<i>PROTEIN DESIGN</i>	10
1.1.1	<i>Protein Design von Enzymen</i>	12
1.2	METHODEN ZUR PRÄSENTATION UND DURCHMUSTERUNG VON KOMBINATORISCHEN BIBLIOTHEKEN	14
1.2.1	<i>Phage Display</i>	15
1.2.2	<i>Oberflächenpräsentation von Proteinen auf E. coli Zellen</i>	17
1.2.3	<i>Oberflächenpräsentation von Proteinen auf Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.3	OXIDOREDUKTASEN	21
1.3.1	<i>Glukose Oxidase</i>	22
1.3.2	<i>Galaktose Oxidase</i>	23
1.4	VERFAHREN ZUR DURCHMUSTERUNG VON OBERFLÄCHENPRÄSENTIERTEN ENZYMBIBLIOTHEKEN IM HOCHDURCHSATZ ..	26
1.5	GENERIERUNG VON SPEZIFISCHEN BINDEMOLEKÜLEN	28
1.5.1	<i>Immunglobulin basierte Bindemoleküle</i>	29
1.6	ZIELSETZUNG	31
2	MATERIALIEN	32
2.1	BAKTERIENSTÄMME	32
2.2	HEFESTÄMME	33
2.3	PLASMIDE	34
2.3.1	<i>pAskint110GOaseM1</i>	34
2.3.2	<i>pEst100GOaseM1</i>	35
2.3.3	<i>pAK200GOaseM1</i>	36
2.3.4	<i>pAsk75GOaseM1</i>	37
2.3.5	<i>pET16bTarget</i>	38
2.3.6	<i>pCTGOX</i>	39
2.3.7	<i>DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker</i>	40
2.3.8	<i>Molekulargewichtsmarker für Proteine</i>	40
2.4	OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE	41
2.5	ENZYME UND PROTEINE.....	44
2.6	CHEMIKALIEN	44
2.7	SONSTIGE MATERIALIEN UND GERÄTE	45
2.7.1	<i>Nährmedien zur Anzucht von E. coli</i>	46
2.7.2	<i>Nährmedien zur Anzucht von Saccharomyces cerevisiae</i>	46
2.8	LÖSUNGEN UND PUFFER	47

3	METHODEN	52
3.1	MIKROBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN	52
3.1.1	Arbeiten mit Bakterien	52
3.1.2	Arbeiten mit Phagen	53
3.1.3	Arbeiten mit Hefen	54
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN	56
3.2.1	Sterilisation von verwendeten Geräten	56
3.2.2	Fällung von DNA mit Ammoniumacetat und Ethanol	57
3.2.3	Phenol/Chloroform Extraktion von DNA aus wässrigen Lösungen	57
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	58
3.2.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe des Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up-System-Kits (Promega)	59
3.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli	59
3.2.7	Dichtezentrifugation mittels Sucrose Gradient	60
3.2.8	Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen	61
3.2.9	Bestimmung des Phagentiters	61
3.3	ENZYMATISCHE MANIPULATION VON DNA	62
3.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	62
3.3.2	Ligation von DNA-Fragmenten	62
3.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	63
3.3.4	Kolonie PCR-Reaktion	64
3.3.5	Splicing by overlap extension PCR (SOE-PCR)	64
3.4	PROTEINCHEMISCHE ARBEITSMETHODEN	66
3.4.1	Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
3.4.2	Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen über die Bindung eines spezifischen Antikörpers (Western Blot)	68
3.4.3	Aufschluss von Bakterienzellen mittels Ultraschall	69
3.4.4	Aufschluss von Bakterienzellen mittels French [®] -Press	70
3.4.5	Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography (IMAC)	70
3.4.6	Gelfiltrationschromatographie (GFC)	71
3.4.7	Dialyse von Proteinen	71
3.4.8	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	71
3.5	OXIDATION VON PROTEINEN MITTELS NATRIUMPERIODAT	72
3.6	ENZYMATISCHE AKTIVITÄTSTESTS BZW. MARKIERUNG VON MIKROBIOLOGISCHEN ENTITÄTEN MITTELS BIOTINTYRAMID	72
3.6.1	Nachweis von Oxidase Aktivität mittels ABTS oder Amplex Red	72
3.6.2	Nachweis der Oxidase Aktivität mittels Solid Phase Assay	73
3.6.3	Biotintyramid Markierung von E. coli Zellen (pIII display) mittels Oxidase Aktivität	75

