

**DIE α -AMYLASE AUS *BACILLUS*
AMYLOLIQUEFACIENS:
VERBESSERUNG DER ALKALIAKTIVITÄT UND
STEIGERUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT MITTELS
GERICHTETER EVOLUTION**

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Cornelius Bessler
aus Stuttgart

Hauptberichter:	Prof. Dr. R. D. Schmid
Mitberichter:	Prof. Dr. D. H. Wolf
Vorsitzender:	Prof. Dr. H. Bertagnolli

Tag der mündlichen Prüfung: 25. April 2002

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2002

Count the stars in the sky.
Measure the waters of the ocean with a teaspoon.
Number the grains of sand on the sea shore.
Impossible you say.

Two Lovers, Samuel M. Johnson. Aus Philip Glass, Einstein on the Beach

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

DANKSAGUNG

Für die Arbeitsmöglichkeit am Institut, die freundliche Aufnahme und seine Unterstützung danke ich Prof. Rolf D. Schmid, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jutta Schmitt für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Genetik, für die ständige Hilfsbereitschaft, ihre Unterstützung im Laboralltag und die gute Zusammenarbeit.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes möchte ich mich für das freundliche Klima, während und nach der Arbeit, bedanken.

Besonderer Dank geht dabei an Sandra Barth, Rut Betge, Eckart Bonacker, Kai Doderer, Erik Henke, Isabelle Kauffmann, Stefan Lange, Stefan Minning, Volker Nödinger, Peter Ölschläger, Ralf Petri, Holger Scheib und Sandra Vorlová für die interessanten fachlichen und weniger fachlichen Diskussionen.

Ich danke der Firma Henkel KGaA für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Ein herzlicher Dank geht dabei an Dr. Karl-Heinz Maurer und Dr. Susanne Schmitz für die motivierenden Diskussionen.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für die Unterstützung während allen Lebensphasen, ihr Verständnis und ihre Liebe.

Meinen ganz besonderer Dank für Dich, Monika, für Deine Geduld, Dein Vertrauen und Deine überwältigende Liebe.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IX
ABKÜRZUNG DER PROTEINOGENEN AMINOSÄUREN NACH IUPAC	XIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XIV
TABELLENVERZEICHNIS	XVII
ABSTRACT.....	XIX
ZUSAMMENFASSUNG	XXVIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 α-AMYLASEN	1
1.1.1 FUNKTION UND EIGENSCHAFTEN VON α -AMYLASEN.....	1
1.1.2 STRUKTUR UND AUFBAU	2
1.1.3 DER KATALYTISCHE MECHANISMUS VON α -AMYLASEN	4
1.2 DIE α-AMYLASE AUS BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS	5
1.2.1 BIOCHEMISCHE UND GENETISCHE EIGENSCHAFTEN.....	5
1.2.2 VERGLEICH DER BAA MIT VERWANDTEN α -AMYLASEN	6
1.3 VERWENDUNG VON α-AMYLASEN IN INDUSTRIELLEN PROZESSEN	8
1.4 METHODEN ZUR MUTAGENESE VON PROTEINEN	9
1.4.1 RATIONALES PROTEINDESIGN: ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE	9
1.4.2 GERICHTETE EVOLUTION	10
1.4.3 METHODISCHER VERGLEICH VON RATIONALER MUTAGENESE UND ZUFALLSMUTAGENESE	14
1.4.4 IDENTIFIZIERUNG VERBESSERTER KLONE.....	15
1.5 SCHEMATISCHER ABLAUF VON EXPERIMENTEN ZUR GERICHTETEN EVOLUTION	16
2 ZIELSETZUNG	18
3 MATERIALIEN UND METHODEN	19
3.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME.....	19
3.2 GERÄTE	21
3.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	22
3.4 VERWENDETE SOFTWARE UND ONLINE-DATENBANKEN	23
3.5 BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	23
3.5.1 BAKTERIENSTÄMME:	23
3.5.2 PLASMIDE	23
3.6 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	24
3.6.1 KULTURMEDIEN.....	24
3.6.2 STAMMHALTUNG AUF FESTEN NÄHRBÖDEN.....	24

3.6.3	STAMMHALTUNG IN FLÜSSIGKULTUREN	24
3.6.4	ANZUCHT IN FLÜSSIGMEDIEN	25
3.7	KULTIVIERUNG UND EXPRESSION DER BAA IN pGBAA-WT.....	25
3.7.1	EXPRESSION DER BAA IM SCHÜTTELKOLBENMAßSTAB.....	25
3.7.2	EXPRESSION DER BAA IN pJL3-KOTRANSFORMIERTEN <i>E. COLI</i>	25
3.7.2.1	QUASI-LYSE-TEST MIT pJL 3 TRANSFORMIERTEN <i>E. COLI</i> DH5 α ODER <i>E. COLI</i> XL1-BLUE	26
3.7.2.2	EXPRESSION DER BAA IN pJL3-pGBAA-WT-TRANSFORMIERTEN <i>E. COLI</i>	26
3.7.3	KULTIVIERUNG IN MIKROTTITERPLATTEN.....	27
3.8	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	27
3.8.1	PERIPLASMAPALTUNG	27
3.8.2	AUFREINIGUNG DER BAA AUS PERIPLASMAFRAKTIONEN.....	28
3.8.3	PROTEINGEHALTBESTIMMUNG	29
3.8.4	SDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	29
3.8.5	COOMASSIE-FÄRBUNG VON POLYACRYLAMID-GELEN.....	32
3.8.6	SILBERFÄRBUNG VON POLYACRYLAMID-GELEN.....	32
3.9	MESSUNG DER AMYLASEAKTIVITÄT	34
3.9.1	UNIT-DEFINITION	35
3.9.2	ALLGEMEINE LÖSUNG.....	35
3.9.3	QUALITATIVES SCREENING AUF α -AMYLASEAKTIVITÄT.....	35
3.9.4	DINITROSALICYLSÄURE-ASSAY (Miller 1959)	35
3.9.5	PHADEBAS [®] -TEST (Hall <i>et al.</i> 1970).....	38
3.9.5.2	PHADEBAS [®] -SCHNELLTEST.....	38
3.9.5.3	PHADEBAS [®] -TEST ZUR AUFNAHME VON pH-PROFILIEN	39
3.9.6	PHADEBAS [®] -TEST IM MIKROTTITERPLATTENFORMAT.....	39
3.10	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	40
3.10.1	MINI-PLASMID-DNA-ISOLATION MIT DEM QIAPREP SPIN MINIPREP KIT (QIAGEN)	40
3.10.2	SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	41
3.10.3	AUFTRENNUNG VON DNA DURCH AGAROSEGELELEKTROPHORESE.....	41
3.10.4	FRAGMENTISOLIERUNG AUS AGAROSEGELEN.....	43
3.10.5	AUFREINIGUNG VON DNA NACH RESTRIKTIONSVERDAU UND PCR MIT DEM WIZARD PCR-PURIFICATION KIT (PROMEGA)	43
3.10.6	LIGATION VON DNA MIT DER T4-DNA-LIGASE.....	44
3.10.7	TRANSFORMATION IN <i>E. COLI</i> (PEG/DMSO-METHODE)	44
3.10.8	SEQUENZIERUNG VON DNA	45
3.11	MUTAGENESE- UND REKOMBINATIONSMETHODEN	48
3.11.1	ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE DURCH QUIKCHANGE	48
3.11.2	ZUFALLSMUTAGENESE DURCH ERROR-PRONE PCR.....	49
3.11.3	REKOMBINATION DURCH DNA-SHUFFLING.....	51

3.12	BIOINFORMATISCHE METHODEN	55
3.12.1	HOMOLOGIEMODELLING	55
3.12.2	AUSTAUSCH VON AMINOSÄUREN IN EINER VISUALISIERTEN PROTEINSTRUKTUR.....	56
4	ERGEBNISSE.....	57
4.1	EXPRESSIONSSYSTEM: KLONIERUNG VON PGBAA-WT UND EXPRESSION DER BAA IN ESCHERICHIA COLI	57
4.1.1	KLONIERUNG VON PGBAA-WT	57
4.1.2	EXPRESSION VON BAA IN <i>E. COLI</i> BZW. IN <i>E. COLI</i> (pJL3).....	59
4.2	SCREENINGSYSTEM	60
4.2.1	ASSAYS ZUR BESTIMMUNG DER α -AMYLASEAKTIVITÄT IM MIKROMABSTAB.....	60
4.2.2	VALIDIERUNG DES PHADEBAS®-ASSAYS IN MIKROTTITERPLATTEN.....	63
4.2.3	BESTIMMUNG DES WERTEBEREICHS FÜR DEN BAA-WILDTYP	65
4.2.3.1	ZIELSETZUNG.....	65
4.2.3.2	DURCHFÜHRUNG	65
4.3	IDENTIFIKATION INTERESSANTER STELLEN ZUR MUTAGENESE.....	68
4.3.1	PI-VERGLEICH DER BAA MIT ALKALIAKTIVEN α -AMYLASEN.....	68
4.3.2	SEQUENZVERGLEICH DER BAA MIT ALKALIAKTIVEN α -AMYLASEN	69
4.3.3	STRUKTURVERGLEICH VON BAA MIT ALKALIAKTIVEN α -AMYLASEN	70
4.3.4	ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE.....	71
4.4	ERROR-PRONE BIBLIOTHEK DER 1. GENERATION.....	72
4.4.1	EINSTELLUNG DER MUTATIONSRATE.....	72
4.4.2	AUFBAU DER MUTANTENBIBLIOTHEK.....	73
4.4.3	SCREENING DER ERROR-PRONE BIBLIOTHEK.....	74
4.4.4	ANALYSE DER MUTANTEN	75
4.5	REKOMBINATIONSEXPERIMENTE.....	76
4.5.1	MODIFIKATION DES DNA-SHUFFLING-PROTOKOLLS ZUR SENKUNG DER INAKTIVIERUNGSRATE	76
4.5.2	ERSTELLUNG EINER DNA-SHUFFLING-BIBLIOTHEK.....	78
4.5.3	SCREENING DER SHUFFLING-BIBLIOTHEK	78
4.5.4	RESCREENING.....	79
4.5.5	RETRANSFORMATION.....	80
4.6	ERROR-PRONE PCR, 2. RUNDE	81
4.6.1	SCREENING	81
4.7	CHARAKTERISIERUNG DER MUTANTEN	82
4.7.1	DNA-SEQUENZEN	82
4.7.2	STRUKTUR-ANALYSE.....	84
4.7.2.1	MUTANTE 42.....	85
4.7.2.2	MUTANTE 29.....	88

4.7.2.3	MUTANTE B1	90
4.7.3	AKTIVITÄT DER PERIPLASMAFRAKTIONEN.....	92
4.7.4	REINIGUNG DER PERIPLASMAFRAKTIONEN.....	93
4.7.5	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT	93
4.7.6	PH-PROFILE	94
5	DISKUSSION.....	96
5.1	BAA-EXPRESSION	96
5.2	ASSAY	99
5.3	IDENTIFIKATION INTERESSANTER STELLEN	100
5.4	ERROR-PRONE PCR	101
5.5	REKOMBINATIONSEXPERIMENTE.....	105
5.6	ERROR-PRONE PCR, 2TE GENERATION.....	107
5.7	CHARAKTERISIERUNG DER MUTANTEN	107
5.7.1	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG.....	107
5.7.2	SEQUENZ UND STAMMBAUM DER MUTANTEN: PHYLOGENETISCHE INTERPRETATION	108
5.7.3	SEQUENZ- UND STRUKTURANALYSE: FUNKTIONELLE INTERPRETATION	110
5.7.4	SCHLUSSFOLGERUNG	114
5.7.5	AUSBlick.....	115
6	ANHANG	117
6.1	HERLEITUNG DER WAHRSCHEINLICHKEITSVERTEILUNG VON MUTANTEN BEI DER ERROR-PRONE PCR	117
6.2	PLASMIDE	118
6.2.1	pCYTBAA-WT	118
6.2.2	pGASTON	118
6.2.3	pGBAA-WT	118
6.3	DNA-SEQUENZ VON pGBAA-WT.....	119
6.4	AMINOSÄURESEQUENZ VON BAA.....	120
6.5	AMINOSÄURE-ALIGNMENT DER BAA MIT WEITEREN α -AMYLASEN AUS BACILLUS.....	121
6.6	VERWENDETE PRIMER.....	123
6.7	MUTANTEN AUS DER ERSTEN ERROR-PRONE PCR-RUNDE	124
6.8	MUTANTEN AUS DER DNA-SHUFFLING-RUNDE	126
6.9	MUTATIONEN DER MUTANTEN 29, 42 UND B1	127
7	LITERATUR.....	129
8	LEBENS LAUF	136
	ANGABEN ZUR PERSON	136
	AUSBILDUNG.....	136
	WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG	136

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A	Adenin
$A(\lambda)$	Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ
Amp	Ampicillin
Amy	Amylase
Ap ^R	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
b	Aktivitätskonzentration in U/l
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BAA	α -Amylase aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BAN	<i>Bacillus</i> Amylase Novo BAN 240L
BCA	Reagens zum Nachweis von Proteinen
BLA	α -Amylase aus <i>Bacillus licheniformis</i>
BMA	<i>Bacillus megaterium</i> α -Amylase
bp	Basenpaare
BRP	Bacteriocin release protein
BStA	<i>Bacillus stearothermophilus</i> α -Amylase
c	stöchiometrische Konzentration in mol/l
C	Cytosin
cIts857	Repressorgen für λ -Promotor
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
Da	Dalton
dATP	3'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	3'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddATP	2', 3'-Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	2', 3'-Didesoxycytosin-5'-triphosphat
ddGTP	2', 3'-Didesoxyguanosin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	2', 3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphat
ddTTP	2', 3'-Didesoxythmidin-5'-triphosphat
dE	Extinktionsänderung

dGTP	3'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
DNS	Dinitrosalicylsäure
dNTP	3'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	3'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>F.</i>	Fusarium
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HPA	humane Pankreas α -Amylase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl- β -thio-galactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
<i>L</i>	Genlänge
LAMY	α -Amylase aus <i>Bacillus</i> sp. KSM 1378
LB	Luria Bertani-Medium
LB ₀	Luria Bertani-Medium ohne Selektionsantibiotikum
LB-Amp	Luria Bertani-Medium mit Ampicillin
LB-Cm	Luria Bertani-Medium mit Chloramphenicol
LMW	„Low molecular weight“, (Niedermolekulargewicht)
m	Meter
M	Molar [mol/l]
<i>m</i>	Mutationsrate
m/v	Masse pro Volumen
mA	Milliampère
min	Minute

n	Anzahl der Mutationen
N297D	Mutante der BAA, in der das Asparagin 297 durch Asparaginsäure ersetzt wurde
Na-Acetat	Natriumacetat
NaI ^R	Nalidixinsäureresistenz
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
P450 _{BM-3}	Cytochrom P450 aus <i>Bacillus megaterium</i> BM-3
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pGBAA-WT	Plasmid auf Basis von pGASTON mit dem Wildtypgen der BAA
pGBAA- Δ	pGBAA-WT, bei dem die Aminosäuren G402-S404 aus dem BAA-Gen deletiert wurden
pGBAA- Δ KPPX	pGBAA- Δ bei dem die Aminosäuren K401 durch P und P405 durch jede beliebige Aminosäure ersetzt wurde
pH	potentia hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen (H_3O^+)
pH _{opt.}	pH-Optimum
pI	isoelektrischer Punkt
$P_{L,m}(n)$	Wahrscheinlichkeit P , in Abhängigkeit von der Genlänge L und der Mutationsrate m , als Funktion der Anzahl der Mutationen n
P _{lac}	Lactose-Promotor
P _{Rh}	Rhamnose-Promotor
P _R P _L	Hitzeinduzierbare λ -Promotor
Rh	Rhamnose
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S201N	Mutante der BAA, in der das Serin 201 durch Asparagin ersetzt wurde
S707	α -Amylase aus <i>Bacillus</i> sp. #707
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)

SI	Système international d'unités
sp.	Species-Angabe bei Organismen
StEP	Staggered extension process
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet ^R	Tetracyclinresistenz
TIM-Barrel	Bezeichnung für eine (α/β) ₈ -Proteinstruktur
T _{max.}	Temperaturmaximum
T _{opt.}	Temperaturoptimum
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS-23	α -Amylase aus <i>Bacillus</i> sp. TS-23
U	Unit [μ mol/min], Enzymaktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Strahlung im ultravioletten Bereich
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
<i>z</i>	Enzymaktivität in U
λ	Wellenlänge in nm

ABKÜRZUNG DER PROTEINOGENEN AMINOSÄUREN NACH IUPAC

Aminosäure	3-Buchstaben Code	1-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Struktur der α -Amylase aus <i>Bacillus licheniformis</i>	3
Abbildung 2: Struktur der humanen Pankreasamylase.....	3
Abbildung 3: Katalytischer Mechanismus von α -Amylasen.....	4
Abbildung 4: Phylogenetischer Baum der α -Amylasen aus verschiedenen <i>Bacillus</i> -Stämmen.....	6
Abbildung 5: Wahrscheinlichkeitsverteilung der Mutationszahl n für ein Gen der Länge $L=1545$ bei verschiedenen Mutationsraten m	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung des DNA-Shufflings.....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Staggered Extension Process (StEP).....	13
Abbildung 8: Schematischer Vergleich der Methoden zur Mutagenese von Proteinen.....	14
Abbildung 9: Schematischer Ablauf der gerichteten Evolution.....	16
Abbildung 10: Klonierungsstrategie zur Erzeugung des Vektors pGBAA-WT.....	58
Abbildung 11: Vergleich der Expressionssysteme.....	59
Abbildung 12: DNS-Assay bei 37 °C. Dargestellt ist der lineare Bereich; 0-520 U/l bzw. 0-0,36 Absorptionseinheiten.....	61
Abbildung 13: Der Phadebas®-Assay bei 37 °C. Dargestellt ist der lineare Bereich; 0-780 U/l bzw. 0-1,1 Absorptionseinheiten.....	62
Abbildung 14: Kalibrierkurve des Phadebas®-Assays in Mikrotiterplatten.....	64
Abbildung 15: Linearer Bereich des Phadebas®-Assays in Mikrotiterplatten.....	65
Abbildung 16: Schaubild zur Bestimmung des Hintergrundrauschens des Phadebas®-Assays in Mikrotiterplatten unter Verwendung von α -Amylase-negativen pGASTON-Transformanden.	66
Abbildung 17: Bestimmung der α -Amylaseaktivität von pGBAA-WT-Transformanden mit dem Phadebas®-Assay bei pH 7 und pH 10.....	67
Abbildung 18: Aminosäuresequenz-Vergleich verschiedener α -Amylasen (Ausschnitt).....	70

Abbildung 19: Strukturvergleich von BAA und LAMY.....	71
Abbildung 20: Screening auf verbesserte α -Amylaseaktivität bei pH 7 und pH 10 mit dem Phadebas®- Assay.....	74
Abbildung 21: Messpunkte der besten Klone aus der Shufflingbibliothek im Vergleich mit allen Messpunkten der Shuffling-Bibliothek und den besten Klonen aus der Error-prone Bibliothek.	79
Abbildung 22: Rescreening der besten Treffer aus dem DNA-Shuffling	80
Abbildung 23: Error-prone PCR, 2. Generation.....	82
Abbildung 24: Umgebung der Aminosäure W194 bzw. R194 in der theoretischen Struktur der BAA (links) bzw. der Mutante 42 (rechts).....	85
Abbildung 25: Die Aminosäure W194 bzw. R194 in der BAA (links) bzw. der Mutante 42 (rechts). Die Umgebung ist als Conolly-Oberfläche dargestellt.....	86
Abbildung 26: Die Aminosäure S197 bzw. P197 und ihre Umgebung in der theoretischen Struktur der BAA (links) bzw. der Mutante 42 (rechts).....	86
Abbildung 27: Veränderung in der Conolly-Oberfläche der Struktur der BAA (links) und der Mutante 42 (rechts) durch die Mutation S197P	87
Abbildung 28: Darstellung der Umgebung der Aminosäure 356 in der Struktur der BAA (links) und der Mutante 42 (rechts)	87
Abbildung 29: Die Umgebung der Aminosäure N414 in der theoretischen Struktur des BAA-Wildtyps (links) und der Aminosäure S414 in der Mutante 42 (rechts).....	88
Abbildung 30: Darstellung der Umgebung der Aminosäure A230 in der Struktur des BAA-Wildtyps (links) und der Aminosäure V230 in der Struktur der Mutante 29 (rechts)	89
Abbildung 31: Umgebung der Aminosäure 406 in der Struktur der BAA (links) und der Mutante 29 (rechts).....	90
Abbildung 32: Conolly-Oberfläche der Umgebung der Aminosäure 406 in der Struktur der BAA (links) und der Mutante 29 (rechts).....	90
Abbildung 33: Die Aminosäure I203 in der Mutante 29 (links) und L203 in der Mutante B1 (rechts) und die umliegenden Aminosäuren.	91
Abbildung 34: Conolly-Oberfläche der Umgebung der Aminosäure K474 in der Struktur der Mutante 29 (links) und der Aminosäure N475 in der Struktur der Mutante B1 (rechts).....	92

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 35: Gesamtaktivitätskonzentrationen der Periplasmafraktionen des BAA-Wildtyps und der Mutanten 29, 42 und B1.....	92
Abbildung 36: Aufreinigung der Periplasmafraktion der Mutante 42: Silbergefärbtes SDS-Gel.....	93
Abbildung 37: Spezifische Aktivitäten $\bar{\nu}/m_E$ des BAA-Wildtyps und der Mutanten 29, 42 und B1.....	94
Abbildung 38: pH-Profile der Mutanten 29, 42 und B1 sowie des BAA WT und der kommerziellen BAN. Zudem wurde das pH-Profil von gereinigter Mutante 42 aufgenommen.....	95
Abbildung 39: Umwandlung von Amylose zu dTDP/dUDP-L-Rhamnose; nach Michal (Michal 1993)...	97
Abbildung 40: Aminosäuresequenzvergleich der BAA mit der BStA.....	101
Abbildung 41: Stammbaum der Mutanten 29 und 42, die durch DNA-Shuffling erzeugt wurden sowie der Mutante B1, die durch Error-prone PCR mit der Mutante 29 als Template erhalten wurde.	109

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Identitäten und Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen des α -Amylasen BAA, BLA, LAMY, S707, BMA, TS-23 und BStA.....	7
Tabelle 2: Temperaturoptima (T_{Opt}), Thermostabilität (T_{max}) und pH-Optima (pH_{Opt}) verschiedener α -Amylasen aus <i>Bacillus</i>	7
Tabelle 3: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme mit Genotyp und Resistenzen	23
Tabelle 4: Verwendete Plasmide mit Genotypen und Resistenzen.	24
Tabelle 5: Zusammensetzung des Proteinstandards, Low molecular weight Standard (LMW)	31
Tabelle 6: Silberfärbung von PAGE-Gelen.....	34
Tabelle 7: Konzentrationen der Maltosestammlösungen zur Kalibrierung des DNS-Assays.....	37
Tabelle 8: Temperaturprogramm für die zyklische Sequenzierreaktion	47
Tabelle 9: Temperaturprogramm für das QuikChange-Protokoll.....	49
Tabelle 10: Temperaturprogramm der Error-prone PCR.....	50
Tabelle 11: Temperaturprogramm der ersten PCR im DNA-Shuffling	52
Tabelle 12: Temperaturprogramm der Reassembly-PCR.....	53
Tabelle 13: Temperaturprogramm der Reassembly-PCR nach neuem Protokoll.....	54
Tabelle 14: Temperaturprogramm der abschließenden Amplifikations-PCR.....	54
Tabelle 15: Vergleich des DNS-Assays mit dem Phadebas [®] -Assay	62
Tabelle 16: Verdünnungsreihe zur Validierung des Phadebas [®] -Assays in der Mikrotiterplatte und Bestimmung des linearen Bereichs.	63
Tabelle 17: Vergleich von pH-Optimum und pI-Werten der BAA und anderen α -Amylasen aus <i>Bacillus</i> . 68	
Tabelle 18: Aminosäurezusammensetzung der α -Amylasen BAA, BLA, TS-23, LAMY und S707 im Vergleich	69
Tabelle 19: Einstellung der Mutationsrate.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 20: Mutationen, die nach der Error-prone PCR des BAA-Gens erhalten wurden.....	75
Tabelle 21: Senkung der Inaktivierungsrate durch additive Modifikation des Shuffling-Protokolls.....	78
Tabelle 22: Mutante 42 und ihre proteinogenen Mutationen.....	83
Tabelle 23: Mutationen der Mutante 29.....	83
Tabelle 24: Proteinogene Mutationen der Mutante B1 im Vergleich zum Wildtyp.....	84

ABSTRACT

α -Amylases (EC 3.2.1.1, 1,4- α -D-glucan glucohydrolases) are used in many industrial processes, such as starch liquefaction and detergency as well as in paper industry. Some of these processes are performed at reaction conditions that differ strongly from the optimal reaction conditions of natural α -amylases. For example detergency requires α -amylases with a high thermoactivity and high thermostability as well as activity and stability at high pH. In addition, a high specific activity is desired reducing enzyme amount and therefore costs. Consequently, interest arose on α -amylases, that are adapted to the process condition needed.

α -Amylases are enzymes that catalyse the reversible hydrolysis of 1,4 α -glucosidic bonds. As their major natural substrate is starch (amylum), they belong to the family of starch degrading (amylolytic) enzymes. In principle, α -amylases are discriminated by the degree of conversion of starch. Saccharifying α -amylases convert 50-60% of the starch, liquefying convert 30-40%.

The α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA) belongs to the class of liquefying α -amylases and it consists like all known α -amylases of one polypeptide chain. Its molecular mass is 59 kDa, the optimal temperature is in the range of 50-70 °C, and its pI at 5,2. Although the crystal structure of the BAA is not known, comparison to the homologous α -amylase from *Bacillus licheniformis* (BLA) implicates, that the BAA shares the same overall conformation as all α -amylases comprising the three domains A, B and C. The domain A, an $(\alpha/\beta)_8$ -structure, the so called $(\alpha/\beta)_8$ -barrel or TIM-barrel contains the N-terminus and the catalytic centre. Domain B which is located above the catalytic centre is formed by eight β -pleated sheets. The C-terminal domain C lies on the opposite side of domain A with respect to domain B and is formed by β -pleated sheets, too.

Directed evolution is a versatile method for improving the properties of proteins. Beginning with one gene or a group of template genes, mutant libraries are constructed. The expression products of these mutants are screened for improved properties. A method to produce mutant libraries starting from one template is the error-prone polymerase chain reaction. The template gene is amplified by polymerase chain reaction (PCR) under conditions that are suboptimal for the polymerase leading to the introduction of point mutations. If several homologous genes with point mutations are available, mutant libraries can be constructed by recombination via DNA-shuffling. Here, the template genes are

digested by DNaseI and subsequently assembled by recombination PCR resulting in the exchange of information between different templates.

The aim of this work was to establish and successfully use methods of directed evolution for the α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA) in order to improve the specific activity and the activity at alkaline pH as an example for altering two relevant parameters for an α -amylase with industrial application.

A prerequisite to successfully improve protein properties by directed evolution is its functional expression. In this work several expression vectors in *Escherichia coli* were compared towards the amount of expression by measuring the α -amylase activity in the periplasmic fractions. Coexpression of the bacteriocin release protein (BRP), coded on the plasmid pJL3 allowed secretion of the α -amylase into the culture medium.

When the BAA gene was expressed under the control of the rhamnose inducible promoter of the plasmid pGBAA-WT in *E. coli* DH5 α cells, a much higher α -amylase activity was detected in the periplasm than upon expression under the control of the temperature inducible λ -promoter in the plasmid pCYTBAA-WT in the same cell type (Figure 1). The expression of BAA in *E. coli* XL1-Blue with the pGBAA-WT construct resulted in comparable α -amylase activities.

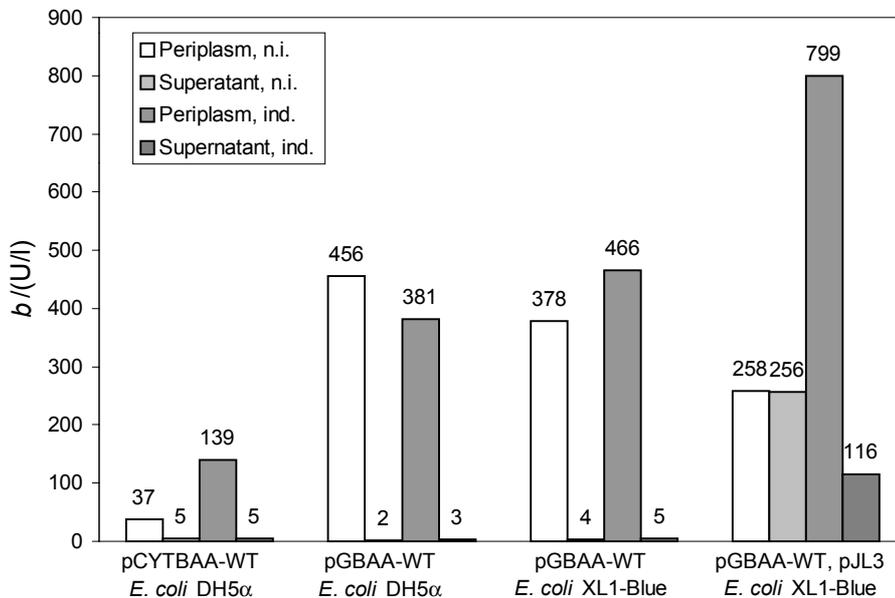


Figure 1: Comparison of the expression systems for BAA in *E. coli*. The activity in the culture medium and in the periplasm from induced (ind.) cultures and uninduced (n. i.) cultures was measured.

Screening of mutant libraries can be performed by the reaction of the enzyme with a substrate under defined conditions (assay). In addition, assay systems for a high throughput screening of enzyme libraries in microtiter scale should also possess a high accuracy combined with a high sensitivity. Two assay systems for the detection of α -amylase activity were compared. The Phadebas[®] assay, is based on the action of the α -amylase on an insoluble blue starch polymer producing shorter, soluble fragments that lead to a coloured supernatant. The second assay system was the dinitrosalicylic acid assay (DNS assay). Here, the α -amylase cleaves soluble starch generating reducing sugar ends which are detected spectrometrically after the reaction with dinitrosalicylic acid. In cuvette scale, the Phadebas[®] assay showed a lower standard deviation and a higher sensitivity than the DNS assay. By modification of the protocol supplied by the manufacturer, it was possible to transfer the Phadebas[®] assay onto microtiter plate scale. A linear correlation between activity concentration and absorption was found in the range between activity concentrations of 0 U/L and 1000 U/L (Figure 2) with a resolution of 1 U/L. In combination with the low standard deviation of <7% the assay allowed the reproducible measurement of small changes in activities/activity concentrations.

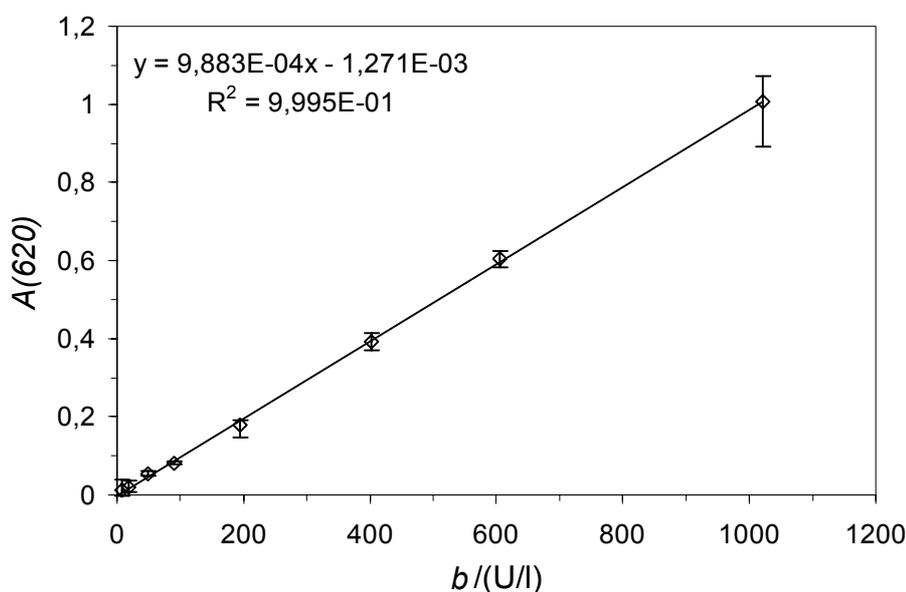


Figure 2: Linear region of the Phadebas[®]-Assays in microtiter scale

Preceding experiments showed significant variations in the expression level of the pG-BAA system. For screening, this would lead to a broad range of values making it impossible to identify clones with improved activity. Thus it was necessary to screen not only for one parameter (pH 10), but also to screen for a known parameter, which in this case was the activity at pH 7. In addition, the background noise of the assay system caused by well to well variation of the culture broth was determined by screening a library of 96 α -amylase negative clones to be 0,1 absorption units.

In order to discriminate improved clones from wild type like clones it was necessary to define the so called wild type window, which represents the region of activity which most wild type clones show. This was achieved by screening a library of 96 clones expressing the wild type gene of the BAA. The wild type window was found to be the region between two parallel straight lines with a slope of eight (Figure 3). Mutants with improved activity at alkaline pH were expected to be located in the area rightwards of the wild type window corresponding to a lower pH 7/pH 10 ratio. Mutants with improved activity should be found in the area above the wild type window but still between the two straight lines. Mutants with both, improved activity at alkaline pH and improved overall activity should be found at a lower pH 7/pH10 ratio and further away from the origin.

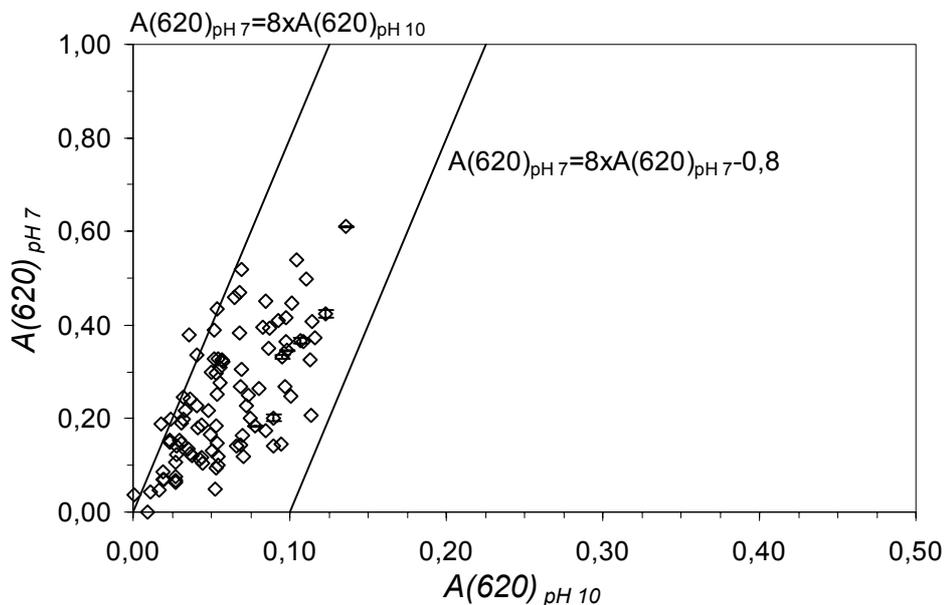


Figure 3: Determination of the wild type window for pGBAA-WT transformants with the Phadebas[®] assay at pH 7 and pH 10. The data points are framed by two parallel straight lines with a slope of eight. Absorption was routinely measured at a wavelength of $\lambda=620$ nm.

The BAA gene was subjected to both rational enzyme engineering and random mutagenesis. For rational protein engineering, a theoretical structure of the BAA was generated by homology modelling with the crystal structure of the BLA (PDB-entry 1bli) as template. In addition, the theoretical structures of the α -amylases from the alkaliphilic organisms *Bacillus* sp. KSM1378 (LAMY), *Bacillus* sp. strain #707 (S707) and *Bacillus* sp. TS-23 (TS-23), that share an amino acid sequence similarity of 79%, 77% and 76% respectively, were generated. By superimposition of the theoretical structures, two regions were identified to substantially differ between the BAA and the α -amylases from alkaliphilic *Bacilli* (LAMY, S707 and TS-23). The first region which comprises the amino acid region I200-A212 had been investigated in previous studies. The second region, M397-P409 is equivalent to a deletion of the three amino acids G402, T403 and S404 in the amino acid sequences of LAMY, S707 and TS-23 (Figure 4).

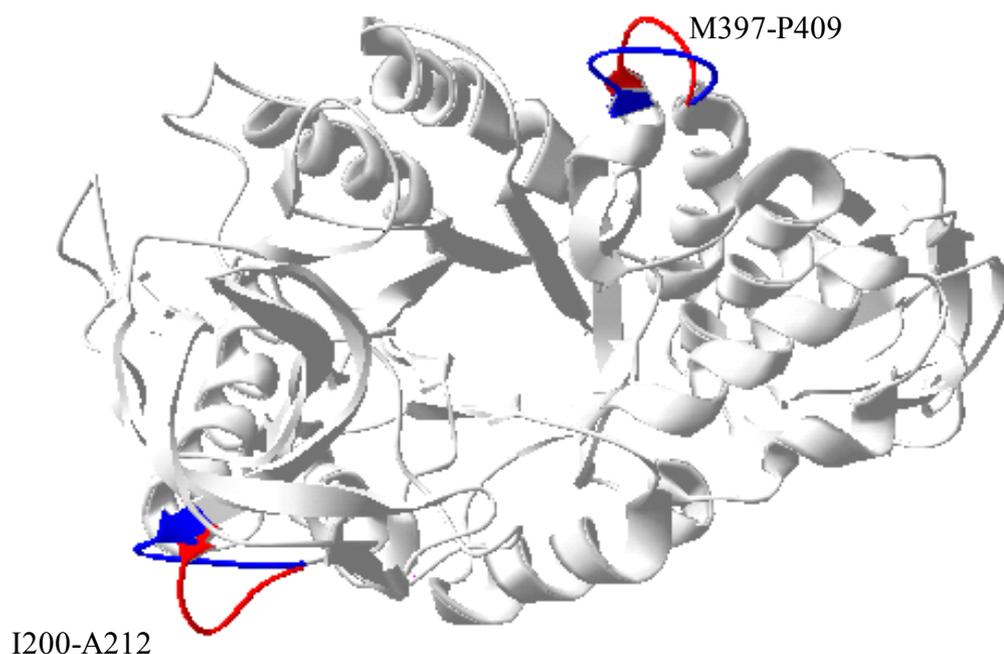


Figure 4: Comparison of the theoretical structures of BAA (blue) and LAMY (red). The superimposition reveals two regions that substantially differ in the tertiary structure: I200-A212 and M397-P409.

Although the deletion of G402, T403 and S404 is present in the homologous alkaliphilic α -amylases, the deletion of these three amino acids in BAA led to the loss of α -amylase activity. In a second round, the amino acid K401 was replaced by P401 and the amino acid P405 was mutated to any proteinogenic amino acid. However, no clone showed α -amylase activity. Finally, the introduction of every possible codon in the BAA gene at the positions coding for the amino acids T400, K406 and E407 by site directed mutagenesis with degenerated primers resulted only in α -amylase inactive clones.

The application of the error-prone PCR on the BAA gene and to the genes of two mutants S201N and N297D generated in earlier experiments allowed the construction of a library of 7200 clones. The average mutation rate was one per gene leading to an inactivation rate of 30%. Screening of the library with the modified Phadebas[®] assay identified 16 mutants with improved properties which subsequently were subjected to recombination by DNA shuffling.

Since DNA shuffling protocols described in literature were associated with a high rate (95%) of incomplete and erroneous reassembled genes leading to inactive products, the protocols were modified as follows. The fraction of inactive clones was lowered by the substitution of the *Taq* polymerase by a proof-reading polymerase (*Pfu* polymerase) in the reassembly step. Together with an improved temperature protocol the inactivation rate was decreased under 80%.

The recombination of the 16 improved clones from the error-prone library resulted in 10000 clones in total and 960 α -amylase active clones. Screening showed that 34 of these possess an improved specific activity and/or activity at alkaline pH. After rescreening and retransformation the mutants 29 and 42 were obtained, with properties differing strongly from those of the wild type. Mutant 29 showed improved overall activity and mutant 42 had improved activity at alkaline pH. Using these two mutants as templates for the generation of a second round error-prone PCR library of 192 clones resulted in mutant B1.

Mutant 42 showed a 4.5 times higher activity concentration of 5023 U/L in the periplasmic fractions in comparison to the wild type (1420 U/L). In addition, the specific activity of mutant 42 (22.0 U/mg) was 1.5 times higher than that of the wild type (15 U/mg) and therefore the processing was calculated to be improved by the factor of 2.3. Furthermore, the pH optimum of mutant 42 was shifted one pH unit to alkaline pH (from pH 6 to pH 7) compared to the wild type. Together with an improved activity at alkaline pH this results in a broader pH activity profile.

The pH activity profile of mutant 29 and the wild type were very similar whereas fractions of mutant 29 showed an activity concentration of 59484 U/L which is increased by the factor 42 compared to the wild type (1420 U/L). The specific activity of mutant 29 (140.9 U/mg) is 9 times higher than the specific activity of the wild type (15 U/mg). Thus the processing is four times better for mutant 29 than for the wild type.

Mutant B1 which was yielded from the second round of error-prone PCR with mutant 29 as template shows the same pH activity profile as mutant 29 and the wild type. However, the specific activity of mutant B1 (63.3 U/mg) is lower than that of mutant 29, but still 4.2 times higher than that of the wild type. Nevertheless the processing of mutant B1 is comparable to mutant 29, which leads to an overall activity concentration in the periplasmic fractions of 24659 U/L.

Table 1: Activity and specific activity of BAA, BAA 42, and BAA 29. The values in brackets give the relative activities and concentrations in comparison to the wild type.

	b (periplasm) [U/L]	Specific activity z/m [U/mg]	Protein concentration (periplasm) [mg/L]
BAA wild type	1420±38 (1.00±0.03)	15.1±1.1 (1.00±0.07)	93.8 (1.0)
Mutant 29	59484±1602 (41.89±1.13)	140.9±9.5 (9,27±0.63)	422.2 (4.5)
Mutant 42	5035±95 (3.55±0.06)	22.0±1.2 (1.46±0.08)	229.0 (2.4)
Mutant B1	24659±574 (17.36±0.4)	63.3±3.1 (4,18±0,05)	389.6 (4.2)

The positions of the mutations of mutant 42, 29 and B1 were determined by DNA-sequencing. The corresponding amino acids changes were introduced to the theoretical BAA structure and the orientation of neighbouring amino acid side chains was corrected. The structure was analysed in order to determine the influence of each single mutation on the structure and the properties, which showed itself to be difficult, since not a single amino acid substitution would lead to the change of a property, but rather the combination of all mutations found in a mutant. This problem was overcome by the comparison of the BAA with the amino acid sequences of BLA, LAMY, S707 and TS-23.

Mutant 42 carries five mutations, that lead to a change in amino acid sequence and therefore are responsible for the changes in the biochemical properties. One mutation (L13P) is found in the signal peptide and four further mutation are found in the mature protein. The mutation E356D is situated on a β -strand in the inner core of the TIM-barrel. Geometrical analysis considers a change in the hydrogen bond network in this region and amino acid sequence comparison shows, that the homologous α -amylases BLA, LAMY, S707 and TS-23, which have a higher optimal pH than the BAA carry the same mutation. This makes E356D a likely candidate to raise the pH optimum of mutant 42.

The mutations W194R and S197P are located on a loop region on domain B. Comparison with the homologous α -amylases reveals that both amino acid positions are highly conserved within these α -amylases. Astonishingly, these mutations did not lead to a loss of activity. In addition, the amino acid sequence of mutant 42 carries the mutation N414S which lays in the domain A on a loop and might be responsible for the improvement of specific activity (see below).

Six mutations were found in the amino acid sequence of mutant 29. The mutation N297D has been inherited from the rational mutant N297D. The signal peptide of mutant 29 carries the mutation L13P which was also present in mutant 42. Since both mutants show improved processing, it is obvious to attribute a positive effect of this mutation on the processing. The mutation V32A is situated on the N-terminus of the mature protein and generates a preferred recognition site for prokaryotic signal peptidases, like those present in *E. coli*, which probably leads to the improved translocation of the mutant 29 to the periplasm. The improved specific activity can be accounted to the mutation A230V, which is located on a β -strand in domain B above the catalytic site. Interestingly this amino acid is highly conserved in the α -amylases BLA, LAMY, S707 and TS-23. The function of the mutation K406R can not be easily clarified, whereas the mutation N414S probably contributes to the improved specific activity, since it is found in the mutant 42 and 29 that both show improved specific activity.

The amino acid sequence of mutant B1 includes the six mutations from mutant 29 as well as two additional mutations I203L and K474Q. The processing of mutant B1 which is nearly the same as for mutant 29 confirms the assumption of the positive influence of the mutations L13P and V32A on processing. The loss of specific activity is probably due to the two newly introduced mutations, I203L which is situated in domain B and K474Q (domain C) whereas mutation K474Q is also present in the amino acid sequence of BLA.

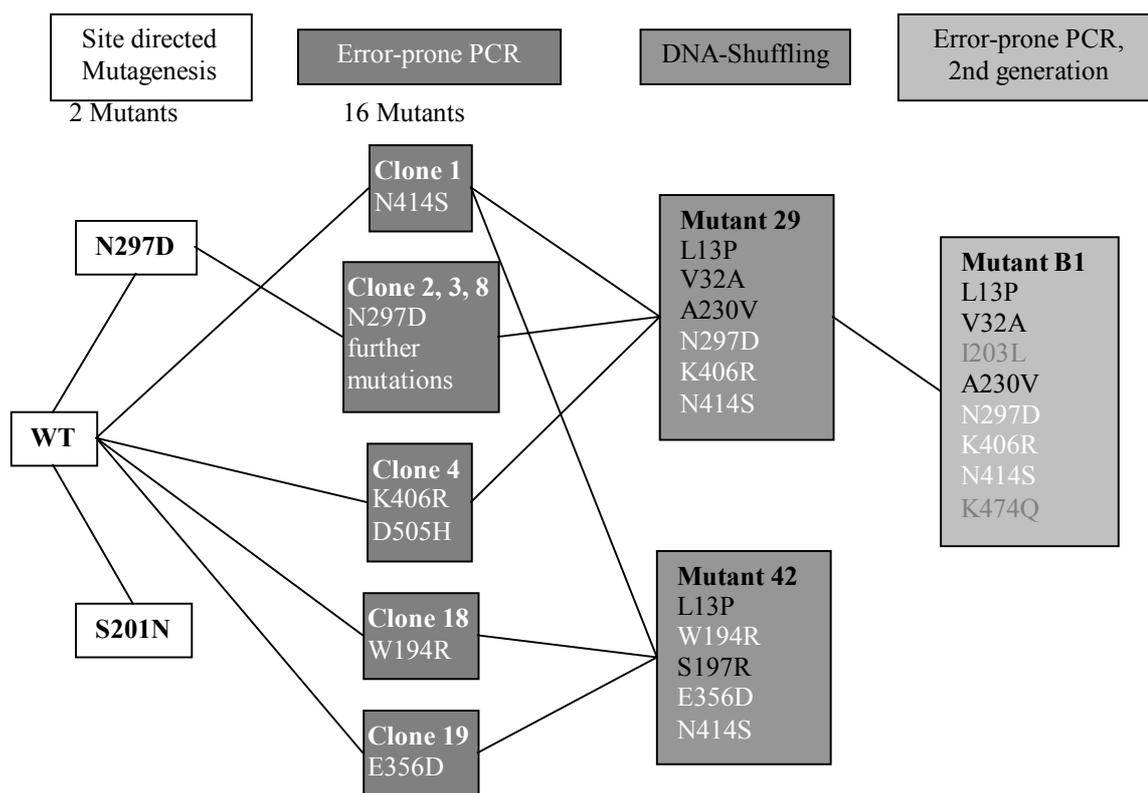


Figure 5: Phylogenetic tree of the mutants 29, 42 and B1.

Figure 5 shows the phylogenetic tree of the mutants 29, 42 and B1. As it can be seen, some mutations are preferably inherited than others. For example, the mutation S201N is not found in any of the mutants from the error prone PCR or the gene shuffling. On the other hand the mutation N414S is present in mutant 42 and mutant 29 which means, that it is compatible with other mutations and leads to improvements in the biochemical properties of the enzymes. Nevertheless, mutations that did not appear in mutants from error prone PCR and DNA shuffling, such as the mutation S201N, could contribute to improvements in later experiments.

This work presents the first successful improvement of the alkaline activity and the specific activity of a microbial α -amylase by directed evolution. In addition, the processing was increased. With the methods discussed in this work it should be possible to improve α -amylases towards a multitude of parameters such as thermostability, solvent stability and detergent stability. In addition, it is possible to combine methods of directed evolution with bioinformatics in order to deduce structure-function relationships. Thus, these methods allow the fast and cost efficient improvement of industrially interesting enzymes towards the adaptation to the required process conditions.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte das Gen der BAA in *E. coli* funktionell unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors exprimiert werden. Hierbei wurden höhere Aktivitäten im Periplasma erreicht, als durch die Expression unter der Kontrolle des λ -Promotors. Zudem wurde durch die Koexpression des BRP die Sekretion der BAA ins Medium und gleichzeitig eine Aktivitätssteigerung im Periplasma erreicht.

Der Phadebas[®]-Assay zeigte im Küvettenmaßstab bei vergleichbarer Standardabweichung eine höhere Sensitivität als der DNS-Assay. Durch Modifikation des von Hersteller vorgeschlagenen Protokolls konnte der Phadebas[®]-Assay in den Mikrotiterplattenmaßstab überführt werden, wobei der lineare Bereich zwischen 0-1000 U/l und die Auflösung bei 1 U/l liegt. Zusammen mit der niedrigen Standardabweichung von maximal 7% ist dadurch die Messung niedriger Aktivitäten/ Aktivitätskonzentrationen bzw. kleiner Veränderungen derselben möglich.

Durch Mutagenese wurde die BAA verändert. Der rationale Ansatz führte nicht zum Erfolg, da die Einführung einer Deletion von drei Aminosäuren, wie sie bei homologen alkaliphilen α -Amylasen vorhanden ist, zu einem Verlust der α -Amylaseaktivität führte. Auch die anschließende Mutation benachbarter Aminosäuren erbrachte keinen Rückgewinn an Aktivität.