3.6.4	<i>Biotintyramid Markierung von mikrobiellen Entitäten mittels Oxidase Aktivität.....</i>	75
3.6.5	<i>Phagen-ELISA.....</i>	77
3.7	ZELLBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN.....	78
3.7.1	<i>Immunfluoreszenz-Markierung von Zellen.....</i>	78
3.7.2	<i>Durchflusszytometrie von Escherichia coli-Zellen.....</i>	79
3.7.3	<i>Magnetische Sortierung von produzierten Phagen (MACS).....</i>	79
3.8	CHEMISCHE ARBEITSMETHODEN.....	80
3.8.1	<i>Biotintyramid Synthese.....</i>	80
3.9	PYROSEQUENZIERUNG VON KOMBINATORISCHEN BIBLIOTHEKEN.....	81
3.10	BIOLAYERINTERFEROMETIE MESSUNGEN ZUR BESTIMMUNG VON BINDUNGSEIGENSCHAFTEN.....	83
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	85
4.1	ETABLIERUNG EINES HOCHSATZ - DURCHMUSTERUNGSVERFAHRENS FÜR OXIDASEN AUF DER OBERFLÄCHE VON <i>E. COLI</i> ZELLEN.....	85
4.1.1	<i>Präsentation von Oxidasen auf E. coli Zellen.....</i>	85
4.1.2	<i>Präsentation von Oxidasen auf E. coli Zellen mittels pIII Display Technologie.....</i>	87
4.1.3	<i>Diskussion.....</i>	94
4.2	DURCHMUSTERUNG VON OXIDASE BIBLIOTHEKEN MITTELS PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY.....	97
4.2.1	<i>Präsentation von Oxidasen auf Phagen.....</i>	98
4.2.2	<i>Validierung des Verfahrens zur Isolierung von enzymatisch aktiven Oxidasen mittels Phage Display</i>	99
4.2.3	<i>Erstellung einer Galaktose Oxidase Variantenbibliothek mittels Error Prone PCR.....</i>	101
4.2.4	<i>Charakterisierung der generierten Variantenbibliothek mittels 454 Sequenzer.....</i>	103
4.2.5	<i>Diskussion.....</i>	106
4.3	ENTWICKLUNG EINES HOCHDURCHSATZ-DURCHMUSTERUNGSVERFAHRENS FÜR ANTIKÖRPERBIBLIOTHEKEN DURCH ENZYMVERMITTELTE REPORTERDEPOSITION.....	111
4.3.1	<i>Generierung des Oxidase-Zielprotein Konjugates.....</i>	113
4.3.2	<i>Nachweis der Funktionalität des verwendeten anti LipH V_HHs sowie der enzymvermittelten Reporterdeposition.....</i>	117
4.3.3	<i>Durchführung von Mischungsexperimenten.....</i>	119
4.3.4	<i>Isolation von spezifischen Bindern via ³CARD.....</i>	123
4.3.5	<i>Weiterentwicklung des ³CARD Verfahrens und Isolation von weiteren Target bindenden V_HHs... </i>	127
4.3.6	<i>Diskussion.....</i>	128
4.4	ENTWICKLUNG EINES VERFAHRENS ZUR DURCHMUSTERUNG VON OXIDASE BIBLIOTHEKEN UNTER VERWENDUNG DER YEAST DISPLAY TECHNOLOGIE.....	132
4.4.1	<i>Präsentation von Oxidasen auf Hefen.....</i>	133
4.4.2	<i>Erstellung und Validierung von Oxidase Varianten Bibliotheken für die Yeast Display Technologie...</i>	137

4.4.3	<i>Optimierung und Anwendung des Verfahrens zur Durchmusterung von Oxidase Variantenbibliotheken mittels Hefe Oberflächen Präsentation</i>	145
4.4.4	<i>Diskussion</i>	151
5	ZUSAMMENFASSUNG	156
6	LITERATUR	158
7	PUBLIKATIONEN	172
8	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	173
9	DANKSAGUNG	175
10	LEBENS LAUF	176
	ANHANG	177
	CHARAKTERISIERUNG DES SYNTHETISIERTEN BIOTINTYRAMIDES MITTELS LCMS SOWIE HPLC	177
	SEQUENZEN DER ANALYSIERTEN GLUKOSE OXIDASE KLONE	179