Durch die Anwendung der Error-prone PCR auf das BAA-Gen sowie die Gene der in einer vorangegangenen Arbeit hergestellten rationalen Mutanten S201N und N297D wurde eine Bibliothek von 7200 Klonen aufgebaut. Die durchschnittliche Mutationsrate lag bei einer Mutation pro Gen. Durch Screening mit den Phadebas[®]-Assay wurden 16 verbesserte Mutanten erhalten, welche anschließend mittels DNA-Shuffling kombiniert wurden.

Durch die Rekombination der 16 verbesserten Klone aus der Error-prone Bibliothek mittels einem modifizierten DNA-Shuffling-Protokolls wurden 10000 Klone erzeugt, von denen 960 α -Amylase-aktiv waren. Davon zeigten 34 Klone eine verbesserte Alkaliaktivität bzw. erhöhte Aktivität. Nach Rescreening und Retransformation wurden die Mutanten 29 und 42 erhalten, deren Eigenschaften sich stark vom Wildtyp unterschieden. Auf deren Basis wurde eine Error-prone PCR-Bibliothek mit 194 Klonen aufgebaut und gescreent. Die Mutante B1 zeigte verbesserte Eigenschaften gegenüber der Mutante 29.

Die biochemische Analyse der Mutante 42 ergab eine um den Faktor 1,5 verbesserte spezifische Aktivität und eine um den Faktor 2,3 bessere Prozessierung. Zudem besitzt die

Mutante 42 ein pH-Optimum von 7,0 im Gegensatz zum Wildtyp mit 6,0. Zusammen mit einer verbesserten Aktivität im Alkalischen führt dies zu einem stark verbreiterten pH-Profil.

Die Mutante 42 trägt 5 proteinogene Mutationen, wovon eine im Signalpeptid enthalten ist, die vermutlich zu einer verbesserten Translokation führt. Bioinformatische Untersuchungen ergaben, dass von den vier Mutationen im reifen Protein vermutlich die Mutation E356D am meisten zur verbesserten Alkaliaktivität beiträgt. Zudem sind die Mutationen W194R und S197P, die in hochkonservierten Bereichen der Aminosäuresequenz liegen vorhanden. Durch Vergleich mit der Aminosäuresequenz der Mutante 29 und deren Eigenschaften lässt sich folgern, dass die Mutation N414S zu der verbesserten spezifischen Aktivität beiträgt.

Die Biochemische Analyse ergab für die Mutante 29 zwar kein verändertes pH-Profil, aber eine um den Faktor 9 verbesserte spezifische Aktivität. Zudem wird sie viermal besser als der Wildtyp prozessiert, was sehr wahrscheinlich auf die Mutation L13P im Signalpeptid und die Mutation V32A am N-Terminus des reifen Enzyms zurückzuführen ist. Die erhöhte spezifische Aktivität wird vermutlich durch die Mutation A230V bewirkt, die in der Nähe des aktiven Zentrums liegt. Die Funktion der Mutation K406R ist nicht eindeutig zu erfassen, wohingegen die Mutation N414S die spezifische Aktivität verbessert.

Die Mutante B1, die von der Mutante 29 abstammt, zeigt ein identisches pH-Profil, aber eine geringere spezifische Aktivität als die Mutante 29. Trotzdem wird sie, ähnlich wie die Mutante 29 viermal besser als der Wildtyp prozessiert. Die Aminosäuresequenz zeigt zu den Mutationen der Mutante 29 zusätzlich die Mutation I203L und K474Q.

Der Rückgang der spezifischen Aktivität ist vermutlich vor allem der Mutation I203L zuzuschreiben, da die Mutation K474Q auch in der BLA vorkommt, diese α -Amylase aber eine der BAA vergleichbare spezifische Aktivität besitzt.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Alkaliaktivität einer mikrobiellen α -Amylase verbessert. Zudem gelang die Verbesserung der spezifischen Aktivität und der Prozessierung der BAA. Es dürfte ein Leichtes sein, weitere Parameter, wie die Thermostabilität, Lösungsmittelstabilität und die Stabilität gegenüber Oxidationsmitteln, um nur einige industriell interessante Parameter zu nennen, zu verbessern. Zudem ist es möglich durch Kombination dieser Methoden mit Methoden der Bioinformatik Struktur-Funktionsbeziehungen herzuleiten.

Somit können mit diesen Methoden industriell interessante Enzyme kostengünstig den geforderten Prozessbedingungen angepasst und verbessert werden.

1 EINLEITUNG

1.1 α -AMYLASEN

α -Amylasen (EC 3.2.1.1, 1,4- α -D-Glucan Glucanohydrolasen) werden in vielen industriellen Prozessen, wie der Stärkeverflüssigung und dem Waschprozess sowie in der Papier- und der Backindustrie eingesetzt. Einige dieser Prozesse werden bei Bedingungen durchgeführt, die sich stark von den optimalen Reaktionsbedingungen natürlicher α -Amylasen unterscheiden. Für den Waschprozess zum Beispiel werden α -Amylasen benötigt, die sowohl eine hohe Temperaturstabilität und -aktivität besitzen als auch bei hohen pH-Werten aktiv sind. Zudem ist aus Kostengründen eine möglichst hohe spezifische Aktivität wünschenswert. Daraus erwächst ein Interesse an α -Amylasen, die an die jeweiligen Prozessbedingungen angepasst sind.

In dieser Arbeit soll ein Verfahren am Beispiel der α -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA) diskutiert werden, das es mittels gerichteter Evolution ermöglicht, die Alkaliaktivität und die spezifische Aktivität von industriell eingesetzten (nicht-alkaliaktiven) α -Amylasen zu steigern.

1.1.1 FUNKTION UND EIGENSCHAFTEN VON α -AMYLASEN

α -Amylasen sind Enzyme, die die reversible Hydrolyse von 1,4 α -glucosidischen Bindungen hydrolysieren. Ihr wichtigstes in der Natur vorkommendes Substrat ist die Stärke (Amylum) und sie gehören somit zur Familie der stärkeabbauenden (amylolytischen) Enzyme.

Als Endoenzyme spalten α -Amylasen 1,4 α -glucosidische Bindungen innerhalb der Stärke, wodurch verzweigte und unverzweigte Maltoside unterschiedlicher Länge entstehen. Zudem sind α -Amylasen bekannt, die eine Nebenaktivität für 1,6 α -glucosidische Bindungen aufweisen (Sakano *et al.* 1985).

Abhängig vom Umsetzungsgrad der Stärke werden die α -Amylasen in verzuckernde α -Amylasen und verflüssigende α -Amylasen eingeteilt. Verzuckernde α -Amylasen setzen 50%-60% der Stärke um, verflüssigende α -Amylasen 30-40%. Diese beiden Amylasetypen können auch immunologisch nachgewiesen werden: Antikörper gegen verzuckernde α -Amylasen binden nicht an verflüssigende α -Amylasen und umgekehrt (Welker und Campbell 1967).

α -Amylasen dienen in der Natur zur schnellen Erschließung der Stärke als Kohlenstoffquelle und kommen sowohl in höheren Lebewesen als auch in Mikroorganismen vor. Ihre chemischen Eigenschaften unterscheiden sich abhängig von ihrer Herkunft beträchtlich.

Besonders mikrobielle α -Amylasen sind an die Wachstumsbedingungen ihrer Produzenten optimal angepasst. Dabei sind thermostabile α -Amylasen aus thermophilen Bakterien ebenso bekannt, wie α -Amylasen aus halophilen Mikroorganismen, die auch bei hohen Salzkonzentrationen aktiv und stabil sind. Darüber hinaus wurden auch alkaliaktive α -Amylasen gefunden, die von alkaliphilen Mikroorganismen produziert werden.

Je nach Herkunft besitzen die α -Amylasen ein breites Spektrum an Eigenschaften. Die α -Amylase mit dem niedrigsten Temperaturoptimum von 25-30 °C stammt aus *Fusarium oxysporum* (Chary und Reddy 1985). Die α -Amylase aus *Bacillus licheniformis* besitzt ein Temperaturoptimum bei 90 °C und ist auch noch bei einer Temperatur von 100 °C stabil (Madsen *et al.* 1973). Der optimale pH-Bereich erstreckt sich für mikrobielle α -Amylasen von pH 3 (*Lipomyces starkeyi* CBS 1809) bis zu pH 10,5 (*Bacillus* No. 27-1), der Stabilitätsbereich erstreckt sich von pH 2 bis pH 12 (Vihinen und Mantsala 1989).

Eine Eigenschaft, die allen bekannten α -Amylasen zu eigen ist, ist die Stabilisierung durch die Bindung von Calcium-Ionen (Ca^{2+}). Die Anzahl der gebundenen Ca^{2+} Ionen variiert von eins bis zehn (Vallee *et al.* 1959). Vermutlich ist Calcium an der Festigung der tertiären Struktur beteiligt. Bei mikrobiellen α -Amylasen scheinen bestimmte konservierte Regionen nahe des aktiven Zentrums als Calciumbindungsstelle zu fungieren (Hsiu *et al.* 1964; Vihinen *et al.* 1990). Seit kurzem ist auch eine α -Amylase bekannt, die keine Calciumbindungsstelle besitzt (Hagihara *et al.* 2001a). Diese α -Amylase zeichnet sich durch eine sehr hohe Stabilität gegenüber Komplexbildnern aus.

1.1.2 STRUKTUR UND AUFBAU

Alle bisher aufgeklärten Röntgenstrukturen von α -Amylasen zeigen den gleichen Aufbau aus den Domänen A, B und C. In Abbildung 1 und Abbildung 2 sind die Strukturen der α -Amylase aus *Bacillus licheniformis* (BLA) und der humanen Pankreasamylase (HPA) dargestellt.

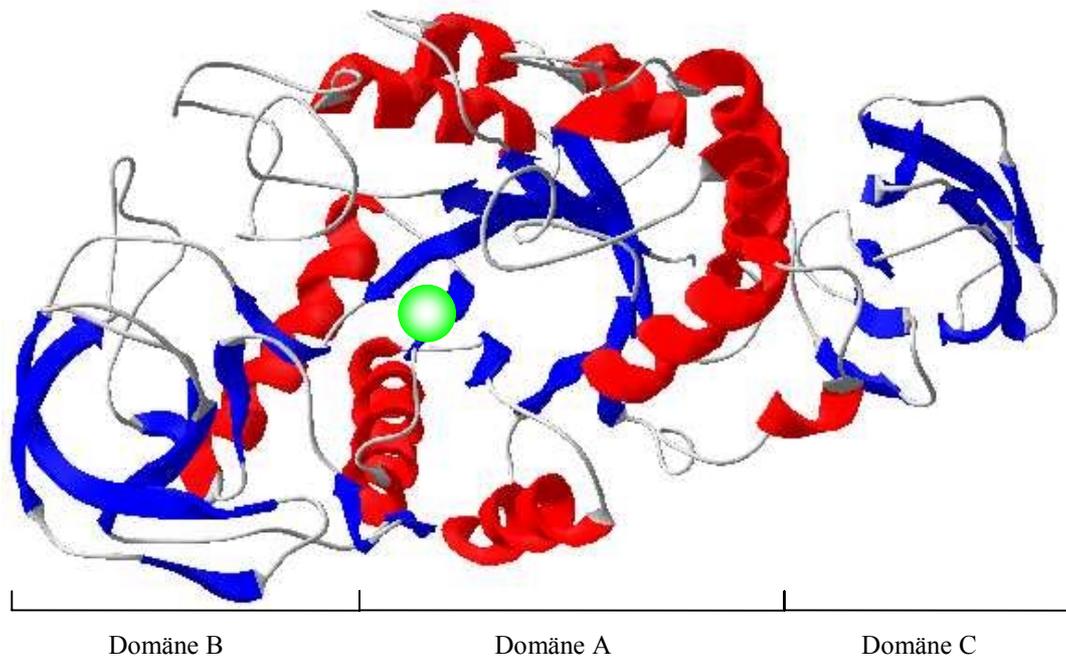


Abbildung 1: Struktur der α -Amylase aus *Bacillus licheniformis*. Das aktive Zentrum ist farbig markiert.

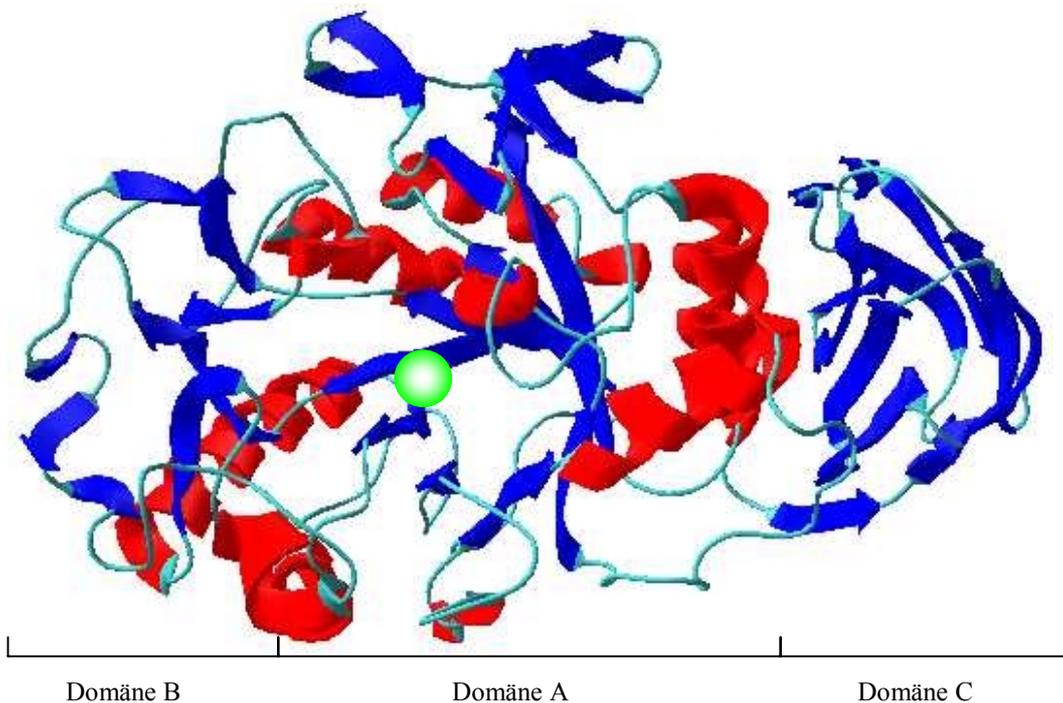


Abbildung 2: Struktur der humanen Pankreasamylase. Das aktive Zentrum ist farbig markiert.

Die N-terminale Domäne A, auch $(\alpha, \beta)_8$ -Barrel oder „TIM-Barrel“ genannt, wird aus 8 parallelen β -Faltblättern gebildet, die durch je eine α -Helix miteinander verbunden sind. Ihr Aufbau ist in allen α -Amylasen konserviert. Die Domäne B zeigt dagegen die größten Strukturvarianzen zwischen unterschiedlichen Organismen. Sie kann, wie im Fall der HPA

(Abbildung 2) aus einem β -Strang und einer α -Helix oder wie im Fall der BLA (Abbildung 1) aus einem durch 6 antiparallele β -Stränge gebildeten β -Faltblatt bestehen, das die Form eines Fasses hat und deshalb auch „ β -Barrel“ genannt wird.

Die Domäne C ist in ihrem groben Aufbau konserviert. Sie besteht aus mehreren β -Strängen, die je nach Organismus ein mehr oder weniger ausgeprägtes "β-Barrel" bilden.

Der Aufbau des aktiven Zentrums ist streng konserviert. Es besteht aus zwei Asp und einem Glu und liegt zwischen den Domänen A und B.

Die Calciumbindungsstellen sind innerhalb von Familien konserviert, können sich aber bei unterschiedlichen Organismen in ihrer Anzahl, in ihrer Position und in ihrem Aufbau unterscheiden.

1.1.3 DER KATALYTISCHE MECHANISMUS VON α -AMYLASEN

α -Amylasen hydrolysieren 1,4 α -glucosidische Bindungen unter Erhalt der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff, d. h. das gebildete Produkt besitzt α -Konformation (Nielsen und Borchert 2000). Diese Beobachtung wird auch bei anderen Glycosyl-Hydrolasen gemacht, für die der in Abbildung 3 abgebildete, diskutierte Mechanismus aus drei Schritten besteht.

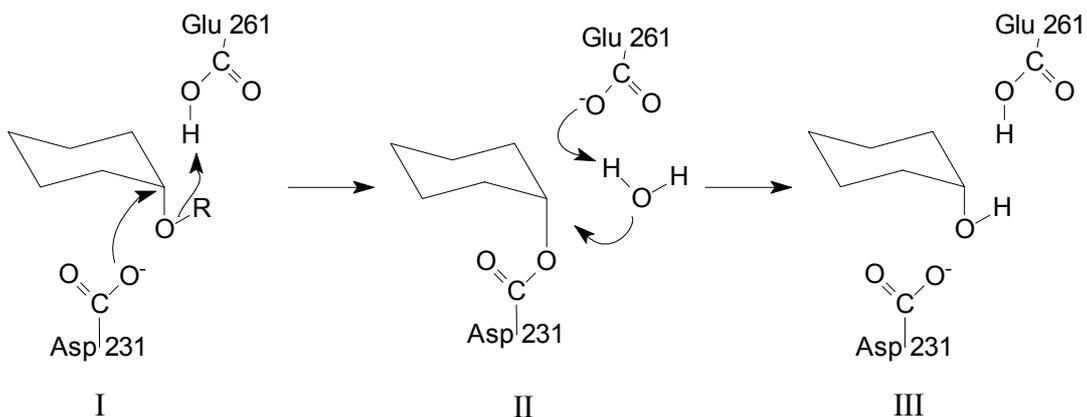


Abbildung 3: Katalytischer Mechanismus von α -Amylasen. Die Sequenznummerierung bezieht sich auf die Struktur der BLA (1bli.pdb). (I) Protonierung des glycosidischen Sauerstoffs und nukleophiler Angriff am C1 durch Asp231. Abgang des reduzierenden Endes des Substrats. (II) Aktivierung des Wassermoleküls, Spaltung von der C1-Asp231-Bindung. (III) Regenerierung der ursprünglichen Protonierungszustände.

Der erste Schritt ist die Protonierung des glycosidischen Sauerstoffs durch den Proton-Donor (Glu261). Diesem folgt ein nukleophiler Angriff des Asp231 am C1 des Zuckerrests

(Uitdehaag *et al.* 1999). Nachdem der 4-terminale Teil des Substrats die Bindungsstelle verlassen hat, wird ein Wassermolekül, vermutlich durch das deprotonierte Glu261, aktiviert. Dieses hydrolysiert die kovalente Bindung zwischen dem Sauerstoff des Nukleophils und dem C1-Atom des Zuckerrests, wodurch der katalytische Zyklus abgeschlossen wird. Die dritte konservierte Säure im katalytischen Zentrum, Asp328, spielt keine direkte Rolle in diesem katalytischen Mechanismus, sie ist aber dennoch für die Katalyse wichtig. Vermutlich erhöht sie den pKa-Wert von Glu261 durch elektrostatische Wechselwirkung. Zudem wurde gezeigt, dass Asp328 mit an der Substratbindung und –desorption beteiligt ist (Vihinen und Mantsala 1989; Fujimoto *et al.* 1998).

1.2 DIE α -AMYLASE AUS *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*

1.2.1 BIOCHEMISCHE UND GENETISCHE EIGENSCHAFTEN

Die α -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA) ist eine verflüssigende α -Amylase mit einer Molekularmasse von 59 kDa, die wie alle α -Amylasen aus einer Polypeptidkette besteht. Das pH-Optimum der BAA liegt bei 5,5-6,0, damit zählt sie zu den leicht acidophilen bzw. neutralen α -Amylasen. Das Temperaturoptimum liegt bei 50-70 °C und der pI-Wert beträgt 5,2 (Granum 1979).

Die Gensequenz und die Aminosäuresequenz der BAA sind bekannt (Chung und Friedberg 1980; Palva *et al.* 1981; Takkinen *et al.* 1983). Sie ist homolog zur α -Amylase aus *B. licheniformis* (BLA) mit einer Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit von 87 % und besitzt somit vermutlich einen der BLA ähnlichen Aufbau.

Nach Klonierung des BAA-Gens wurde dieses in pro- und eukaryontischen Organismen erfolgreich exprimiert. Als Expressionsorganismen wurden unter anderem *Bacillus subtilis* (Chung und Friedberg 1980; Palva *et al.* 1981; Takkinen *et al.* 1983), *Lactobacillus planarum* (Jones und Warner 1990), *Saccharomyces cerevisiae* (Ruohonen *et al.* 1987) und *Escherichia coli* verwendet, wobei die rekombinant exprimierte BAA in *B. subtilis* und *S. cerevisiae* sezerniert wurde, in *Lactobacillus planarum* jedoch nicht. In *E. coli* wird die BAA nicht in die Umgebung ausgeschleust, sondern im Periplasma angereichert. Bemerkenswert ist, dass die Expression in *E. coli* auch unter der Kontrolle des Promotors aus *B. amyloliquefaciens* erfolgreich war (Pretorius *et al.* 1988).

1.2.2 VERGLEICH DER BAA MIT VERWANDTEN α -AMYLASEN

In der Literatur wurden einige α -Amylasen beschrieben, die eine der BAA sehr ähnliche Aminosäuresequenz aufweisen. Abbildung 4 zeigt einen phylogenetischen Baum mit den der BAA am nächsten verwandten α -Amylasen aus verschiedenen *Bacillus*-Stämmen: *Bacillus megaterium* (BMA) (Metz *et al.* 1988), *Bacillus licheniformis* (BLA) (Yuuki *et al.* 1985), *Bacillus* sp. Stamm KSM-1378 (LAMY) (Igarashi *et al.* 1998a), *Bacillus* sp. Stamm #707 (S707) (Tsukamoto *et al.* 1988), *Bacillus stearothermophilus* (BStA) (Nakajima *et al.* 1985) und *Bacillus* sp. Stamm TS-23 (TS-23) (Lin *et al.* 1998).

Tabelle 1 zeigt die Aminosäuresequenz-Identitäten und –Ähnlichkeiten der BAA und der oben erwähnten, verwandten α -Amylasen, in Tabelle 2 sind die optimalen pH-Werte, Temperaturen und die Thermostabilität aufgeführt.

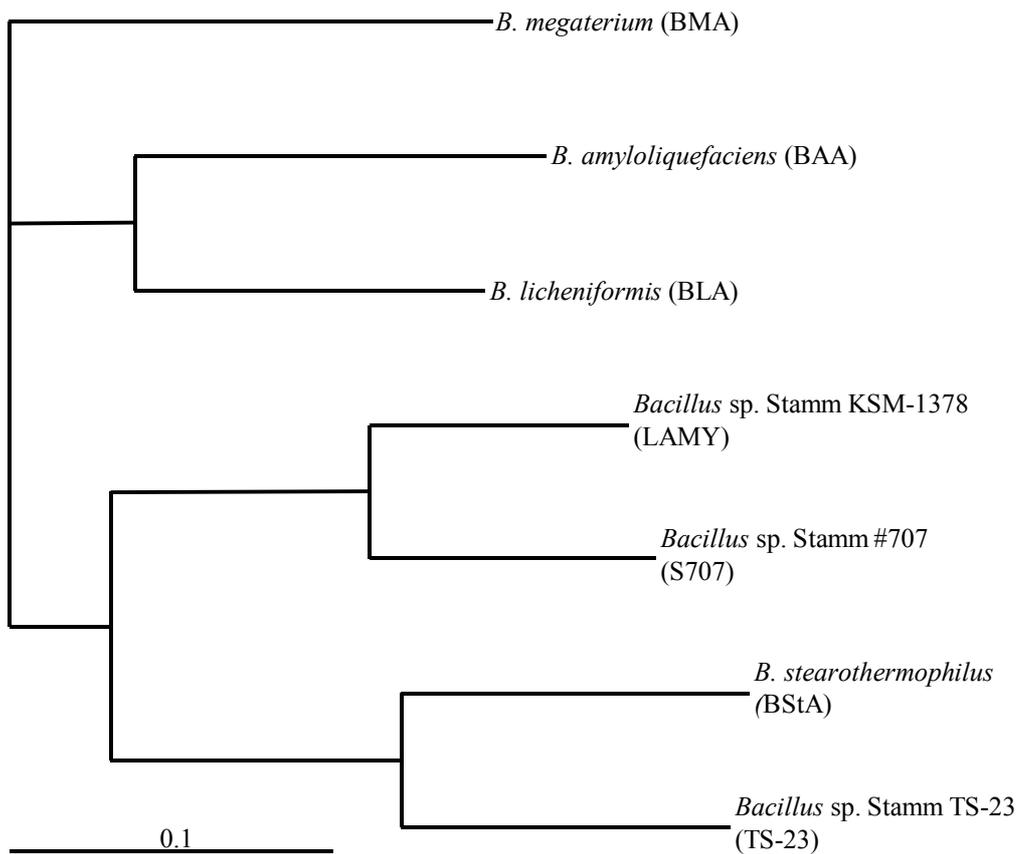


Abbildung 4: Phylogenetischer Baum der α -Amylasen aus verschiedenen *Bacillus*-Stämmen.

Tabelle 1: Identitäten und Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen des α -Amylasen BAA, BLA, LAMY, S707, BMA, TS-23 und BStA.

	Identität %							
	BAA	BLA	LAMY	S707	BMA	TS-23	BStA	
Ähnlichkeit %	BAA	100	77	66	64	68	64	62
	BLA	87	100	68	67	74	63	65
	LAMY	79	81	100	85	69	69	68
	S707	77	80	92	100	66	65	64
	BMA	77	83	81	79	100	63	62
	TS-23	76	76	82	79	76	100	77
	BStA	73	78	82	79	75	83	100

Tabelle 2: Temperaturoptima ($T_{Opt.}$), Thermostabilität (T_{max}) und pH-Optima ($pH_{Opt.}$) verschiedener α -Amylasen aus *Bacillus*.

α -Amylase	$T_{Opt.}(^{\circ}C)$	$T_{max}(^{\circ}C)$	$pH_{Opt.}$
BAA	50-70	70	6,0
BLA	90	100	7,0-7,5
LAMY	55	60	8,0-9,0
S707	-	-	8,5
BMA	-	-	-
TS-23	70	70	9,0
BStA	70	80	5,5-6,0

Die BLA besitzt mit 87% Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit die höchste Homologie zur BAA. Trotz dieser Verwandtschaft unterscheiden sich die Eigenschaften der beiden α -Amylasen beträchtlich. Die optimale Temperatur für die Aktivität der BLA beträgt 90 °C, das Temperaturoptimum der BAA hingegen liegt bei 50-70 °C. Zudem ist die BLA bis 100 °C stabil, die BAA dagegen nur bis 70 °C. Der optimale pH-Wert für die BLA bzw. die BAA wird mit 7,5 bzw. 6,0 angegeben (Vihinen und Mantsala 1989).

Die α -Amylasen S707, LAMY und TS-23 wurden aus den jeweiligen alkaliphilen *Bacillus*-Stämmen isoliert. Sie zeigen untereinander eine hohe Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit von 79-92%. Maximale Aktivität besitzen sie im Bereich von pH 8,0-9,0 bzw. bei Temperaturen von 55-70 °C. Zur BAA besitzen sie eine niedrigere Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit von 76-79%.

Obwohl die BStA eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit von 75-83% zu den alkaliaktiven α -Amylasen besitzt, liegt ihr optimaler von pH 5,5-6,0 im Bereich der BAA, zu der sie eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit von 73% besitzt.

Die BAA nimmt somit eine Mittelstellung in dieser Gruppe ein. Es sind sowohl acidere als auch alkalischere α -Amylasen bekannt.

1.3 VERWENDUNG VON α -AMYLASEN IN INDUSTRIELLEN PROZESSEN

α -Amylasen haben, wie auch andere amylolytische Enzyme, in den letzten Jahrzehnten eine breite Anwendung in vielen Zweigen der Industrie gefunden. Von der Vielzahl der α -Amylasen werden hauptsächlich die verflüssigenden α -Amylasen aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA), *Bacillus licheniformis* (BLA) und *Bacillus stearothermophilus* (BStA) sowie die verzuckernde α -Amylase aus *Bacillus subtilis* großtechnisch hergestellt und eingesetzt. Vor allem die Lebensmittelindustrie ist ein Hauptabnehmer für amylolytische Enzyme. Hier werden sie zur Stärkeverflüssigung und Stärkeverzuckerung eingesetzt. Weitere Anwendungen bestehen im Einsatz bei der Backwerkproduktion (Teiglockerung) und im Brauereiwesen (schnellere Gärung). Die Papierindustrie setzt Amylasen zur Herstellung von Stärkepaste bestimmter Viskosität ein, die zur Schlichtung und Beschichtung weiter verwendet wird. Bei diesen Anwendungen herrschen Bedingungen, die vom leicht sauren bis zum leicht alkalischen pH-Wert reichen.

Seit etwa 1970 werden α -Amylasen, besonders die BLA, in zunehmendem Maße in Waschmitteln eingesetzt (Upadek und Kottwitz 1997). Durch Spaltung von in Verschmutzungen enthaltener Stärke in kurze Maltosid-Ketten wird eine Lockerung des Schmutzes und somit eine erhöhte Waschleistung erzielt. Zudem vermindern α -Amylasen im Waschmittel den Redispositionseffekt (Kottwitz *et al.* 2001).

α -Amylasen, die in Waschmitteln eingesetzt werden, müssen neben der Thermostabilität auch im alkalischen Medium stabil und aktiv sind. Um α -Amylasen zu finden, die alle diese Kriterien optimal erfüllen, werden mit Hilfe gentechnischer Methoden große Anstrengungen zur Optimierung der α -Amylasen für den Einsatz in Waschmitteln unternommen (Aehle 1997). Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurde versucht, das Temperaturoptimum der BLA (Declerck *et al.* 1995) und die pH-Profile von BLA und Mutanten zu verändern (Nielsen *et al.* 1999; Nielsen *et al.* 2001).

Um die Optimierung zu umgehen, wurde in den letzten Jahren der Einsatz von alkaliaktiven α -Amylasen aus alkaliphilen *Bacilli* im Waschprozess diskutiert (Igarashi *et al.*

1998a; Igarashi *et al.* 1998b; Ito *et al.* 1998; Igarashi *et al.* 1999). Kürzlich wurde für eine α -Amylasemutante aus dem alkaliphilen Stamm *Bacillus* sp. KSM-K38 (Hagihara *et al.* 2001a; Hagihara *et al.* 2001b) ein Patent zur Verwendung in Waschmitteln erteilt (Endo *et al.* 2001).

Bislang werden jedoch hauptsächlich die Wildtypenzyme aus *B. amyloliquefaciens* und *B. licheniformis*, sowie thermostabile Mutanten der BLA eingesetzt, da diese, obwohl sie nicht alkaliaktiv sind, bei den vorherrschenden Bedingungen zur Verbesserung der Waschleistung beitragen (Rai *et al.* 1999; Kottwitz *et al.* 2001).

1.4 METHODEN ZUR MUTAGENESE VON PROTEINEN

Die Anwendung von Enzymen in technischen Prozessen ist weniger durch die Verfügbarkeit von Enzymen an sich, sondern vielmehr durch die Verfügbarkeit der an die jeweiligen Prozessbedingungen angepassten Enzyme limitiert. Um Enzyme hinsichtlich der für die jeweilige Anwendung relevanten Parameter zu verbessern, wurde eine große Anzahl an Methoden entwickelt. Hierbei lassen sich zwei Konzepte unterscheiden: das rationale Proteindesign und die gerichtete Evolution.

Beide Konzepte lassen sich nicht nur auf Enzyme sondern auf Proteine im allgemeinen anwenden. So können zum Beispiel auch die Bindungseigenschaften von Antikörpern an das jeweilige Antigen durch Mutagenese verbessert werden.

1.4.1 RATIONALES PROTEINDESIGN: ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE

Das rationale Proteindesign ist ein Konzept zur Modifikation eines Proteins, welches aufgrund der Struktur-, Funktions- und Sequenzkenntnis verändert werden kann. Hierzu werden durch ortsspezifische Mutagenese bestimmte Stellen im Gen verändert und die daraus resultierenden Veränderungen der Proteineigenschaften analysiert. Diese Methode erlaubt die Einführung von Mutationen, Insertionen und Deletionen. Voraussetzung sind eine bekannte Nukleotidsequenz sowie eine bekannte Struktur des Proteins im aktiven Zustand. Zudem ist die Kenntnis von Struktur-Funktionsbeziehungen des Proteins von Vorteil, da dadurch das Protein gezielter und mit höherer Erfolgswahrscheinlichkeit verändert werden kann.

Sind keine Struktur-Funktionsbeziehungen bekannt, können sie durch Vergleich mit homologen Proteinen mit bekannter Funktion oder durch Experimente mit Proteinmutanten ermittelt werden.

Das rationale Proteindesign wurde in einer Vielzahl von Fällen erfolgreich angewandt. So konnte zum Beispiel die Substratspezifität und Enantioselektivität von Lipasen verändert

werden (Scheib *et al.* 1998). Die Anwendung des rationalen Proteindesigns bei α -Amylasen war besonders bei der Steigerung der Thermostabilität der BLA erfolgreich (Declerck *et al.* 1995). Eine Zusammenfassung der in diesem Gebiet durchgeführten Experimente ist in Nielsen und Borchert (Nielsen und Borchert 2000) gegeben. Außerdem wurde die Aktivität der BLA bei niedrigen pH-Werten durch ortsspezifische Mutagenese verbessert (Shaw *et al.* 1999).

Einen Mittelweg zwischen rationalem Proteindesign und gerichteter Evolution stellt die Methode der rationalen Evolution dar. Durch die Verwendung degenerierter Primer wird das Codon einer Aminosäure durch jedes mögliche Codon ersetzt (Sättigungsmutagenese). Hierbei kann sowohl eine Aminosäure als auch eine Gruppe benachbarter Aminosäuren gezielt durch jede Aminosäurekombination ersetzt werden. In der daraus entstehenden Bibliothek werden verbesserte Mutanten mittels Screening oder Selektion gefunden. Mit Hilfe dieser Methode konnte z. B. das Substratspektrum von Cytochrom P450_{BM-3} verändert werden (Li *et al.* 2000).

1.4.2 GERICHTETE EVOLUTION

Einen anderen Ansatz verfolgt das Konzept der gerichteten Evolution. Ausgehend von einem Gen oder einem Pool von verwandten Genen wird mittels Zufallsmutagenese oder Methoden der Rekombination (sexuelle Mutagenese) eine Bibliothek an veränderten Genen erzeugt. Verbesserte Varianten werden nach Expression der Bibliothek mittels Screening oder Selektion identifiziert und können durch die wiederholte Anwendung dieser Methode weiter verbessert werden.

Zufallsmutagenese

Zufällige Punktmutationen können durch UV-Bestrahlung, chemische Mutagenese, den Einsatz von Mutator-Stämmen (Greener *et al.* 1996; Bornscheuer *et al.* 1998), die Verwendung falscher Nukleotide oder Error-prone PCR (Leung *et al.* 1989; Cadwell und Joyce 1994) eingeführt werden. Deletionen und Insertionen hingegen werden mit diesen Methoden nur sehr selten erzeugt.

Eine häufig angewandte Methode zur Zufallsmutagenese ist die Error-prone PCR, da sie eine der effektivsten Möglichkeiten ist, Mutationen statistisch verteilt in ein Gen einzuführen. Dabei wird das native Gen in einer PCR unter mutagenen Bedingungen amplifiziert und so eine gewisse Anzahl an Mutationen pro Gen eingeführt. Dies wird durch die Verwendung der Taq-Polymerase, die keine „proof-reading“ Aktivität besitzt, in Kombination mit einem

unausgewogenen Nukleotidverhältnis und der Zugabe von Manganchlorid (MnCl_2) erreicht. Durch die Wahl der PCR-Bedingungen kann hierbei die Mutationsrate eingestellt werden, was sich als wichtiger Schritt in diesem Verfahren erwiesen hat (Leung *et al.* 1989; Cadwell und Joyce 1994). Bei niedrigen Mutationsraten wird ein Großteil an unmutierten Genen erhalten, was zu einer geringen Diversität in der Mutantenbibliothek führt. Dagegen führen höhere Mutationsraten zu mehr Genen mit Mehrfachmutationen. Da jedoch ein großer Teil der Mutationen nicht zu einer Verbesserung der gewünschten Eigenschaft führt (negative Mutationen), sind höhere Anteile an Mehrfachmutationen nicht wünschenswert.

Die Abschätzung der Mutationsrate erfolgt in der Praxis anhand der Deaktivierungsrate, also dem Quotienten aus inaktiven Klonen und der Gesamtzahl der Klone. So liegt im Falle eines Gens mit einer Länge von 1000 bp bei einer Mutationsrate von 1/1000 eine Deaktivierungsrate von 30% vor (Zhao *et al.* 1999).

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung für Gene mit einer unterschiedlichen Anzahl an Mutationen kann theoretisch berechnet werden. Wird ein statisches Reaktionsmodell vorausgesetzt und werden die Mutationen nicht klassifiziert betrachtet, so gilt für die Wahrscheinlichkeit $P_{L,m}(n)$ für ein Gen der Länge L mit n Mutationen in Abhängigkeit von der Mutationsrate m (Herleitung s. 6.1):

$$P_{L,m}(n) = \binom{L}{n} m^n (1-m)^{(L-n)}$$

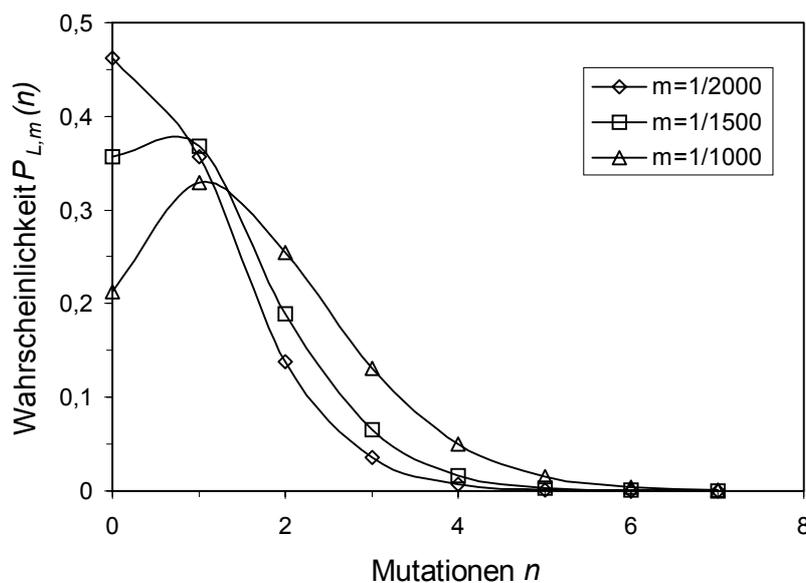


Abbildung 5: Wahrscheinlichkeitsverteilung der Mutationszahl n für ein Gen der Länge $L=1545$ bei verschiedenen Mutationsraten m .

In Abbildung 5 ist der Verlauf von $P_{L,m}(n)$ für ein Gen der Länge L bei verschiedenen Mutationsraten m dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit für unmutierte Gene ist $P_{L,m}(0) \geq 0$, wobei sie mit zunehmendem m abnimmt. Ebenso verschiebt sich das Maximum der Wahrscheinlichkeitsverteilung mit zunehmendem m hin zu größeren n , wobei das Maximum für die Anzahl der Mutationen, n_{max} durch $n_{max} = m * L$ abgeschätzt werden kann. Die Wahrscheinlichkeit für mehrfach mutierte Gene nimmt für $n > n_{max}$ mit steigendem n ab.

Es sei angemerkt, dass bei der Error-prone PCR nicht alle Mutationen gleich häufig sind. Tatsächlich sind Transitionen häufiger als Transversionen (Rellos und Scopes 1994).

Methoden zur Rekombination

Die Methoden der Rekombination gehen von einem Gen oder einem Pool ähnlicher Gene aus. Diese werden im Fall des DNA-Shufflings (Stemmer 1994b; Stemmer 1994a) durch DNaseI fragmentiert und durch eine PCR ohne Primer rekombiniert. Hierzu kommt es zu der Vermischung der Informationen der verschiedenen Ausgangsgene. Zudem werden aufgrund der methodisch bedingten Mutationsrate von etwa 0,7/1000 zusätzlich Mutationen eingeführt (Stemmer 1994a). Das DNA-Shuffling wurde u. a. erfolgreich zur Mutagenese des lacZ-Gens (Stemmer 1994a), zur Erzeugung thermostabiler und alkaliaktiver Subtilisin-Chimären (Ness *et al.* 1999) und zur Erzeugung von Cytochrom C-Rekombinanten (Abécassis *et al.* 2000) verwendet. Die Kombination ganzer Pathways durch DNA-Shuffling gelang am Beispiel von Genen des Carotinoid-Biosynthesewegs (Schmidt-Dannert *et al.* 2000). Zur Rekombination von Genen mit einer geringeren methodischen Mutationsrate existiert ebenso ein Protokoll (Zhao und Arnold 1997b), das erforderlich ist, wenn Gene ohne die Einführung neuer Mutationen rekombiniert werden sollen. So können funktionelle von nicht-funktionellen Mutationen unterschieden werden und Gene mit mehreren positiven, funktionellen Mutationen erzeugt werden (vgl. Abbildung 6) (Kuchner und Arnold 1997; Zhao und Arnold 1997a).

Eine andere Rekombinationsmethode ist der Staggered Extension Process (StEP) (Zhao *et al.* 1998). Hierbei wird mit einem Pool an Genen eine PCR mit sehr kurzen Anlagerungs- und Extensionszeiten durchgeführt, welche zur Synthese kurzer DNA-Stücke führen. Beim nächsten Denaturierungsschritt werden diese von ihren Vorlagen abgelöst und können beim darauf folgenden Anlagerungsschritt wieder an eine Vorlage hybridisieren, wobei es zu einem Vorlagenwechsel kommen kann. Durch wiederholten Zyklendurchlauf entstehen Gene, die Information verschiedener Eltern-Genen tragen (Abbildung 7).

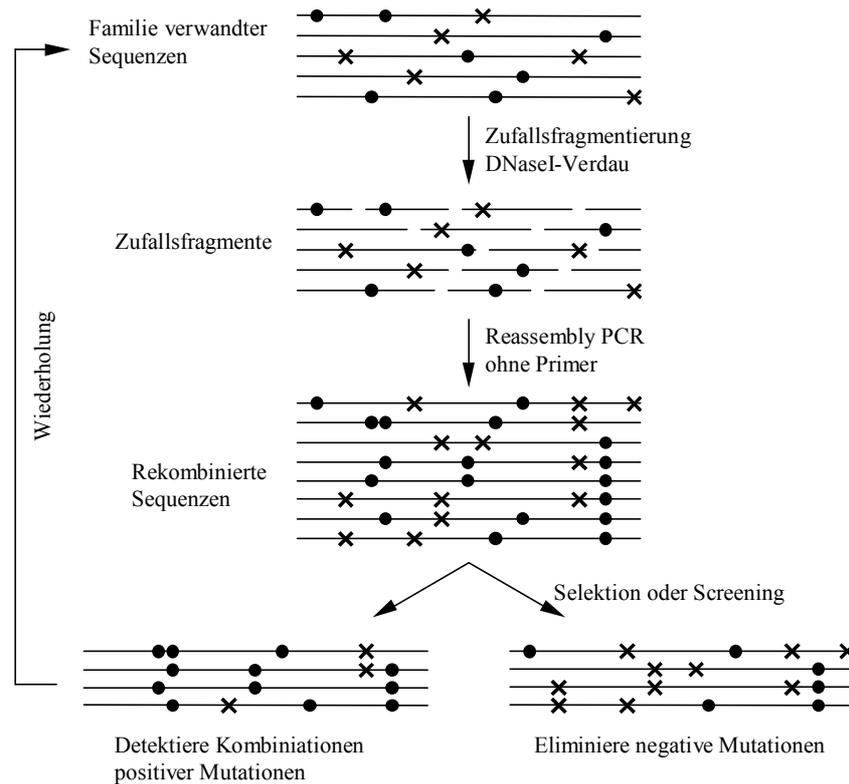


Abbildung 6: Schematische Darstellung des DNA-Shufflings. Nach Zufallsfragmentierung der Parental-Gene werden diese in einer PCR ohne Primer rekombiniert. Die vollständigen Gene mit positiven Mutationen werden mittels Selektion oder Screening identifiziert. Abbildung nach Kuchner und Arnold (Kuchner und Arnold 1997).

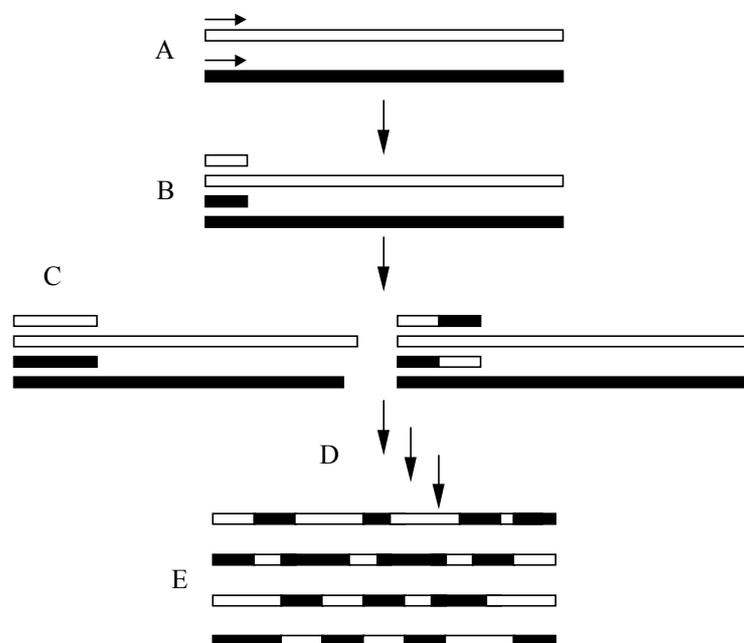


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Staggered Extension Process (StEP). (A) Anlagerung der Primer an die Templates. (B) Synthese kurzer Teilstücke durch kurze Anlagerungs- und Extensionszeiten. (C) Denaturierung und Anlagerung, dadurch Vorlagenwechsel. (D) durch zyklische Prozessführung wird (E) eine Bibliothek von rekombinierten Genen erhalten. Abbildung nach Zhao und Mitarbeitern (Zhao *et al.* 1998).

1.4.3 METHODISCHER VERGLEICH VON RATIONALER MUTAGENESE UND ZUFALLSMUTAGENESE

Die Methoden der ortsspezifischen Mutagenese und der Zufallsmutagenese unterscheiden sich neben ihrer Durchführung durch den von ihnen abgedeckten Sequenzraum, wobei der Sequenzraum als der Raum aller möglichen Aminosäurekombinationen definiert ist.

Die ortsspezifische Mutagenese ermöglicht die genaue Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung von Aminosäuren an bestimmten Positionen. Durch die Sättigungsmutagenese kann eine Aminosäure durch jede andere Aminosäure ausgetauscht und der gesamte Sequenzraum für die gewählte Position abgedeckt werden (Abbildung 8).

Die Zufallsmutagenese durch Error-prone PCR erzeugt statistisch auf einem Gen verteilte Mutationen. Dadurch kann die Aminosäure jeder Position in der Sequenz mutiert werden. Da aber der genetische Code degeneriert und nicht jede Mutation gleich häufig ist, sind mit dieser Methode von einer Aminosäure ausgehend nur 5,7 aller Aminosäuren zugänglich (Miyazaki und Arnold 1999). Das bedeutet, dass durch die Error-prone PCR der Sequenzraum für jede Position im Protein auf der gesamten Länge partiell abgedeckt wird.

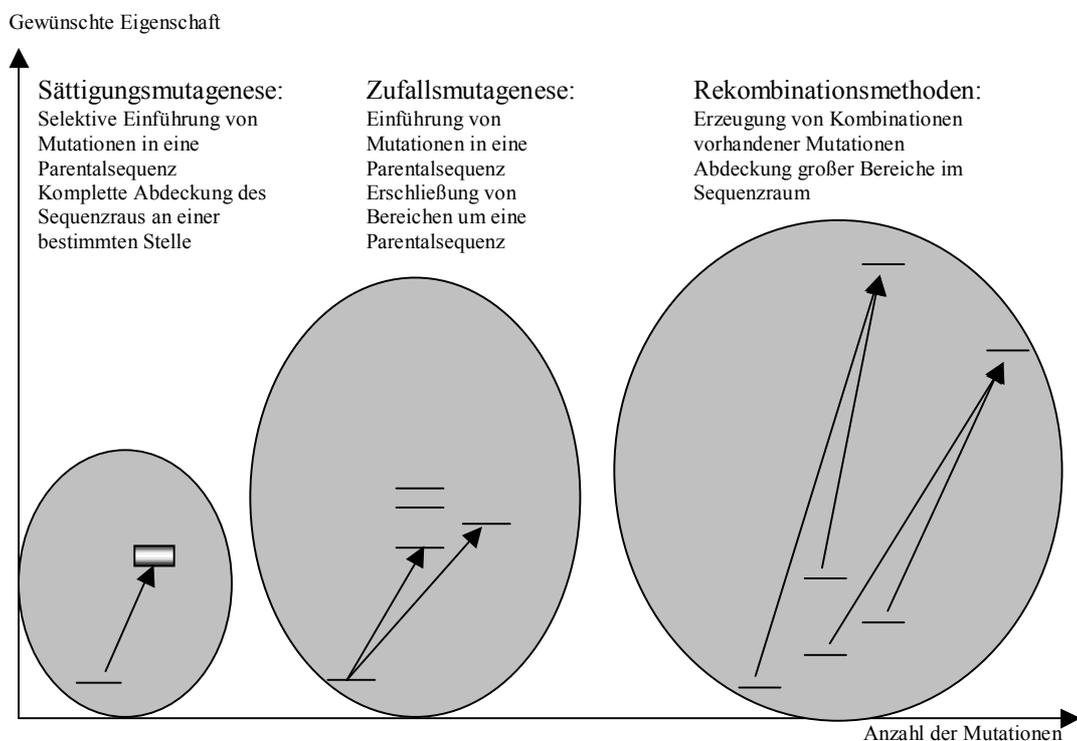


Abbildung 8: Schematischer Vergleich der Methoden zur Mutagenese von Proteinen

Werden mehrere Gene mittels DNA-Shuffling oder StEP kombiniert, so tragen die Produkte Informationen von mehreren Parentalgenen. Rekombinationsmethoden decken somit nicht nur den Raum von Einfachmutanten, sondern auch den aller möglichen Kombinationen derselben ab, was bedeutet, dass im Vergleich mit der Zufallsmutagenese ein größerer Sequenzraum mit geringer Dichte abgedeckt wird. Durch die methodische Mutationsrate werden zudem Mutationen erzeugt, die die Abdeckung des Sequenzraums verdichten, was aber nicht immer erwünscht ist.

1.4.4 IDENTIFIZIERUNG VERBESSERTER KLONE

Zur erfolgreichen Veränderung von Proteinen, egal ob es sich um rationales Design oder gerichtete Evolution handelt, müssen gewisse Voraussetzungen erfüllt sein. Neben etablierten Methoden zur Mutagenese und Rekombination ist eine Möglichkeit der Evaluierung der Mutageneseprodukte, ein Assay, erforderlich. Zwei Arten von Assays sind bekannt: Selektion und Screening.

Für die Selektion werden Organismen benötigt, bei denen ein essentieller Teil des Stoffwechsels fehlt oder ausgeschaltet wurde. Durch die Transformation mit funktionellen Varianten des Zielgens wird dieser Defekt komplementiert, so dass diese Transformanden wachsen können. In der Praxis wird die Komplementierung so ausgelegt, dass Klone mit verbesserten Varianten einen Wachstumsvorteil haben und aufgrund ihres Wachstumsverhaltens als positive Klone identifiziert werden können. Der Vorteil der Selektion liegt in dem hohen Durchsatz: innerhalb kurzer Zeit können wachsende Kolonien als positive Klone identifiziert werden. Allerdings liefert die Selektion keine quantitative Aussage über den Grad der Verbesserung. Zudem kann sie nur angewandt werden, wenn das Zielgen eine essentielle Rolle im Stoffwechsel spielt.

Beim Screening wird das Expressionsprodukt mittels spezifischer Umsetzung von Substraten analysiert, wobei der Grad der Umsetzung gemessen und so eine quantitative Aussage erhalten wird. Da die Reaktionsführung variabel ist, kann diese Methode auf die meisten der Problemstellungen angewandt werden. Der Nachteil liegt in dem geringeren Durchsatz, da alle erhaltenen Klone, egal ob verbessert oder nicht, gescreent werden müssen.

Um die benötigten Proteinmengen für einen Assay zu produzieren, ist ein zuverlässiges Expressionssystem nötig, welches die funktionelle Expression des Zielproteins in den erforderlichen Mengen erlaubt.

1.5 SCHEMATISCHER ABLAUF VON EXPERIMENTEN ZUR GERICHTETEN EVOLUTION

Experimente zur gerichteten Evolution folgen einem allgemeinen Ablauf, der in Abbildung 9 dargestellt ist. Ausgangspunkt ist immer das zu verbessernde Parental-Gen, oder eine gewisse Anzahl an homologen Parental-Genen, für die ein geeignetes Expressionssystem vorhanden sein muss. Zudem wird ein Assaysystem zur Identifikation verbesserter Varianten benötigt.

Ist ein Parental-Gen vorhanden, so wird mittels Zufallsmutagenese eine Bibliothek an Zufallsmutanten angelegt. Durch Durchmusterung dieser Bibliothek werden verbesserte Varianten gefunden, deren Eigenschaften genauer untersucht werden. Dazu wird die Basensequenz ermittelt und die eingeführten Mutationen bestimmt.

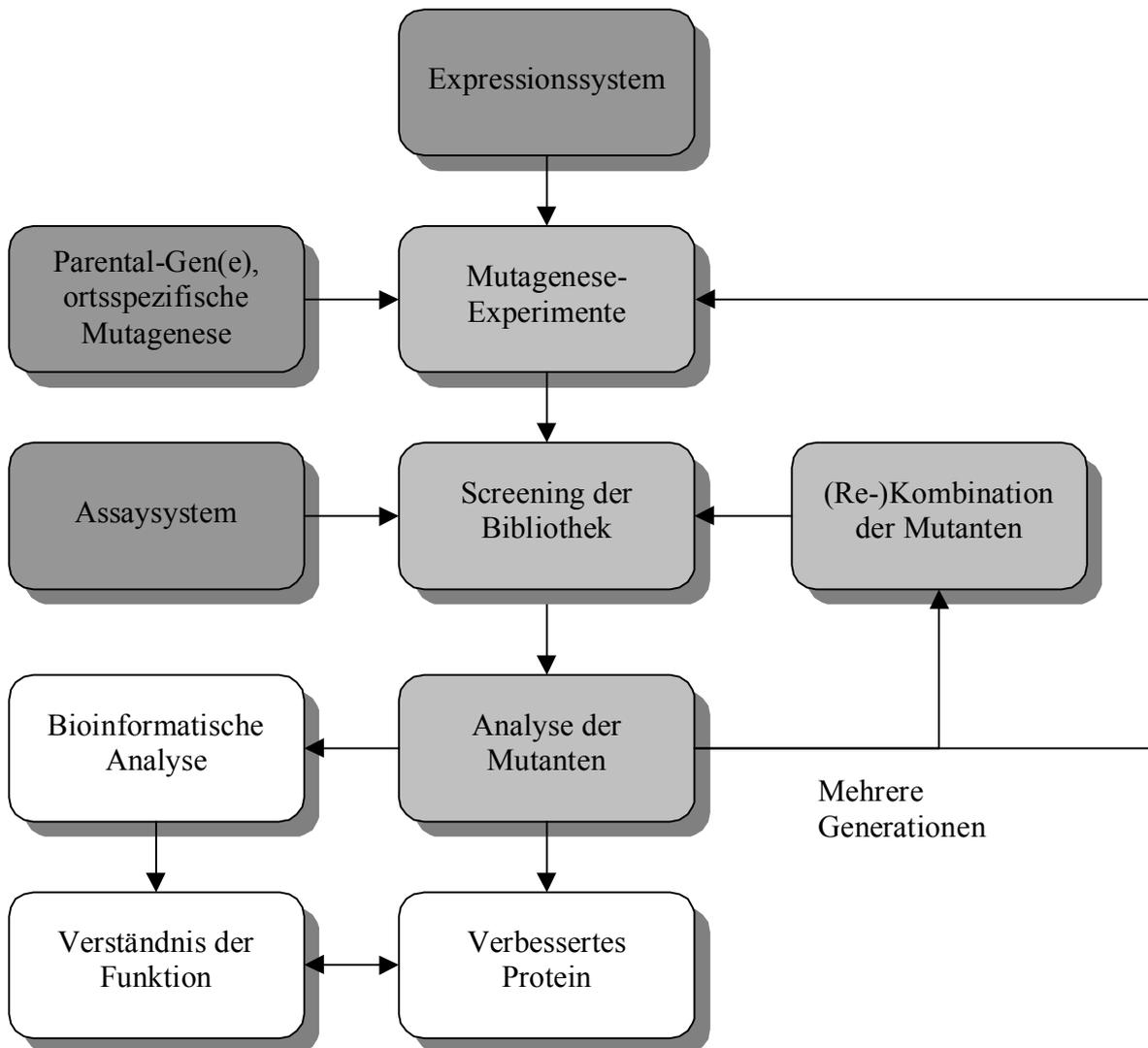


Abbildung 9: Schematischer Ablauf der gerichteten Evolution.

Durch anschließende Rekombination verbesserter Varianten können deren Eigenschaften kombiniert und eventuell vorhandene negative Mutationen eliminiert werden. Die daraus entstehende Rekombinationsbibliothek wird wiederum durchmustert und die besten Varianten isoliert. Diese können als Vorlagen für eine Zufallsmutagenese dienen oder erneut rekombiniert werden. Durch wiederholtes Durchlaufen dieser Mutagenese-/Rekombinationszyklen können schließlich Gene erhalten werden, deren Expressionsprodukte die gewünschten Eigenschaften besitzen.

Stehen mehrere Parental-Gene zur Verfügung, bietet sich als erster Schritt der Einsatz von Rekombinationsmethoden an. Die positiven Klone der Rekombinationsbibliothek können nach Screening und Analyse weiteren Rekombinationszyklen und/oder Mutagenese-Rekombinationszyklen unterworfen werden.

Abschließend werden die besten Varianten mit Hilfe bioinformatischer Methoden analysiert, woraus Rückschlüsse auf den Zusammenhang von Mutationen und verbesserter Eigenschaft gezogen werden können (Bioinformatische Analyse).

Sind im Vorfeld Beziehungen zwischen zu verbessernder Eigenschaft und Aminosäuresequenz aus vorhergegangenen Experimenten oder Vergleichen mit verwandten Proteinen bekannt, können mittels ortsspezifischer Mutagenese Mutanten erzeugt werden, die in die gerichtete Evolution miteinbezogen werden können.

2 ZIELSETZUNG

Das Bedürfnis der Industrie nach an die Prozessbedingungen angepassten Enzymen ist groß. Gerade im Bereich der Waschmittelindustrie werden Enzyme gesucht, die bei hohen Temperaturen und pH-Werten aktiv sind. Zwar verbessern die BAA und BLA die Waschleistung, ihre Effizienz jedoch ist niedrig, so dass es sinnvoll erscheint, Varianten zu erzeugen, die bei Einsatz von weniger Enzym die gleiche oder höhere Leistung erbringen.

Die BAA ist zwar eine acide, thermolabile α -Amylase, trägt jedoch zu einer Verbesserung der Waschleistung bei. Deshalb sollten ausgehend von der BAA Mutanten erzeugt werden, die eine höhere Aktivität bei alkalischem pH haben. Da die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der BAA bekannt sind und sie funktionell in *Escherichia coli* exprimiert werden kann, lassen sich alle Methoden zur Mutagenese auf das Gen der BAA anwenden und verbesserte Mutanten durch Screening von Expressionskulturen identifizieren.

Da wenig über die das pH-Profil bestimmenden Struktur-Funktionsbeziehungen bekannt ist, sollte versucht werden, durch Vergleich der BAA mit alkaliaktiven α -Amylasen grundlegende Struktur-Funktionsbeziehungen zu ermitteln und diese in Mutageneseexperimenten umzusetzen. Zugleich sollten durch Methoden der gerichteten Evolution Bibliotheken erzeugt werden und diese nach verbesserten Mutanten durchmustert werden.

Um ausreichende Amylaseaktivitäten in Expressionskulturen zu erreichen, sollte ein effizientes Expressionssystem etabliert werden.

Zur Identifikation verbesserter Mutanten ist darüber hinaus ein quantitatives, reproduzierbares Assaysystem von Nöten, das die eindeutige Detektion kleiner Veränderungen zulässt und zudem für einen hohen Durchsatz geeignet ist.

Verbesserte Mutanten sollten rekombiniert und erneut durchmustert werden. Schließlich sollte eine eingehende bioinformatische Analyse der Basen- und Aminosäuresequenzen sowie der theoretischen Struktur der BAA bzw. ihrer verbesserten Varianten weitere Struktur-Funktionsbeziehungen aufzeigen.

Neben dem Wildtypgen der BAA standen zwei in einer vorhergehenden Arbeit durch ortsspezifische Mutagenese erzeugte Mutanten zur Verfügung, die als Vorlage für die Experimente zur gerichteten Evolution dienten (Bessler 1999).

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME

Hersteller	Substanz
Amresco, Solon, USA	PAGE Plus
Becton Dickinson, Sparks, USA	Hefeextrakt Trypton
Bio Rad Laboratories, Richmond, USA	SDS-PAGE-Standard (Low molecular weight)
Boehringer (Roche), Mannheim	DNaseI
DIFCO-Laboratories, Detroit, USA	Trypton
Fluka Chemie, Buchs, Schweiz	Agar Ammoniaklösung Brij 35 Bromphenolblau Calciumchlorid (CaCl ₂) Calciumchlorid Dihydrat Coomassie Brilliant Blue R-250 D(+)-Maltose Dihydrat Dimethylsulfoxid (DMSO) Dinitrosalicylsäure (DNS) Dithiothreitol (DTT) Ethyldiamintetraacetat (EDTA) Formamid Gelatine Glutardialdehyd Iod Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid (IPTG) Kaliumchlorid (KCl) Kalium-Natrium-Tartrat Magnesiumchlorid (MgCl ₂) Manganchlorid (MnCl ₂) Natriumchlorid (NaCl) Natriumdithionit (Na ₂ S ₂ O ₅) Natriumdodecylsulfat (SDS)

	Natriumhydroxid (NaOH)
	Natriumiodid (NaI)
	PEG 4000
	PEG 6000
	Rhamnose
Gibco BRL GmbH, Eggenstein	1 kb-Ladder (Standard für Agarosegele)
	Agarose
	dNTP PCR Grade
	Harnstoff
MBI Fermentas, St. Leon-Rot	Restriktionsendonukleasen
	T4-DNA-Ligase
	<i>Taq</i> -Polymerase
Merck, Darmstadt	Stärke, löslich
MWG Biotech, Ebersberg	Oligonukleotide
Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark	BAN 240 L-Flüssigenzym
Perkin Elmer, Weiterstadt	Big Dye Terminator RR Mix
Pharmacia & Upjohn, Freiburg	Phadebas [®] Amylase Test
Pierce, Rockford, USA	BCA Protein Assay Kit
Promega, Madison, USA	Wizard [™] PCR Preps DNA Purification Kit
Qiagen GmbH, Hilden	QIAEX II Gel Extraction Kit
	QIAprep Spin Miniprep-Plasmid Präparations-Kit
	QIAquick Spin Gel Extraction Kit
	QIAquick Spin PCR Purification Kit
Riedel-de Haen, Seelze	Essigsäure 100 %, Eisessig
	Ethanol
	Glycerin
	Glycin
	Isopropanol
	Methanol
	Salzsäure, rauchend (HCl)
	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)
	Zitronensäure
Roth GmbH, Karlsruhe	Ampicillin (Natrium-Salz)
	Ammoniumperoxosulfat (APS)
	Rotiphorese Acrylamid 30

	Rotiphorese NF-10xTBE Puffer
	Rotiphorese NF-Harnstoff, ultrarein
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg	Agarose
Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen	Maisstärke
	Kartoffelstärke , löslich
	Starch azure
Stratagene, La Jolla, USA	Turbo- <i>Pfu</i> -Polymerase
	<i>Pfu</i> -Polymerase Puffer

3.2 GERÄTE

Verwendete Geräte	Typbezeichnung	Hersteller-Firma
Agarose- Gelelektrophorese	DNA Sub Cell™, Mini Sub™ DNA Cell, Mini Sub™ Cell GT	BioRad
	Video Copy Processor P66E	Mitsubishi
	BWM 9X Monitor	Javelin Electronics
	UV-Leuchttisch	MWG-Biotech
Brutschränke	WTE	Binder
	UM 500	Memmert
DNA-Sequenzierer	377A DNA Sequencer	Applied Biosystems
	Macintosh G3	Apple Macintosh
Inkubatoren	HT - Schüttelinkubator (30 °C, 37 °C)	Infors AG
	Certomat R Schüttelinkubator (42 °C)	Braun
Mikroskop	Axiolab E	Zeiss
Mikrotiterplatten- Photometer	FLUOStar	BMG
Mikrowellengerät	Micro-Chef FM A935	Moulinex
Netzgeräte	Power Pac 3000, Power Pac 300, Model 200/2.0 Power Supply	BioRad
Objektive	Achroplan 10x/0,25, 40x/0,65, 100x/1,0	Zeiss
PAGE	Minigel-Twin G42	Biometra®
	Model 583 Gel Dryer	BioRad
PCR-Geräte	DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer

	Mastercycler Gradient	Eppendorf
Pickroboter	BioPick	BioRobotics
Pipettierroboter	Biomek 2000	Beckman
pH-Meter	Digital pH Meter pH525	WTW
Photometer	UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec 3000)	Pharmacia Biotech
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
”Vortexer”	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen	Basic, MC1 Research RC 210 D Precision Advanced	Sartorius OHAUS®
Wasserbad	Wasserbad B3	Haake-Fisons
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417 C Eppendorf Centrifuge 5417 R Eppendorf Centrifuge 5810 R Universal 30 F KR 22 i (Rotor: AK 500-11, 155 mm) G412 Sorvall RC - 5B (Rotor: SA 600)	Eppendorf Eppendorf Eppendorf Hettich Jouan Jouan Du Pont Instruments
IEF/PAGE	PhastSystem	Amersham Pharmacia

3.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterialien	Herstellerfirma
PD-10 Säulen	Amersham Pharmacia
PhastGel Gradient 8-25	Amersham Pharmacia
PhastGel IEF 3-9	Amersham Pharmacia
Filterpapier (25 µm)	BioRad
Eppendorf-Reaktions-Gefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Labortechnik
Millipore Filter, 0,025 µm für Dialyse	Millipore
Centricon YM-30	Millipore
Filtermikrotiterplatten, MAR5N50	Millipore
½ Mikro-Einmalplastikküvetten (10 x 4 x 45 mm)	Ratiolab

3.4 VERWENDETE SOFTWARE UND ONLINE-DATENBANKEN

Verwendung	Programm	URL
Protein- und Gensequenzen	Sequence Retrieval System (Swiss-Prot)	http://expasy.hcuge.ch/srs5/
Proteinstrukturen	Protein Data Bank (PDB)	http://www.pdb.bnl.gov/pdb-bin/pdbmain
Homologie Modelling	Swiss-Model	http://www.expasy.ch/swissmodel/SWISS-MODEL.html
Strukturbearbeitung	SwissPDBViewer	http://expasy.hcuge.ch/spdbv/mainpage.html
Visualisierung	VMD	http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd
Sequenz-Alignment	ClustalW	http://pbil.ibcp.fr/NPSA/npsa_clustalw.html

3.5 BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE

3.5.1 BAKTERIENSTÄMME:

Die verwendeten *Escherichia coli*-Stämme sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Stämme mit Genotyp und Resistenzen

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	DeoR, endA1, gyrA96, hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁻), recA1, relA1, supE44, thi-1, Δ (lacZYA-argFV169), ϕ 80lacZ Δ M15, F ⁻	Nal ^R	(Hanahan 1983)
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ['] proAB lacI ^q ZDM15 Tn10 (Tet ^R)]	(Tet ^R) Cam ^R	(Greener 1993; Greener 1996)

3.5.2 PLASMIDE

Die verwendeten Plasmide sind zusammen mit den relevanten Genotypen und Resistenz in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Verwendete Plasmide mit Genotypen und Resistenzen.

Plasmid	relevanter Genotyp	Resistenz	Referenz
pCYTEXP1	cIts857, P _{RP_L}	Ap ^R	(Belev <i>et al.</i> 1991)
pCYTBAA-WT	cIts857, P _{RP_L} , Amy	Ap ^R	(Bessler 1999)
pGASTON	P _{Rh}	Ap ^R	(Henke 2001)
pGBAA-WT	P _{Rh} , Amy	Ap ^R	diese Arbeit
pJL3	P _{lac} , BRP	Cm ^R	MoBi Tech

3.6 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

3.6.1 KULTURMEDIEN

Luria-Bertani Medium (LB₀ Medium)

Trypton.....	10 g
Hefeextrakt.....	5 g
NaCl.....	5 g
H ₂ O.....	ad 1 l

Nachdem sich alle festen Bestandteile gelöst haben, wird ein pH von 7,0 mit 6 M NaOH eingestellt.

Für feste Medien werden vor dem Autoklavieren 17 g/l Agar zugegeben. Feste Medien zur Bestimmung der Amylaseaktivität enthalten 1 % (m/v) Maisstärke oder 1% (m/v) lösliche Stärke. Medium zur Selektion von Transformanten wird je nach Plasmid entweder Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml (LB-Amp) oder Chloramphenicol bis zu einer Endkonzentration von 30 µg/ml (LB-Cm) zugesetzt.

3.6.2 STAMMHALTUNG AUF FESTEN NÄHRBÖDEN

Die Stämme auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum werden nach dem Anwachsen bei 37 °C über Nacht mit Parafilm verschlossen und im Kühlraum bei 4 °C gelagert.

3.6.3 STAMMHALTUNG IN FLÜSSIGKULTUREN

Zur Anfertigung von Glycerinkulturen werden 1 ml mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzte LB-Kultur mit einer OD₆₀₀<1 mit 500 µl steriler 75%

Glycerinlösung versetzt und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgt bei -80 °C.

3.6.4 ANZUCHT IN FLÜSSIGMEDIEN

Ausgehend von Einzelkolonien auf Agarplatten oder Glycerinkulturen werden 3 ml-LB-Vorkulturen mit Selektionsantibiotikum angelegt und über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Daraus werden 200 ml- oder 50 ml- LB-Kulturen in 1000 ml- oder 250 ml-Erlenmeyerkolben 1:100 angeimpft und im Schüttler bei 37 °C bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert.

3.7 KULTIVIERUNG UND EXPRESSION DER BAA IN pGBAA-WT

Das Plasmid pGBAA-WT wurde in dieser Arbeit aus dem Plasmid pGASTON durch Insertion des BAA-Gens in die *NdeI-PstI*-Schnittstellen hergestellt. Das Plasmid pGASTON besitzt einen F15 Ori und eine Ampicillin-Resistenz aus dem pUC18-Vektor und den Rhamnose-Promotor nebst *rrn*-Terminator-Sequenz, die aus dem Plasmid pJOE 2792 (Altenbucher 1999) stammen.

3.7.1 EXPRESSION DER BAA IM SCHÜTTELKOLBENMAßSTAB

Eine LB-Amp-Vorkultur wird mit pGBAA-WT (BAA-Gen in pGASTON) transformierten *E. coli* DH5 α (DH5 α (pGBAA-WT)) bzw. XL1-Blue (XL1-Blue (pGBAA-WT)) angeimpft. Zur Expression werden 50 ml LB-Amp mit der LB-Amp-Vorkultur 1:100 angeimpft und bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt. Bei einer OD₅₇₈=0,4 wird die Expression von BAA durch die Zugabe von 500 μ l 20%iger Rhamnoselösung (0,2% Endkonzentration) induziert. Nach 3-4 h werden die Zellen durch Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, 3225xg, 15 min, 4 °C) geerntet und entsprechend weiterverwendet.

3.7.2 EXPRESSION DER BAA IN pJL3-KOTRANSFORMIERTEN *E. COLI*

Das Plasmid pJL3 trägt das Gen für das Bacteriocin release protein (BRP) unter der Kontrolle des Lac-Promotors (Yu und San 1992; van der Wal *et al.* 1995a; van der Wal *et al.* 1995b; van der Wal *et al.* 1995c), sowie eine Chloramphenicol-Resistenz zur Selektion. BRP aktiviert die Phospholipase A in der Zellmembran von *E. coli*, welche permeable Stellen in

der Membran bildet, durch die Proteine in das Kulturmedium ausgeschleust werden können. Durch die Wahl der Induktorkonzentration kann der Grad der Expression des BRP und somit der Grad der Phospholipase A-Aktivierung beeinflusst werden. Dadurch werden bei niedriger Induktorkonzentration permeable Stellen vor allem in der äußeren Membran gebildet, so dass im Periplasma lokalisierte Proteine ins Medium abgegeben werden. Bei hohen Induktorkonzentrationen dagegen wird eine Lockerung der inneren und äußeren Membran bewirkt, was bis zur Zelllyse führen kann.

Zellen, die pJL3 und pGBAA-WT tragen, sollten nach Induktion der α -Amylaseexpression und Induktion der BRP-Expression die gebildete α -Amylase in das Medium abgeben. Zum Nachweis der funktionellen Expression von BRP durch pJL3-Transformanden muss ein Quasi-Lyse-Test durchgeführt werden.

3.7.2.1 QUASI-LYSE-TEST MIT pJL 3 TRANSFORMIERTEN *E. COLI* DH5 α ODER *E. COLI* XL1-BLUE

Das Plasmid pJL3 wird nach dem Standardprotokoll in den entsprechenden *E. coli*-Stamm transformiert. Mit den so erhaltenen Transformanden werden zwei 50 ml Kulturen (LB-Cm) angeimpft und bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt. Nachdem eine $OD_{578} = 0,2$ erreicht ist, wird eine Kultur mit IPTG (Endkonzentration $c = 1\text{mmol/l}$) induziert und die OD_{578} beider Kulturen weitere 3 h stündlich gemessen. Bei funktioneller Expression von BRP nimmt die OD_{578} der induzierten Kultur ab, wohingegen die OD_{578} der nichtinduzierten Kultur weiter ansteigt.

3.7.2.2 EXPRESSION DER BAA IN pJL3-pGBAA-WT-TRANSFORMIERTEN *E. COLI*

Mit pJL3 transformierte *E. coli* DH5 α oder *E. coli* XL1-Blue (*E. coli* DH5 α (pJL3) bzw. *E. coli* XL1-Blue (pJL3)) werden nach der TSS-Methode mit pGBAA-WT transformiert. Aus den so erhaltenen Klonen werden wiederum zwei 50 ml Kulturen (LB-Amp-Cm-Medium) angeimpft und bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt. Nachdem eine OD_{578} von ca. 0,4 erreicht ist, wird durch die Zugabe von 500 μl 20%iger Rhamnoselösung (Rhamnose-Endkonzentration 0,2%) die Expression der BAA induziert. Nach zwei Stunden wird die Expression von BRP durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration $c = 20\ \mu\text{mol/l}$) induziert und die Kulturen für zwei weitere Stunden bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt.

3.7.3 KULTIVIERUNG IN MIKROTITERPLATTEN

Singularisierte *E. coli* (pJL3, pGBAA-WT)-Transformanden werden in Mikrotiterplatten, die pro Well 200 µl LB-Amp-Cm-Medium enthalten, gepickt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Dabei sollte, um Evaporation zu vermeiden, auf eine möglichst gleichbleibend hohe Luftfeuchtigkeit geachtet werden. Danach werden in jedes Well 50 µl einer 75 %igen Glycerinlösung pipettiert und die Mikrotiterplatten bei –80 °C gelagert.

Für Expressionskulturen werden Mikrotiterplatten mit 200 µl LB-Amp-Cm-Medium mit 0,2 % Rhamnose und 5 µmol/l IPTG pro Well aus den Glycerinkulturen angeimpft und für 42 h bei 37 °C inkubiert.

3.8 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

3.8.1 PERIPLASMASPALTUNG

Zur Gewinnung periplasmatisch lokalisierter Proteine werden die Zellen aus Expressionskulturen einem kalten osmotischen Schock unterzogen.

Lösungen

Lysepuffer

Sucrose	20 g
Tris/HCl (50 mM, pH 8)	60 ml
EDTA (0,5 M, pH 8)	2 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml

100x Stabilisatorstammlösung (3M)

Calciumchlorid Dihydrat	44,1 g
Brij 35	0,2475 g
ddH ₂ O	100 ml

Diese wird 1:100 zu einer Stabilisator-Anwendungslösung (30 mM) mit ddH₂O verdünnt.

20x complete[®]-Stammlösung (Proteasehemmer-Cocktail)

complete [®] , EDTA-free	1 Tablette
ddH ₂ O	2 ml

Durchführung

25 ml Expressionskultur werden für 15 min bei 4000 Upm (Eppendorf Centrifuge 5810R) und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 4 ml Lysepuffer mit 1x complete[®] suspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 4000 Upm (Eppendorf Centrifuge 5810R) und 4 °C wird das Pellet in 4 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert und für 5 min bei 0 °C inkubiert. Anschließend werden 200 µl Proteasehemmer zugegeben und für weitere 5 min bei 0 °C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 14000 Upm (Eppendorf Centrifuge 5417 R) und 4 °C für 2 min wird die feste Cytoplasmafraktion abgetrennt und der Überstand mit 40 µl 100x Stabilisatorstammlösung versetzt.

Die Periplasmafraktion kann bei -20 °C für mehrere Wochen ohne Verlust gelagert werden. Jedoch kommt es bei einer Lagerung von mehr als 3 Tagen bei 4 °C sowie mehrmaligem Auftauen und Einfrieren zu teilweise erheblichen Aktivitätsverlusten.

3.8.2 AUFREINIGUNG DER BAA AUS PERIPLASMAFRAKTIONEN

Sämtliche Schritte werden bei 4-8 °C durchgeführt. Geräte und Lösungen müssen ebenfalls auf 4-8 °C vorgekühlt werden.

Lösungen

Puffer A (20 mM Tris/HCl pH 7, 10 mM CaCl₂)

Tris	2,42 g
CaCl ₂	1,11 g
ddH ₂ O.....	ad 1 l
mit 6 M HCl pH 7 einstellen	

Waschpuffer (Puffer A, 20% Sättigung (NH₄)₂SO₄, 1 M NaCl)

Puffer A	100 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,60 g
NaCl	5,84 g

Elutionspuffer (Puffer A, 3 M NaCl, 0,1 M Maltose)

Puffer A.....	100 ml
NaCl	17,54 g
Maltose.....	3,42 g

Durchführung

Periplasmafraktionen werden bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Volumina 1 M Tris/HCl pH 7,0 und 1 M CaCl₂-Lösung zu einer Endkonzentration von 20 mM Tris/HCl und 20 mM CaCl₂ gebracht. Anschließend wird festes (NH₄)₂SO₄ bis zu einer Sättigung von 20% hinzugefügt und nach vollständiger Lösung auf 4 °C gekühlt. Nach der Zugabe von löslicher Kartoffelstärke bis zu einer Endkonzentration von 3% wird die Suspension für 3 h in einem Überkopfschüttler (15 Upm, 99°) geschüttelt und die feste Phase durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wird ein weiteres Mal für eine Stunde mit 3% löslicher Kartoffelstärke behandelt, nach Zentrifugation die festen Phasen vereinigt und mit ½ Volumen Waschpuffer versetzt. Die Desorption der α-Amylase erfolgt durch die Behandlung der festen Phase mit Elutionspuffer für 90 min im Überkopfschüttler (60 Upm, 180°). Nach Zentrifugation wird das Sediment ein weiteres Mal mit Elutionspuffer behandelt. Die kombinierten flüssigen Fraktionen werden über ein YM-30 Centricon 10-fach aufkonzentriert und über PD-10 Säulen von Salzen befreit (Auftragsvolumen 2,5 ml, Elutionsvolumen 6 ml, Regeneration mit 25 ml ddH₂O). α-Amylase-aktive Fraktionen werden über ein YM-30 Centricon aufkonzentriert.

3.8.3 PROTEINGEHALTBESTIMMUNG

Die Proteingehaltbestimmung erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit und BSA als Standard nach Angaben des Herstellers.

3.8.4 SDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)**Prinzip:**

Mittels SDS-PAGE können Proteine in analytischem oder präparativem Maßstab nach ihrer Größe aufgetrennt werden (Laemmli 1970). Dabei werden die Proteine zuerst durch das Detergenz SDS denaturiert und wandern dann unter dem Einfluß des angelegten elektrischen Feldes durch die Poren eines Polyacrylamidgels, wobei die Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit von der Porengröße des Gels und der angelegten Spannung abhängen.

Puffer und Lösungen

4x-Sammelgel-Puffer

Tris	12,1 g
SDS	0,8 g
ddH ₂ O.....	ad 200 ml

Mit HCl auf pH 6,8 einstellen

4x-Trenngel-Puffer

Tris	36,5 g
SDS	0,8 g
ddH ₂ O.....	ad 200 ml

mit HCl auf pH 8,8 einstellen

Sammelgel (4 %)

Acrylamidlösung (30/0,8) 30 % (m/v)	0,52 ml
4x-Sammelgel-Puffer	1,00 ml
ddH ₂ O.....	2,47 ml
TEMED	4,00 µl
APS 10 % (m/v)	40 µl

Trenngel (12,5 %)

Acrylamidlösung (30/0,8) 30 % (m/v)	3,33 ml
4x-Trenngel-Puffer.....	2 ml
ddH ₂ O.....	2,67 ml
TEMED	4 µl
APS 10 % (m/v)	40 µl

2x-SDS-Proben-Puffer (Sambrook et al. 1989)

Tris	100 mM
DTT	200 mM
SDS	4 %
Bromphenolblau	0,2 %
Glycerin.....	20 %

Elektrophorese-Puffer

Tris	6 g
Glycin.....	28,8 g
SDS	2 g
ddH ₂ O.....	ad 2 l
mit HCl auf pH 8,3 einstellen	

Herstellung des SDS-Gels und Durchführung der Elektrophorese

Zwischen zwei gründlich gereinigte, durch Abstandshalter getrennte, zusammengeklammerte Glasplatten wird die Trenngellösung luftblasenfrei bis ca. 2,5 cm unter den oberen Rand gegossen und mit ca. 200 µl H₂O oder Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels (20 min bei RT) wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen, die Sammelgellösung auf das mit dH₂O gespülte Trenngel gegossen und der Probenaschenkamm eingesetzt. Nach weiteren 20 min werden die Klammern, der Abstandshalter und der Probenaschenkamm vorsichtig entfernt und die Probenaschen gründlich mit dH₂O gespült. Das so vorbereitete Gel wird zur Durchführung der Elektrophorese in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur eingesetzt.

Die Proteinproben werden vor dem Auftragen 1:1 mit 2x-SDS-Probenpuffer verdünnt, 5 min bei 95 °C denaturiert und kurz zentrifugiert. Als Molekulargewichtsstandard dient LMW-Standard (siehe Tabelle 5) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgt bei 25 mA pro Gel bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreicht hat, bzw. bereits aus dem Gel in den Elektrophoresepuffer gewandert ist. Die Dauer der Elektrophorese kann in Abhängigkeit der zu trennenden Proteine variiert werden. Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine im Gel gefärbt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Proteinstandards, Low molecular weight Standard (LMW)

Protein	Molekulargewicht /kDa
Phosphorylase B	97,4
BSA	66,0
Ovalbumin	45,0
Carboanhydrase	30,0
Trypsininhibitor	20,1
α-Lactalbumin	14,4

3.8.5 COOMASSIE-FÄRBUNG VON POLYACRYLAMID-GELEN

Lösungen

Coomassie-Färbelösung

Coomassie-Brilliant-Blue R-250.....	1 g
Essigsäure.....	100 ml
Methanol	300 ml
ddH ₂ O.....	600 ml

mehrere Stunden rühren lassen.

Entfärbelösung

Essigsäure.....	100 ml
Methanol	300 ml
ddH ₂ O.....	600 ml

Durchführung

Nach beendeter Elektrophorese werden die Glasplatten und der Abstandshalter entfernt, und das Gel zweimal in etwa 20 ml dH₂O geschwenkt. Nach dem Abdekantieren des dH₂O wird das Gel mindestens 30 min in Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wird die Färbelösung abdekantiert und überschüssiger Farbstoff durch mehrmaliges Waschen mit je 10 ml dH₂O entfernt. Die Entfärbung erfolgt durch die Zugabe von Entfärbelösung, bis der Hintergrund fast klar ist. Abschließend wird noch 3 mal mit je 10 ml dH₂O gespült. Zur Aufbewahrung wird das Gel luftblasenfrei zwischen ein Filterpapier und eine Kopierfolie gelegt und 2 h im Gelrockner bei 80 °C im Vakuum getrocknet.

3.8.6 SILBERFÄRBUNG VON POLYACRYLAMID-GELEN

Lösungen

Fix 1

Sulfosalicylsäure	34,59 g
Trichloressigsäure	115 g
Methanol	300 ml
Wasser	700 ml

Fix 2

Methanol	500 ml
Essigsäure (100 %).....	100 ml
Wasser	400 ml

Fix 3

Glutardialdehyd (50 %).....	200 ml
Wasser	800 ml

Wash 1

Methanol	50 ml
Wasser	950 ml

Wash 2

Wasser	1000 ml
--------------	---------

Wash 3

Essigsäure.....	100 ml
Wasser	900 ml

Stain

Ammoniaklösung (33 %)	5,7 ml
NaOH (0,1 M)	100 ml
Silbernitratlösung (20 % (w/v))	10 ml
Wasser	385 ml

Develop

Formaldehyd (37 %)	240 µl
Zitronensäure (10 %).....	250 µl
Wasser	ad 500 ml

Preserve

Glycerin (87 %).....	100 ml
Wasser	900 ml

Durchführung

Die Entwicklung erfolgt in der Entwicklungskammer des PhastSystem-Gerätes. Die Reihenfolge, Schlauchanschlußbelegung sowie Reaktionszeiten sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Diese Färbemethode kann auch auf die Färbung im Schüttelbad angewendet werden. Wichtig bei derartiger Vorgehensweise ist die gründliche Entfernung von Lösungsresten nach jedem Schritt.

Tabelle 6: Silberfärbung von PAGE-Gelen

Schritt	Lösung	Eingang	Ausgang	Zeit /min	Temperatur /°C
1	Fix 1	7	6	3.0	20
2	Fix 2	2	6	1.0	50
3	Fix 2	2	6	3.0	50
4	Wash 1	3	0	0.5	50
5	Wash 1	3	0	0.5	50
6	Fix 3	8	6	6.0	50
7	Wash 1	3	0	2.5	50
8	Wash 1	3	0	4.0	50
9	Wash 2	1	0	2.0	50
10	Wash 2	1	0	3.0	50
11	Stain	4	6	5.0	40
12	Wash 2	1	0	1.2	30
13	Develop	5	6	0.5	30
14	Develop	5	6	3.2	30
15	Wash 3	9	0	1.5	50
16	Preserve	1	0	1.0	50
17	Preserve	1	0	2.0	50

3.9 MESSUNG DER AMYLASEAKTIVITÄT

Die Messung der Aktivität einer Amylase-haltigen Lösung kann durch verschiedene Verfahren erfolgen. Die ersten entwickelten Verfahren detektierten die Viskositätsänderung einer Stärkelösung durch das Einwirken von Amylasen. Darüber hinaus sind Verfahren bekannt, bei denen die nach Einwirkung von α -Amylasen auf Stärke entstandenen reduzierenden Enden mit Hilfe von Dinitrosalicylsäure nachgewiesen (Miller 1959). Mit

neueren Verfahren kann die Aktivität direkt photometrisch bestimmt werden, was einen geringeren Zeit- und Materialaufwand bedeutet. Hierbei kommen Substrate zum Einsatz, an die ein spektrometrisch detektierbarer Farbstoff gebunden ist (Rauscher 1984; Wahlefeld 1984).

3.9.1 UNIT-DEFINITION

Die Amylaseaktivität z wird in U angegeben. Die Einheit 1 U ist definiert als die Enzymmenge, die pro Minute 1 μmol glucosidische Bindungen bei 37 °C hydrolysiert.

Die Aktivitätskonzentration b besitzt die Einheit U/l.

3.9.2 ALLGEMEINE LÖSUNG

100x Stabilisatorstammlösung (3 M)

Calciumchlorid Dihydrat.....	44,1 g
Brij 35.....	0,2475 g
ddH ₂ O.....	100 ml

Diese wird 1:100 zu einer 1x Stabilisatorlösung (30 mM) mit ddH₂O verdünnt.

3.9.3 QUALITATIVES SCREENING AUF α -AMYLASEAKTIVITÄT

Auf festem LB-Agar-Medium, das neben dem Selektionsantibiotikum auch 1% Maisstärke oder 1% lösliche Stärke enthält, werden Kolonien mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und bei 37 °C für 16 h inkubiert. Alternativ können Transformationsansätze direkt auf diesem Medium ausplattiert werden.

Nach weiterer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wird das Medium mit einer wässrigen Lösung von Iod und Natriumiodid überschichtet. Nach 30 s Inkubation bei Raumtemperatur wird die überstehende Lösung abgegossen. Amylase-aktive Klone können anhand der klaren Höfe gegenüber dem violetten Hintergrund identifiziert werden.

3.9.4 DINITROSALICYLSÄURE-ASSAY (Miller 1959)

Prinzip

Zur Durchführung des Dinitrosalicylsäure-Assays (DNS-Assay) wird die enzymhaltige Lösung mit 1%iger Stärkelösung inkubiert und die Reaktion nach einem bestimmten

Zeitraum durch die Zugabe einer Dinitrosalicylsäurelösung gestoppt. Durch Inkubation bei 95 °C für 20 min wird DNS durch die reduzierenden Enden der Zuckermoleküle zu Amino-nitrosalicylsäure reduziert, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=540$ nm gemessen werden kann. Durch die Aufnahme einer Kalibrierkurve mit Maltose in verschiedenen Konzentrationen wird ein Zusammenhang zwischen der Absorption und der Aktivitätskonzentration der Enzymproben in U/l hergestellt.

Lösungen

Tris-Maleat-Puffer pH 6,5 (c = 0,1 mol/l)

Tris	12,11 g
Maleinsäure	11,61 g
ddH ₂ O.....	ad 500 ml

Der pH-Wert wird mit 1 molarer NaOH-Lösung auf pH = 6,5 eingestellt und mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt.

Substratlösung

Es werden 1 g Stärke (löslich) in 50 ml ddH₂O und 50 ml entsprechendem Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit ddH₂O auf 100 ml aufgefüllt.

Alternativ kann auch 10 g Stärke (löslich) in 500 ml siedendes Wasser eingerührt werden. Nach vollständigem Lösen und Abkühlen wird mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Zur Herstellung der Substratlösung wird die Stärkelösung mit dem entsprechenden Puffer zu gleichen Teilen gemischt.

DNS-Lösung

Dinitrosalicylsäure	8,8 g
Kalium-Natrium-Tartrat.....	250 g
Natriumdisulfit	6,3 g
ddH ₂ O.....	915 ml
Natronlauge (4,5%).....	334 ml

Durchführung

Jede Aktivitätsmessung wird als Dreifachbestimmung durchgeführt. Zudem wird der Blindwert ebenfalls als Dreifachbestimmung aufgenommen. Enzymlösungen werden mit 1xStabilisator-Anwendungslösung auf eine Aktivitätskonzentration von 0-3300 U/l verdünnt.

In einem 2 ml Reaktionsgefäß werden 100 µl Substratlösung vorgelegt und mit 50 µl entsprechend verdünnter Enzymlösung versetzt. Nach Inkubation bei der entsprechenden Temperatur (typischerweise 37 °C oder 50 °C) für 15 min wird die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 300 µl DNS-Lösung gestoppt und für 20 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wird die Probe mit 1,5 ml Wasser verdünnt und für 20 min bei 0 °C inkubiert. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von $\lambda=540$ nm gemessen.

Für den Blindwert werden 100 µl Substratlösung vorgelegt und bei 35 °C oder 50 °C für 15 min inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µl DNS-Lösung werden 50 µl Enzymlösung zugegeben und für 20 min bei 95 °C inkubiert. Die weitere Vorgehensweise entspricht der oben beschriebenen.

Aufnahme der Kalibrierkurve

Die Kalibrierkurve wird in einer Dreifachbestimmung mit Maltosestammlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0-50 mM aufgenommen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Konzentrationen der Maltosestammlösungen zur Kalibrierung des DNS-Assays.

#	Maltosekonzentration (mM)
0	0
1	10
2	20
3	30
4	40
5	50

In einem 2 ml Reaktionsgefäß werden 100 µl Substratlösung und 50 µl Maltoselösung der entsprechenden Konzentration mit 300 µl DNS-Lösung gemischt und für 20 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wird die Lösung mit 1,5 ml Wasser verdünnt und für 20 min bei 0 °C inkubiert. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von $\lambda=540$ nm gemessen. Um einen Zusammenhang zwischen Absorption und Maltosekonzentration zu erhalten, werden in einem Diagramm die Absorption gegen die Maltosekonzentration aufgetragen. Die daraus

resultierende Ausgleichsgerade sollte eine Linearität (R^2) von mindestens 0,99 besitzen. Aus der Geradengleichung lässt sich der Zusammenhang zwischen der Absorption und der Aktivitätskonzentration in U/l berechnen:

Gegeben sei die Geradengleichung der Ausgleichsgeraden:

$$A = a \times c(\text{Maltose}) + A_0$$

mit der Absorption A , der Maltosekonzentration $c(\text{Maltose})$ in mmol/l sowie Steigung der Kalibriergerade a und dem y-Achsenabschnitt der Kalibriergerade b .

Nach Auflösen zur Konzentration $c(\text{Maltose})$ und Division durch die Reaktionszeit t (hier $t = 15$ min) ergibt sich für die Aktivitätskonzentration b in U/l

$$b = \frac{1000 \times (A - A_0)}{a \times t}$$

3.9.5 PHADEBAS[®]-TEST (Hall *et al.* 1970)

Prinzip:

Der Phadebas[®] Amylasetest ist ein Verfahren, das sich zur schnellen und einfachen Aktivitätsbestimmung einer Probe eignet. Als Substrat wird Stärke verwendet, an die kovalent Farbstoffmoleküle gebunden sind. Das Substrat selbst ist aufgrund seiner Quervernetzung in Wasser schwer löslich. Die Amylase spaltet das Substrat in kleinere, in Wasser lösliche Fragmente. Die Konzentration an farbigen Fragmenten und somit die Absorption der überstehenden Lösung steht in direktem Zusammenhang mit der Amylaseaktivität, welche so, ausgehend von einer Kalibrierungsreihe, abgeschätzt werden kann.

Zur Aufnahme von pH-Profilen werden im Phadebas-Substrat enthaltene Puffersubstanzen abgetrennt und die Messung in Anwesenheit des entsprechenden Puffers durchgeführt.

3.9.5.2 PHADEBAS[®]-SCHNELLTEST

Durchführung

Eine Phadebas[®]-Tablette wird in 10 ml ddH₂O suspendiert und 500 µl Aliquots werden mit 50 µl entsprechend verdünnter Probe (Aktivitätskonzentration < 1000 U/l) versetzt. Nach 15 min Inkubation bei 37 °C wird die Reaktion durch die Zugabe von 150 µl 0,5 M NaOH abgestoppt. Zur Bestimmung des Blindwerts werden 500 µl Phadebas-Suspension für 15 min bei 37 °C inkubiert und nach der Zugabe von 150 µl 0,5M NaOH mit 50 µl Probe versetzt. Nach Zentrifugation für 2 min bei 14000 Upm (Eppendorf Centrifuge 5417C) werden 500 µl

des Überstands in einer Küvette 1:2 mit ddH₂O verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=620$ nm gegen den Blindwert gemessen. Die Aktivität bzw. die Aktivitätskonzentration kann aus einer vorher erstellten Kalibrierkurve abgelesen werden.

Kalibrierkurve

Um den linearen Bereich des Phadebas[®]-Assays zu bestimmen und um einen Zusammenhang zwischen gemessener Absorption und Aktivitätskonzentration in U/l herzustellen, wird der Phadebas[®]-Schnelltest mit einer Verdünnungsreihe einer Enzymlösung bekannter Aktivitätskonzentration hergestellt. Die gemessenen Absorptionen werden in einem Diagramm über die Aktivitätskonzentration aufgetragen. Die Ausgleichsgerade muss eine Linearität (R^2) von $>0,99$ besitzen.

3.9.5.3 PHADEBAS[®]-TEST ZUR AUFNAHME VON PH-PROFILEN

Zur Aufnahme eines pH-Aktivitätsprofils werden 8 Phadebastabletten in 40 ml ddH₂O suspendiert. Das feste Substrat wird durch Filtration über eine Glasfritte (Porengröße 0 oder 1) abgetrennt und in 40 ml ddH₂O aufgenommen. Je 5 ml der gut aufgeschlammten Substratsuspension werden mit 5 ml des 0,1 M Puffers mit entsprechendem pH versetzt. Hierbei werden für Messungen im pH-Bereich von 4 bis 6 Acetatpuffer, für den Bereich 7 bis 8 Tris/HCl-Puffer, für pH 9 und pH 10 Glycin/NaOH-Puffer und für die Messungen bei pH 11 Carbonatpuffer verwendet. Für jeden pH-Wert wird eine Dreifachbestimmung analog dem Protokoll für den Phadebas[®]-Schnelltest durchgeführt. Zudem werden die Blindwerte bei pH 6 und pH 10 ebenfalls dreifach bestimmt.

3.9.6 PHADEBAS[®]-TEST IM MIKROTITERPLATTENFORMAT

Um einen möglichst hohen Durchsatz an Proben zu erreichen, musste ein Screening für den Mikrotiterplattenmaßstab ausgelegt und die bekannten Methoden angepasst werden.

Zubereitung der Enzymlösung

Für eine maximale Enzymaktivität werden die Zellen in den Mikrotiterplatten durch zweimal wiederholtes Einfrieren (-196 °C, N_{2,l}) und Auftauen (45 min, 37 °C) aufgeschlossen. Das Zellpellet wird durch Zentrifugation (1000xg, 15 min, 25 °C) von dem Überstand getrennt. Bei Verwendung von pJL3-kotransformierten Zellen kann der Aufschlussschritt auf einmaliges Durchlaufen des Frier-Tau-Zyklus beschränkt werden. Der

Überstand wird direkt für den Assay eingesetzt. Es hat sich gezeigt, dass eine Ruhephase von 15-30 min bei 4 °C zu einer verbesserten Enzymaktivität führt.

Durchführung

Für eine Testdurchführung bei Standard-pH (pH 7) werden in einem 50 ml Falcon-Tube zu 30 ml ddH₂O 4 Phadebas[®]-Tabletten gegeben und suspendiert. Für eine Durchführung bei pH 10 werden 4 Phadebas[®]-Tabletten wie oben beschrieben suspendiert, in einer Glasfritte (Porengröße 1 oder 2) von der flüssigen Phase getrennt und mit je 2x10 ml ddH₂O gewaschen. Das Retentat wird in 30 ml eines 0,1 M Glycin-NaOH-Puffers (pH 10) mit 0,25 mmol/l CaCl₂ resuspendiert. 150 µl der erhaltenen Suspensionen werden nach gutem Aufschlännen mit Hilfe einer 8-Kanal Mehrkanalpipette (Eppendorf[®]) in jedes Well einer Filtermikrotiterplatte (Millipore[®] MAR5 N50) pipettiert. Diese werden mit 50-75 µl enzymhaltiger Lösung versetzt, gemischt und für 15 min bei 37 °C in einem mit equilibrierten Inkubator inkubiert. Die flüssige Phase wird durch Zentrifugation (15 min, 1000xg, 25 °C) in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=620$ nm gemessen.

Kalibrierkurve

Zur Bestimmung des linearen Bereichs des Phadebas[®]-Tests in der Mikrotiterplatte wird eine Kalibrierkurve mit α -Amylase-haltiger Lösung bekannter Konzentration aufgenommen. Dazu wird in eine Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe mit einem Aktivitätskonzentrationsbereich von 0-6000 U/l pipettiert und 50 µl von jedem Well in dem Phadebas[®]-Test für Mikrotiterplatten eingesetzt.

3.10 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.10.1 MINI-PLASMID-DNA-ISOLATION MIT DEM QIAPREP SPIN MINIPREP KIT (QIAGEN)

Für Anwendungen, die besonders reine Plasmid-DNA erfordern (PCR-Reaktionen, Sequenzreaktionen, präparative Restriktionsanalysen, etc.) wird diese Plasmid-Präparationsmethode verwendet, die auf der alkalischen Lyse von Zellen (Birnboim und Doly 1979) und der spezifischen Bindung von DNA an Ionenaustauschersäulen beruht.

Nach Abtrennung der Zellen von 1,5–2 ml einer *E. coli* LB-Vorkultur durch Zentrifugation (1 min, 14000 Upm, Eppendorf Centrifuge 5417C) und Verwerfen des

Kulturüberstandes erfolgt die weitere Durchführung der Plasmidisolierung aus den Zellen exakt nach Angaben des Herstellers.

3.10.2 SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Restriktionsendonukleasen ermöglichen es, DNA an bestimmten Erkennungssequenzen zu schneiden. Für analytische Kontrollen erfolgt dies in einem Reaktionsvolumen von 10 µl gemäß dem folgenden Pipettierschema:

Mini- oder Midi-Präp-DNA (0,2-1 µg).....	3 µl
Restriktionsenzym.....	0,5 – 1 U
10x-Restriktionspuffer	1 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Dabei ist darauf zu achten, dass der für das jeweilige Restriktionsenzym optimale Restriktionspuffer und die optimale Temperatur verwendet wird (Herstellerangaben). Außerdem sind in einem ähnlichen Ansatz kombinierte Spaltungen mit 2 oder mehr Enzymen möglich, solange die Enzyme ähnliche Pufferbedingungen benötigen.

Für größere Ansätze werden die jeweiligen Volumina modifiziert. Der eigentliche Verdau erfolgt im Allgemeinen durch ein- bis zweistündige Inkubation des gemischten Reaktionsansatzes bei 37 °C bzw. bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Die Präparation und Reinigung des gewünschten DNA-Fragments erfolgt danach meist durch Gelelektrophorese und Gelextraktion. Wenn die abgespaltenen Fragmente kürzer als 50 bp sind, kann die Aufreinigung auch mittels des QiagenPCR-Purification-Kit erfolgen.

3.10.3 AUFTRENNUNG VON DNA DURCH AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Prinzip:

Die analytische oder präparative Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe erfolgt durch Elektrophorese in einem Agarosegel. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle im angelegten elektrischen Feld zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Porengröße der Matrix (Agarose), der angelegten Spannung und der Größe der DNA-Moleküle abhängt. Um einen eindeutigen Zusammenhang von Molekülgröße und Molekularmasse zu erhalten, müssen die DNA-Moleküle vollständig linearisiert sein. Dies wird durch die Zugabe von Ethidiumbromid erreicht, das sich in die

DNA-Moleküle einlagert. Ethidiumbromid erlaubt es auch, die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, da es durch UV-Licht zu Fluoreszenz angeregt wird.

Lösungen:

DNA-Probenpuffer

Sucrose	40 g
Bromphenolblau	0,5 g
SDS	0,1 g
0,5 M EDTA pH 8,0.....	0,2 ml
ddH ₂ O.....	ad 100 ml

50x TAE-Puffer

146,1 g EDTA in 500 ml 0,1 M NaOH lösen und mit 1 M NaOH pH 8 einstellen.

Tris	242 g
Essigsäure.....	57,1 g
ddH ₂ O.....	ad 1 l

Agarose-Gellösung

Agarose	1 % (m/v)
1x-TAE-Puffer	ad 1 l

10x TE-Puffer (10:1, pH 8)

Tris	1,21 g
EDTA	0,292 g

in 80 ml ddH₂O lösen, mit 1 M NaOH pH 8 einstellen, mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen.

kb-Standard (1 mg/ml)

1 kb DNA Ladder.....	50 µl
1x TE-Puffer.....	350 µl
DNA-Probenpuffer.....	600 µl

Herstellung des Gels und Durchführung der Elektrophorese:

Die Agarose wird durch Aufkochen im Mikrowellengerät in 1x TAE-Puffer gelöst und bei 80 °C aufbewahrt. Die auf ca. 60 °C abgekühlte Gellösung wird mit 0,0075 % (v/v)

Ethidiumbromid versetzt und in den Gelträger mit eingesetztem Probenaschenkamm gegossen. Nach Abkühlung wird das feste Gel mitsamt des Gelträgers in die Elektrophoresekammer gesetzt, mit 1x-TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben werden 1:2 mit DNA-Probenpuffer verdünnt und in die Probenaschen eingebracht. Als Größenstandard wird ein kommerzieller DNA-Standard verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei max. 120 V bis die Bromphenolblau-Bande das Gel zu $\frac{3}{4}$ durchlaufen hat.

Zur Detektion wird das Gel auf den UV-Leuchttisch gelegt. Das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid wird bei einer Wellenlänge von $\lambda = 480 \text{ nm}$ zur Fluoreszenz angeregt und das DNA-Bandenmuster kann somit fotografiert werden. Die Intensität der Banden entspricht der Menge an dazugehöriger DNA. Allerdings ist dabei zu beachten, dass kleinere DNA-Moleküle bei gleicher Konzentration ein schwächeres Signal geben, da sie weniger Ethidiumbromidmoleküle einlagern können als größere DNA-Fragmente.

3.10.4 FRAGMENTISOLIERUNG AUS AGAROSEGELEN

Um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe zu isolieren, wird nach der PCR oder dem Restriktionsverdau eine Gelelektrophorese durchgeführt. Nach dem Elektrophoreselauf wird auf dem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell das Agarosestück aus dem Gel geschnitten, welches das gewünschte DNA-Fragment enthält. Die DNA wird mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert. Diese Methode beruht auf der spezifischen Bindung von DNA an eine Silicagel-Matrix. Die Durchführung der DNA-Extraktion aus dem ausgeschnittenen Agaroseblock erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers.

3.10.5 AUFREINIGUNG VON DNA NACH RESTRIKTIONSVERDAU UND PCR MIT DEM WIZARD PCR-PURIFICATION KIT (PROMEGA)

Nach Beendigung des Restriktionsverdaus oder der PCR werden die Ansätze komplett mit dem WizardPCR-Purification-Kit nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll aufgereinigt. Die gereinigten DNA-Fragmente werden entweder weiter verwendet oder bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.10.6 LIGATION VON DNA MIT DER T4-DNA-LIGASE

Prinzip:

T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden der DNA. Dies ermöglicht das Verbinden zweier linearer DNA-Moleküle oder die Zyklisierung eines linearen Moleküls.

Durchführung:

Vektor (ca. 25 ng)	7 µl
Insert (ca. 25 ng)	15 µl
Ligase Puffer (10 x)	5 µl
T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O.....	22 µl

Der Ansatz wird 16 Stunden bei 16 °C inkubiert und in *E. coli* transformiert. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert kann in gewissen Grenzen variiert werden. Üblich sind Verhältnisse von 2:1, 1:1 oder 1:2 (Vektor:Insert).

3.10.7 TRANSFORMATION IN *E. COLI* (PEG/DMSO-METHODE)

TSS-Medium (Transformation-Storage Solution)

LB ₀ Medium.....	89 ml
PEG 6000	10 g
DMSO	5 ml
MgCl ₂ (1 M)	10 ml

Herstellung kompetenter Zellen (Chung *et al.* 1989):

Aus einer LB-Vorkultur von *E. coli* DH5α oder *E. coli* XL1-Blue ohne Selektionsantibiotikum werden 100 ml LB₀-Medium 1:100 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ = 0,4-0,6 geschüttelt. Zwei 50 ml-Fractionen der Kultur werden bei 3500 Upm (Eppendorf Centrifuge 5810R) und 4 °C 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets in insgesamt 4 ml TSS (0 °C) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden in 200 µl-Aliquots aufgeteilt und entweder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert oder direkt transformiert.

Transformation von kompetenten Zellen:

Zur Transformation werden zu je 200 µl der kompetenten Zellen entweder 1 µl Plasmid oder 10 µl Ligationsansatz gegeben, kurz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Transformationsansatz 45 sec bei 42 °C inkubiert und 800 µl LB-Medium zugegeben. Die Ansätze werden dann bei 37°C 30-45 min unter Schütteln inkubiert, bevor die Zellen bei 4000 Upm für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert werden (Eppendorf Centrifuge 5810R). Das in 150-200 µl LB resuspendierte Pellet wird auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgt für 16 h bei 37 °C.

3.10.8 SEQUENZIERUNG VON DNA**Prinzip:**

Die Sequenzierung von DNA erfolgt nach der von Frederick Sanger entwickelten enzymatischen Ketten-Abbruch-Methode (Sanger *et al.* 1977). Dabei werden unterschiedlich lange DNA-Fragmente durch kontrollierte Unterbrechung der Synthese mittels spezifischer Terminatoren (2', 3'- Didesoxynukleosid – 5'-triphosphate, ddNTPs), die zusätzlich zu den 2'- Desoxynukleotiden zum Reaktionsansatz gegeben werden, erzeugt. Da die ddNTPs an ihrer 3'- Position keine OH-Gruppe besitzen, kann ein entstehendes DNA-Fragment nach dem statistischen Einbau dieses Terminators nicht mehr durch Ausbildung weiterer Phosphodiester-Bindungen zum nächsten anzuhängenden 2'- Desoxynukleotid verlängert werden, und es kommt zum Kettenabbruch. In der Praxis werden 4 separate Reaktionen, jede mit einem anderen ddNTP als Terminator, angesetzt und anschließend nebeneinander in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese der im Originalprotokoll durch radioaktiv markierte ddNTPs sichtbar gemachten, neu synthetisierten Fragmente, kann direkt aus dem Signalmuster die DNA-Sequenz abgelesen werden.

Bei der automatischen DNA-Sequenzierung mit dem *377A-DNA-Sequencer* von Applied Biosystems sind die 4 ddNTPs mit 4 unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, und werden zusammen in einer Spur des Gels aufgetrennt (Prober *et al.* 1987; Freeman *et al.* 1990). Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch 2 Argonlaser mit Emissionsbanden von 488 und 514 nm angeregt und detektiert. Diese Vierfarbentechnik erhöht sowohl den Durchsatz pro Gel als auch die Geschwindigkeit der Datenerfassung, die bereits während des Gellaufs durch einen angeschlossenen Rechner erfolgt.

Die Verwendung thermostabiler Polymerasen erlaubt die zur PCR (Mullis *et al.* 1986) analoge *zyklische Sequenzierung*, bei der die enzymatischen Sequenzreaktionen mit einem Primer über mehrere Zyklen durchgeführt werden, was geringere Mengen Ausgangs-DNA erfordert und die Automatisierung erlaubt.

Lösungen

Gellösung

Rotiphorese® NF-Harnstoff.....	18,0 g
Rotiphorese® NF-10x-TBE-Puffer.....	6,0 ml
PAGE-Plus (40%).....	5,3 ml
ddH ₂ O.....	21,5 ml

Die fertige Lösung wird durch eine Membran (Porengröße 0,22 µm) filtriert und entgast. Die Polymerisation wird durch Zugabe von 24 µl TEMED und 180 µl 10 % (m/v) APS gestartet.

Resuspensionslösung

Formamid.....	80 % (v/v)
25 mM EDTA, pH 8,0.....	20 % (v/v)

Durchführung:

Gießen des Polyacrylamid-Gels

Um die exakte Erfassung der Fluoreszenzsignale während des Gellaufs zu gewährleisten, werden die Glasplatten nacheinander mit dem Detergenz Alkonox, einer 6 M NaOH-Lösung und Wasser gereinigt. Anschliessend wird anhaftendes Wasser durch das Aufspritzen von Isopropanol entfernt und die Glasplatten getrocknet.

Durch die Zugabe von APS und TEMED zur Gellösung wird die Polymerisation gestartet. Die Gellösung wird zwischen die durch Abstandshalter (Spacer) getrennten und mit Klammern arretierten Glasplatten luftblasenfrei gegossen, der "Vorkamm" eingesetzt. Die Platten werden während der zweistündigen Polymerisationszeit mit Zellophanfolie abgedichtet, anschließend werden die Klammern entfernt, der "Vorkamm" durch einen "Haifisch-Kamm" ersetzt und das Gel in den Sequenzierer eingebaut.

Die Qualität des Gels wird durch einen Test-Scan ermittelt, der eine möglichst ebene Basislinie ergeben sollte.

Die zyklische Sequenzreaktion

Der Cycle-Sequencing-Reaktionsansatz wird mit dem Big-Dye Terminator RR Mix angesetzt. Da in diesem Mix bereits die benötigten Mengen dNTPs, Terminatoren, Salze, Puffer und Polymerase zusammen vorliegen, muß lediglich die zu sequenzierende DNA, der Sequenzier-Primer und Wasser zugegeben werden. Damit wird der endgültige Reaktionsansatz wie folgt auf Eis pipettiert:

Big-Dye Terminator RR Mix	4 µl
Sequenzier-Primer	5 pmol
Plasmid-DNA	300 –500 ng
ddH ₂ O	ad 20 µl

Die Sequenzierreaktion erfolgt im Thermocycler unter den in Tabelle 8 angegebenen Bedingungen:

Tabelle 8: Temperaturprogramm für die zyklische Sequenzierreaktion

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension
1	95 °C, 6 min	-	-
2 (25x)	95 °C, 40 s	55 °C, 30 s	60 °C, 4 min
3	-	-	60 °C, 4 min

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgt über eine mit Sephadex 50 beladene Multiscreen MAVN 50 Mikrotiterplatte (Millipore) nach den Angaben des Herstellers.

Anschließend wird die getrocknete DNA in 4 µl Resuspensionslösung gelöst, 3 min bei 95 °C denaturiert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur in die Taschen des in das Sequenziergerät eingebauten Polyacrylamidgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt nach den vom Hersteller empfohlenen Programmparametern (2500 V, 40 mA, 30 W) und wird aufgrund der Dauer von 12 h über Nacht durchgeführt. Die vom Rechner erfaßten und prozessierten Sequenzdaten können anschließend mittels geeigneter Software ausgewertet werden.

3.11 MUTAGENESE- UND REKOMBINATIONSMETHODEN

3.11.1 ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE DURCH QUIKCHANGE

Prinzip:

Um spezifisch Aminosäuren auszutauschen, werden Punktmutationen in das entsprechende Gen eingeführt. Dazu werden 2 komplementäre Primer verwendet, die in ihrer Mitte den gewünschten Basenaustausch tragen. Als Template dient das Plasmid mit dem zu mutierenden Gen. Auf den ersten Schritt, die Denaturierung des Plasmids, folgt im Anlagerungsschritt die Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge des Plasmids. Im Syntheseschritt wird das gesamte restliche Plasmid kopiert. Damit besitzen am Ende der Reaktion alle DNA Stränge die entsprechende Mutation mit Ausnahme der Template-DNA. Diese ist im Gegensatz zu den *in vitro* gebildeten Tochtersträngen methyliert, da sie durch Plasmidisolierung aus Zellen gewonnen wird (keine Plasmide aus *dam*⁻ / *dcm*⁻ Stämmen verwenden). Daher können die Parentalstränge nach beendeter Synthese mit *DpnI*, das selektiv nur methylierte DNA angreift, abgebaut werden. Es bleiben nur die *in vitro* gebildeten Stränge, die die gewünschte Mutation tragen, übrig.

Durchführung:

Für die ortsspezifische Mutagenese wird der “QuikChange–Kit” der Fa. Stratagene verwendet. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde der Aufgabenstellung entsprechend abgewandelt. Der Ansatz wird folgendermaßen pipettiert:

10 x <i>Pfu</i> Puffer	5 µl
Primer (c = 5 pmol/µl)	2,5 µl
Primer_rc (c = 5 pmol/µl)	2,5 µl
dNTP-Mix (jedes Nukleotid c = 2 mM).....	1 µl
Plasmid (c = 1,2 µg/µl)	15 µl
DMSO	5 µl
Turbo <i>Pfu</i> -Polymerase (1 U/µl)	1 µl
dH ₂ O	ad 100 µl

Temperaturprogramm:

Der Ansatz wird im Thermocycler dem in Tabelle 9 angegebenen Temperaturprogramm unterzogen.

Tabelle 9: Temperaturprogramm für das QuikChange-Protokoll

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension
1	95 °C, 6 min	-	-
2 (25x)	95 °C, 1 min	55 °C, 1 min	72 °C, 4 min
3	-	-	72 °C, 8 min

Nach beendeter Reaktion wird der Reaktionsansatz mit 1 µl *DpnI* (1 U/µl) versetzt und 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach werden zur Entfernung von Salzen, die die Transformation negativ beeinflussen könnten, 15 µl des Ansatzes auf einen auf ddH₂O schwimmenden Dialyse-Filter aufgetragen, mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur gegen ddH₂O dialysiert und anschließend der gesamte Ansatz in *E. coli* XL1-Blue transformiert.

3.11.2 ZUFALLSMUTAGENESE DURCH ERROR-PRONE PCR

Prinzip:

Die Error-prone PCR ist eine effektive Methode, Punktmutationen über einen bestimmten DNS-Abschnitt statistisch zu verteilen. Dabei wird die Tatsache ausgenützt, dass die verwendete *Taq*-Polymerase keine „Proofreading“-Aktivität besitzt, was dazu führt, dass mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit „falsche“ Nukleotide eingebaut werden. Durch ein unbalanciertes Verhältnis an Nukleotiden und die Zugabe von Manganchlorid (MnCl₂) wird diese Wahrscheinlichkeit erhöht und so die Mutationsrate eingestellt.

Zur Amplifikation des BAA-Gens werden die Primer BAF und BAR, die direkt oberhalb des Startcodons, bzw. 270 bp unterhalb des Stoppcodons des BAA-Gens (revers komplementär) binden, verwendet. Dies gewährleistet eine gleichmäßige Verteilung der Mutationen über das gesamte Gen und die Konservierung des Startcodons.

Das hier verwendete Protokoll wurde nach Zhao und Mitarbeitern (Zhao *et al.* 1999) der Problemstellung angepasst.

Lösungen

10xMutationspuffer

MgCl ₂ (MW=95,21 g/mol).....	70 mmol/l
KCl (MW=74,56 g/mol).....	500 mmol/l
Tris (pH=8).....	100 mmol/l
Gelatine	0,1 %(m/v)

dNTP⁻Mix

dGTP	2 mmol/l
dATP	2 mmol/l
dCTP	10 mmol/l
dTTP	10 mmol/l

Durchführung

Der Ansatz zur Error-prone PCR wird folgendermaßen pipettiert:

10x Mutationspuffer ohne MnCl ₂	10 µl
dNTP ⁻ Mix	10 µl
MnCl ₂ (5 mmol/l)	3 µl
Primer 1 (c = 50 pmol/µl)	1 µl
Primer 2 (c = 50 pmol/µl)	1 µl
Template (pGBAA-WT) (5-15 ng/µl).....	1 µl
ddH ₂ O.....	74 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)	5 µl

Temperaturprogramm

Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 10 wiedergegeben. Der Programmschritt 2 wird 25 mal durchlaufen.

Tabelle 10: Temperaturprogramm der Error-prone PCR

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension
1	95 °C, 60 s		
2 (25 x)	95 °C, 30 s	50 °C, 30 s	72 °C, 45 s
3			72 °C, 2 min

3.11.3 REKOMBINATION DURCH DNA-SHUFFLING

Prinzip

DNA-Shuffling ist eine Methode um Gene mit ähnlicher Nukleotidsequenz miteinander zu kombinieren, bzw. um chimäre Gene aus einem Pool an Parental-Genen zu erzeugen. Dazu werden aus den Parental-Genen durch DNaseI-Verdau Zufallsfragmente erzeugt, die sich in einer Rekombinations-PCR ohne Primer aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit aneinander lagern können. So entstehen wieder Gene mit voller Länge, die aber Informationen von unterschiedlichen Parental-Genen besitzen.

Basierend auf den Ergebnissen von Stemmer (Stemmer 1994b; Stemmer 1994a) wurde von Abécassis und Mitarbeitern eine Methode entwickelt, welche die Rekombination von Genen mit einer Länge von 1500 bp oder mehr ermöglicht (Abécassis *et al.* 2000). Diese Methode wurde weitestgehend für das DNA-Shuffling des BAA-Gens übernommen und der Problemstellung entsprechend angepasst.

Amplifikation des BAA-Gens und eines Bereichs von je 300 bp oberhalb und unterhalb des Gens

Um ausreichende Mengen an DNA zu erhalten, wird das BAA-Gen sowie die Regionen 300 bp oberhalb des Startcodons und 300 unterhalb der *Pst*I-Schnittstelle (500 bp unterhalb des Stoppcodons) amplifiziert. Hierfür wird ein Standardprotokoll für die PCR und die Primer AmpF und AmpR verwendet.

Plasmid pGBAA-WT (c = 5 ng/μl).....	1-2 μl
10x <i>Taq</i> -Puffer(Qiagen).....	10 μl
MgCl ₂ (25 mmol/l).....	8 μl
10xdNTP-Mix (2 mmol/l jedes dNTP).....	10 μl
Primer AmpF (50 pmol/μl).....	1 μl
Primer AmpR (50 pmol/μl).....	1 μl
ddH ₂ O.....	68 μl

Der Ansatz wird mit 2,5 U *Taq*-Polymerase (Qiagen) versetzt und folgendem PCR-Protokoll unterzogen:

Tabelle 11: Temperaturprogramm der ersten PCR im DNA-Shuffling

Programmschritt	Denaturierung	Anlagerung	Extension
1	95°C, 240 s		
2 (25 x)	95°C, 60 s	55°C, 60 s	72°C, 60 s
3	72°C, 240s		

Das Amplifikationsprodukt wird mit dem WizardTM PCR Preps DNA Purification Kit aufgereinigt und direkt mit DNaseI verdaut.

DNaseI-Verdau

Durch einen partiellen Verdau mit DNaseI wird die Template-DNA in Zufallsfragmente mit einer Länge von 50-500 bp zerschnitten. Der Ansatz wird folgendermaßen pipettiert:

Template-DNA	2-4 µg
Tris-HCl (0,5 mol/l, pH 7,4)	2,5 µl
MnCl ₂ (0,1 mol/l)	2,5 µl
ddH ₂ O.....	ad 50 µl

Der Ansatz wird für 10 min bei 15°C inkubiert und mit 3 bzw. 4 µl DNaseI (0,01 U/µl) versetzt. Nach 5-7 min Inkubation bei 15°C wird der Ansatz sofort über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und Fragmente mit einer Länge von 100-250 bp mit Hilfe des QiaExII-Kits aufgereinigt und in 40 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) eluiert.

Reassembly-PCR (nach Abbécassis)

Die Reassembly-PCR wird nur mit den Fragmenten des DNaseI-Verdaus ohne Primer durchgeführt. Somit werden Rekombinationsprodukte unterschiedlicher Länge erhalten.

Gereinigtes Verdauprodukt	10 µl
10x <i>Taq</i> -Puffer(Qiagen)	4 µl
MgCl ₂ (25 mmol/l)	6 µl
10xdNTP-Mix (2 mmol/l jedes dNTP)	4 µl
ddH ₂ O.....	2 µl

Der Ansatz wird mit 2,5 U *Taq*-Polymerase (Qiagen) versetzt und folgendem PCR-Protokoll unterzogen:

Tabelle 12: Temperaturprogramm der Reassembly-PCR

Programmschritt	Denaturierung	Anlagerung	Extension
1	94°C, 90 s		
2 (35 x)	94°C, 30 s	65°C, 90 s	
		61°C, 90 s	
		57°C, 90 s	
		53°C, 90 s	
		49°C, 90 s	
		45°C, 90 s	
		41°C, 90 s	72°C, 90 s
3			72°C, 350s

Nach Beendigung der PCR können die Rekombinationsprodukte direkt in der Amplifikation eingesetzt werden.

Reassembly-PCR (neues Protokoll)

Die Reassembly-PCR wird ebenfalls nur mit den Fragmenten des DNaseI-Verdaus ohne Primer durchgeführt. Somit werden auch hier Rekombinationsprodukte unterschiedlicher Länge erhalten.

Gereinigtes Verdauprodukt	10 µl
10x <i>Pfu</i> -Puffer (Stratagene)	4 µl
10xdNTP-Mix (2 mmol/l jedes dNTP)	4 µl
ddH ₂ O.....	22 µl

Der Ansatz wird mit 1,25 U *Pfu*-Turbo-Polymerase (Stratagene) versetzt und folgendem PCR-Protokoll unterzogen:

Tabelle 13: Temperaturprogramm der Reassembly-PCR nach neuem Protokoll

Programmschritt	Denaturierung	Anlagerung	Extension
1	95°C, 90 s		
2 (35 x)	95°C, 30 s	60°C, 30 s 55°C, 30 s	72°C, 60 s +5 s/Zyklus
3			72°C, 300s

Nach dem Ende der PCR können die Rekombinationsprodukte direkt in der Amplifikation eingesetzt werden.

Amplifikation des gewünschten Produktes

Die abschließende Amplifikation des BAA-Gens erlaubt eine vereinfachte Isolierung und Klonierung desselben. Hierfür wird ein Standardprotokoll für PCR mit den Primern BAF und BAR, die am Startcodon bzw. 200 bp unterhalb des Stoppcodons des BAA-Gens liegen, verwendet. Die Primer enthalten zur Klonierung eine *NdeI*- bzw. eine *PstI*-Schnittstelle.

Rekombinationsprodukt	1-2 µl
10x <i>Taq</i> -Puffer(Qiagen)	10 µl
MgCl ₂ (25 mmol/l).....	8 µl
10xdNTP-Mix (2 mmol/l jedes dNTP)	10 µl
Primer BAF (50 pmol/µl).....	1 µl
Primer BAR (50 pmol/µl)	1 µl
ddH ₂ O.....	68 µl

Der Ansatz wird mit 2,5 U *Taq*-Polymerase (Qiagen) versetzt und folgendem PCR-Protokoll unterzogen:

Tabelle 14: Temperaturprogramm der abschließenden Amplifikations-PCR

Programmschritt	Denaturierung	Anlagerung	Extension
1	95°C, 240 s		
2 (25 x)	95°C, 60 s	55°C, 60 s	72°C, 60 s
3			72°C, 240s

Das Amplifikationsprodukt wird über den Wizard PCR-Purification Kit (Promega) aufgereinigt, einem *PstI-NdeI*-Verdau unterzogen, über ein präparatives 1%iges Agarosegel isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pGASTON kloniert.

3.12 BIOINFORMATISCHE METHODEN

3.12.1 HOMOLOGIEMODELLING

Prinzip

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Aminosäuresequenzen (primäre Struktur) verschiedener Proteine aufgeklärt und in Datenbanken wie z. B. der SwissProt-Datenbank (ca. 280 000 Einträge) zusammengefasst. Allerdings ist nur von einem Bruchteil dieser Proteine die tertiäre Struktur bekannt. Die meisten der experimentell gefundenen tertiären Strukturen sind in der PDB (ca. 10000 Einträge) gesammelt (Bernstein *et al.* 1977). Diese Diskrepanz ist ein zentrales Problem bei der Planung von Mutationsexperimenten mit Hilfe bioinformatischer Methoden. Deshalb wurden in der Vergangenheit Methoden zur Erzeugung theoretischer Strukturen von Proteinen ausgearbeitet.

Ein Ansatz ist das Homologiemodelling (Peitsch 1995; Peitsch 1996; Peitsch *et al.* 1996; Guex und Peitsch 1997; Peitsch 1997; Peitsch *et al.* 1997). Voraussetzungen sind die Kenntnis der Aminosäuresequenz des zu modellierenden Proteins (Target) und die Kenntnis der tertiären Strukturen möglichst vieler homologer Proteine (Templates). Zudem wird angenommen, dass eine ähnliche primäre Struktur sich in einer ähnlichen tertiären Struktur niederschlägt. Mit Hilfe von Computerprogrammen wird zuerst anhand der Strukturinformationen der Templates ein Modell des Aminosäurerückgrats (Backbone) des Targets errechnet. Sind danach noch Bereiche im Target vorhanden, für die keine Strukturinformationen in den Templates existieren, so werden alle bekannten experimentellen Proteinstrukturen nach Informationen für diese Bereiche durchsucht. Anschließend werden die Seitenketten der Aminosäuren hinzugefügt und die Struktur einer Energieminimierung unterzogen.

Durchführung

Die Aminosäuresequenz der zu modellierenden α -Amylase wird im Ein-Buchstabencode an den SwissModel-Server geschickt. Die erhaltene Struktur wird mit einem geeigneten Programm z. B. SwissPDB-Viewer (Guex und Peitsch 1997) oder VMD (Humphrey *et al.* 1996) visualisiert.

3.12.2 AUSTAUSCH VON AMINOSÄUREN IN EINER VISUALISIERTEN PROTEINSTRUKTUR

Zur Visualisierung und Analyse von Mutanten der BAA gibt es zum einen die Möglichkeit, die Aminosäuresequenz der entsprechenden Mutante an den SwissModel-Server zu senden und die zurückgesendete Struktur zu analysieren. Zum Anderen bietet der SwissPDB-Viewer die Möglichkeit, Aminosäuren am Bildschirm zu mutieren und so die Auswirkungen der Veränderung verfolgen zu können. Mit dem „Mutate“-Tool wird der Aminosäure-Austausch vorgenommen und anschließend die Seitenketten-Konformation der neuen Aminosäure angepaßt (Tools: Fix Selected Sidechains: Exhaustive Search). Durch Minimierung (Tools: Energy minimization) wird ein theoretisches Modell erhalten, auf dessen Basis Struktur-Funktions-Diskussionen geführt werden können.

4 ERGEBNISSE

4.1 EXPRESSIONSSYSTEM: KLONIERUNG VON pGBAA-WT UND EXPRESSION DER BAA IN ESCHERICHIA COLI

Ein effektives Expressionssystem ist eine Voraussetzung für ein erfolgreiches Proteindesign mittels gerichteter Evolution, da das Zielenzym in ausreichenden Mengen und in hoher Aktivität produziert werden muss. Zudem wäre es wünschenswert, das Zielenzym in den Kulturüberstand zu sekretieren, um aufwändige Aufschlussprozeduren zu vermeiden. Dies wäre auch im Hinblick auf ein Screening bei unterschiedlichen pH-Werten wünschenswert, da so die Verwendung von Lysepuffern, die das Puffersystem während des Screenings stören würden, umgangen werden könnten.

4.1.1 KLONIERUNG VON pGBAA-WT

Das Gen der α -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA) lag bereits kloniert im Plasmid pCYTBAA-WT vor, das die Expression unter der Kontrolle des temperaturinduzierbaren λ -Promotors ermöglicht. Zudem wurden in einer vorangegangenen Arbeit zwei Mutanten, BAA S201N und BAA N297D, durch ortsspezifische Mutagenese des Wildtypgens der BAA erzeugt (Bessler 1999). Da sich jedoch herausstellte, dass die Mengen an exprimierter Amylase für ein gerichtetes Proteindesign zu gering waren, sollten die Gene der BAA und ihrer rationalen Mutanten S201N und N297D unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors exprimiert werden. Hierzu wurde das Plasmid pGASTON verwendet (Henke 2001). Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 10 dargestellt.

Durch einen kombinierten *NdeI-PstI*-Verdau wurde das BAA-Gen aus dem entsprechenden Plasmid (pCYTBAA-WT oder entsprechender Mutante) ausgeschnitten und mittels präparativer Agarosegelelektrophorese und Gelelution isoliert (1,8 kb-Fragment). Das Plasmid pGASTON wurde der gleichen Prozedur unterzogen, dephosphoryliert und der Vektor als 3 kb-Fragment isoliert. Anschließend wurden die 1,8 kb-Inserts in den dephosphorylierten Vektor ligiert und die so erhaltenen Plasmide pGBAA-WT bzw. pGBAA-S201N und pGBAA-N297D in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Plasmide der Transformanden wurden isoliert und durch Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung auf Richtigkeit geprüft.

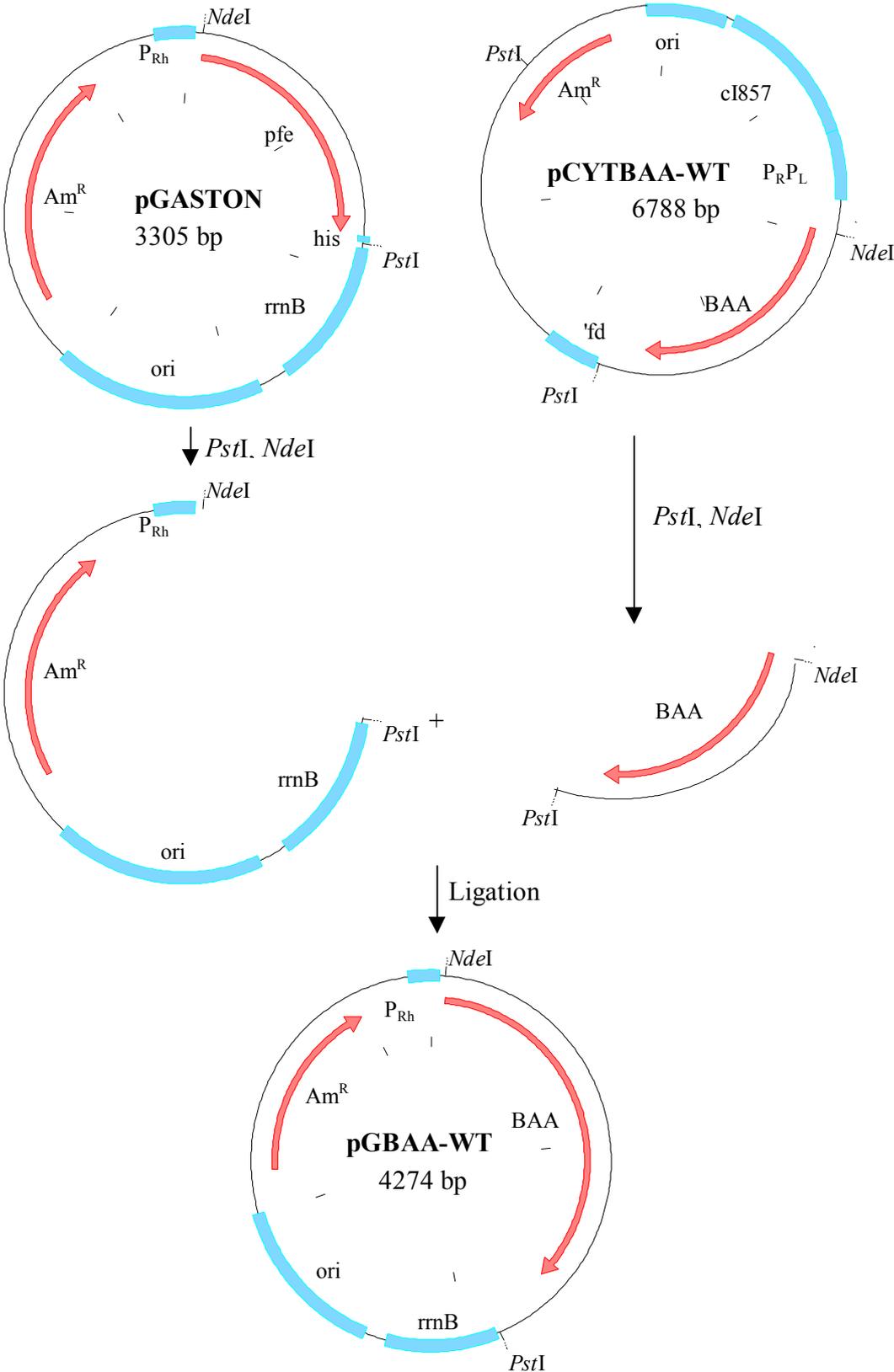


Abbildung 10: Klonierungsstrategie zur Erzeugung des Vektors pGBAA-WT

4.1.2 EXPRESSION VON BAA IN *E. COLI* BZW. IN *E. COLI* (pJL3)

Durch Vergleich der Expression der BAA unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors bzw. des λ -Promotors sollte das bessere Expressionssystem gefunden werden. Durch die Koexpression des Bacteriocin Release Proteins (BRP), dessen Gen auf dem Plasmid pJL3 lokalisiert ist, sollte untersucht werden, ob eine Sekretion der BAA in das Medium möglich ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine BRP-Koexpression außerdem zu einem verbesserten Faltungsverhalten im Periplasma führt, und so der Anteil an aktivem Enzym gesteigert werden kann (van der Wal *et al.* 1995c). Vorversuche mit pCYTBAA-WT und pJL3 zeigten, dass diese beiden Plasmide zueinander inkompatibel sind, da die BRP-Koexpression zu keiner Aktivitätssteigerung im Überstand oder im Periplasma führte.

50 ml-Expressionskulturen von *E. coli* DH5 α (pCYTBAA-WT), *E. coli* DH5 α (pGBAA-WT), *E. coli* XL1-Blue (pGBAA-WT) und *E. coli* XL1-Blue (pGBAA-WT, pJL3) wurden nach Protokoll kultiviert und die Expression der BAA entsprechend induziert. Je eine nicht induzierte 50 ml-Kultur diente als Kontrolle. Im Falle der *E. coli* XL1-Blue (pGBAA-WT, pJL3) Kultur wurde zwei Stunden nach der BAA-Induktion die BRP-Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 20 μ M) induziert. Die Zellen wurden nach dreistündiger Induktion vom Kulturüberstand getrennt, die Periplasmafraktion isoliert und die Amylaseaktivitätskonzentration in der Periplasmafraktion sowie im Kulturüberstand mit Hilfe des Phadebas[®]-Tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 wiedergegeben.

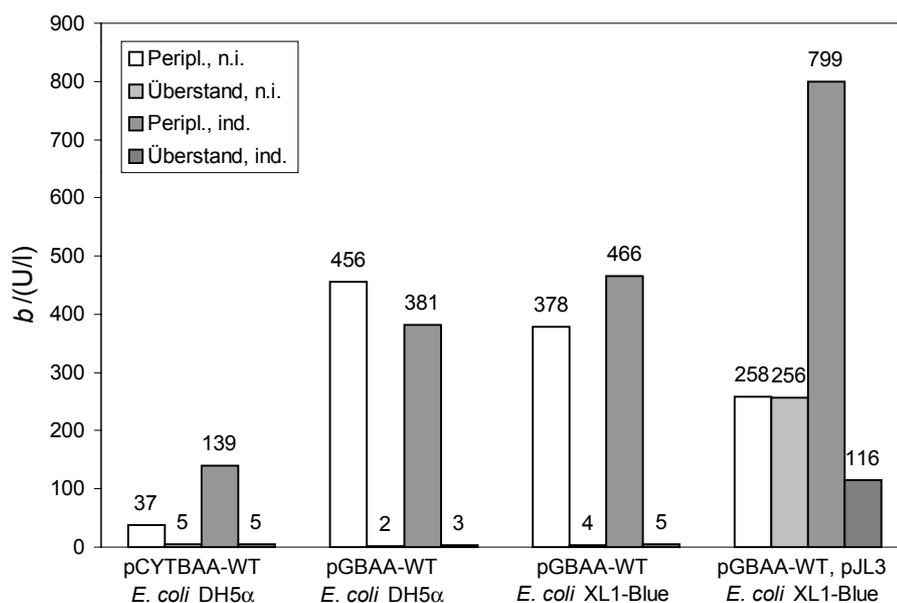


Abbildung 11: Vergleich der Expressionssysteme. Es wurden die Periplasmafraktionen und Kulturüberstände von nicht induzierten (n.i.) und induzierten (ind.) Kulturen untersucht.

Die Expressionsexperimente zeigen, dass die α -Amylaseaktivitätskonzentration im Periplasma nach Expression durch pGBAA-WT in *E. coli* DH5 α mit 381 U/l etwa doppelt so hoch ist, wie nach Expression durch pCYTBAA-WT (139 U/l) im gleichen Stamm. Die BAA-Expression durch pGBAA-WT in *E. coli* XL1-Blue ist mit den Werten von *E. coli* DH5 α vergleichbar. Allerdings ist zu beobachten, dass das BAA-Protein durch pGBAA-WT auch ohne induzierendes Agens gebildet wird, was heißt, dass der Rhamnose-Promotor in diesem Fall nicht dicht ist. So wird im Falle der nichtinduzierten *E. coli* DH5 α (pGBAA-WT)-Kulturen eine Aktivitätskonzentration von 456 U/l und im Falle der nichtinduzierten *E. coli* XL1-Blue (pGBAA-WT)-Kulturen eine Aktivitätskonzentration von 388 U/l in den Periplasmafraktionen gemessen.

Die Koexpression von BRP (durch pJL3) bei *E. coli* XL1-Blue (pGBAA-WT, pJL3)-Transformanden führt wie erwartet zu einer deutlichen Aktivitätskonzentration im Überstand und zu einer Aktivitätskonzentrationssteigerung in der Periplasmafraktion.

Die Expression der BAA in *E. coli* XL1-Blue (pJL3, pGBAA-WT) erzeugte die höchsten Aktivitätskonzentrationen und wurde deshalb als Expressionssystem gewählt. Die deutliche Basalexpression von BAA in diesem System sollte kein Problem für den Einsatz in einem Hochdurchsatz-Screening (HTS) darstellen.

4.2 SCREENINGSYSTEM

Das Screeningsystem stellt einen zentralen Baustein für die gerichtete Evolution dar. Da hier gute von schlechten Klonen getrennt werden, muss besonderes Augenmerk auf der Etablierung eines zuverlässigen, reproduzierbaren Screeningsystems liegen. Entscheidend ist, dass mit diesem Screeningsystem auch kleine Aktivitätskonzentrationen bzw. geringe Aktivitätskonzentrationsänderungen messbar sind.

4.2.1 ASSAYS ZUR BESTIMMUNG DER α -AMYLASEAKTIVITÄT IM MIKROMAßSTAB

Zuerst sollte durch den Vergleich des DNS-Assays mit dem Phadebas[®]-Assays herausgefunden werden, welches der beiden Testsysteme sich besser für einen Einsatz in einem Hochdurchsatzscreening eignet. Wichtige Parameter waren ein geringer Fehler, bzw. eine geringe Standardabweichung und eine feine Auflösung der Aktivitätskonzentration bzw.

eine hohe Empfindlichkeit des Assays, um auch kleine Aktivitätskonzentrationsänderungen detektieren zu können.

Messung der α -Amylaseaktivität mittels Dinitrosalicylsäure-Assay

Für den Dinitrosalicylsäure-Assay (DNS-Assay) wurde zuerst eine Maltose-Kalibriergerade nach Vorschrift erstellt (Daten nicht aufgeführt) und daraus der Zusammenhang zwischen der Absorption bei $\lambda=540$ nm ($A(540)$) und der Aktivitätskonzentration b in U/l bestimmt:

$$b = 1000 \times \frac{(A(540) + 0,0102)}{0,0481 \times 15} \text{ U/l} = 1386 \times (A(540) + 0,0102) \text{ U/l}$$

Der DNS-Assay wurde nach Vorschrift mit einer Verdünnungsreihe einer Periplasmafraktion von *E. coli* (pGBAA-WT) (1552 U/l, 776 U/l, 519 U/l, 314 U/l, 160 U/l, 82 U/l, 36 U/l, 21 U/l und 0 U/l) durchgeführt und $A(540)$ der Proben bestimmt. Der Bereich mit einem linearen Zusammenhang ($R^2 \geq 0,99$) zwischen Aktivitätskonzentration und Absorption liegt zwischen 0 und 520 U/l und ist in Abbildung 12 dargestellt.

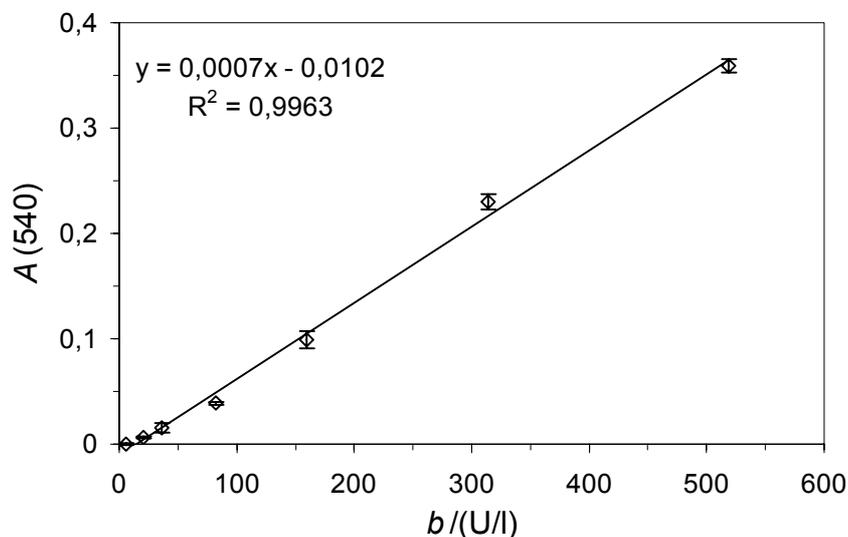


Abbildung 12: DNS-Assay bei 37 °C. Dargestellt ist der lineare Bereich; 0-520 U/l bzw. 0-0,36 Absorptionseinheiten.

Bestimmung der α -Amylaseaktivität mittels Phadebas[®]-Assay

Der Phadebas-Assay wurde nach Vorschrift mit einer Verdünnungsreihe einer Periplasmafraktion von *E. coli* (pGBAA-WT) (1552 U/l, 776 U/l, 519 U/l, 314 U/l, 160 U/l, 82 U/l, 36 U/l, 21 U/l, 13 U/l und 0 U/l) durchgeführt. Abbildung 13 zeigt den linearen

Bereich des Phadebas[®]-Assays, der sich von 0-720 U/l bzw. 0-1,1 Absorptionseinheiten erstreckt.

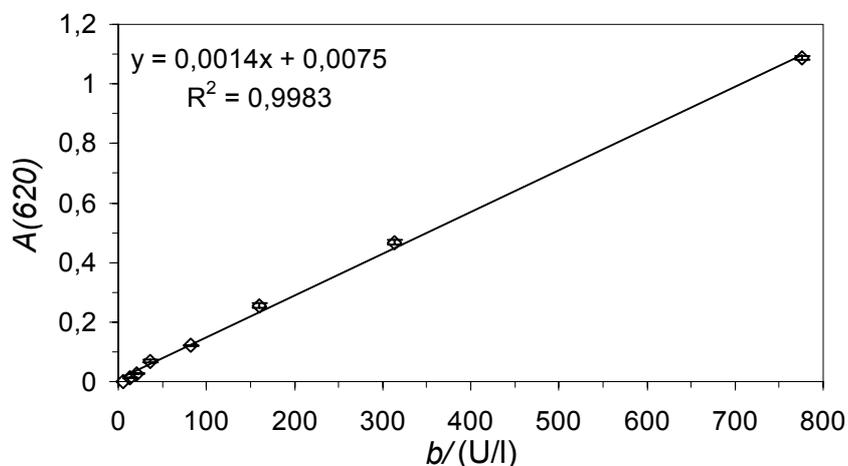


Abbildung 13: Der Phadebas[®]-Assay bei 37 °C. Dargestellt ist der lineare Bereich; 0-780 U/l bzw. 0-1,1 Absorptionseinheiten.

Vergleich des DNS-Assays mit dem Phadebas[®]-Assay

In Tabelle 15 sind die Eckdaten der linearen Bereiche des DNS-Assays und des Phadebas[®]-Assays zusammengefasst. Die Empfindlichkeit des jeweiligen Testsystems wird durch die apparative Auflösung des UV/VIS-Spektrometers von 0,001 Absorptionseinheiten determiniert und wird als Quotient aus maximaler Aktivitätskonzentration im linearen Bereich und maximaler Absorption im linearen Bereich berechnet und auf 0,001 Absorptionseinheiten bezogen. Die Empfindlichkeit für den DNS-Assay beträgt 1,4 U/l, für den Phadebas[®]-Assay beträgt sie 0,7 U/l. Der maximale Fehler der Assays unterscheidet sich mit 4% nicht, wohl aber die Standardabweichung, die für den DNS-Assay 1% und den Phadebas[®]-Assay 2% beträgt.

Tabelle 15: Vergleich des DNS-Assays mit dem Phadebas[®]-Assay

	DNS-Assay	Phadebas [®] -Assay
Linearer Absorptionsbereich	0-0,36	0-1,1
Linearer Aktivitätskonzentrationsbereich	0-520 U/l	0-780 U/l
Empfindlichkeit	1,4 U/l	0,7 U/l
Maximaler Fehler	4%	4%
Maximale Standardabweichung	1%	2%

Da die Empfindlichkeit des DNS-Assays mit 1,4 U/l um den Faktor 2 geringer ist als die des Phadebas[®]-Assays, die Standardabweichungen sich jedoch nur um 1% unterscheiden, wurde der Phadebas[®]-Assay für einen Einsatz im Mikrotiterplattenmaßstab gewählt.

4.2.2 VALIDIERUNG DES PHADEBAS[®]-ASSAYS IN MIKROTITERPLATTEN

In einem ersten Schritt wurde der lineare Bereich des Phadebas[®]-Assays im Mikrotiterplattenmaßstab bestimmt, indem er mit einer Verdünnungsreihe einer kommerziellen Zubereitung der BAA (BAN) durchgeführt wurde. Die Validierung wurde als Achtfachbestimmung ausgelegt, wobei in einer Reihe von 8 benachbarten Wells die gleiche Aktivitätskonzentration eingesetzt wurde. Durch dieses Vorgehen sollte das Auftreten von Ringeffekten, also die Variation der Messwerte zwischen äußeren und inneren Wells aufgrund ungleichmäßiger Evaporation erkannt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 wiedergegeben.

Die Standardabweichung liegt zwischen 0,003 und 0,073, der mittlere absolute Fehler zwischen 0,004 und 0,091, was den mittleren relativen Fehlern von 11,8% bis 1,7% entspricht. Eine systematische Variation zwischen außen liegenden und inneren Wells konnte nicht festgestellt werden, was bedeutet, dass kein messbarer Ringeffekt vorliegt (Daten nicht aufgeführt).

Tabelle 16: Verdünnungsreihe zur Validierung des Phadebas[®]-Assays in der Mikrotiterplatte und Bestimmung des linearen Bereichs. Für die korrigierte mittlere Absorption (620 nm) wurde der Hintergrund von 0,173 Absorptionseinheiten abgezogen.

$b/(U/l)$	Korr. Mittlere $A(620)$	Standardabweichung	Mittlerer Fehler	Mittlerer Rel. Fehler (%)
0	0,000	0,008	0,012	6,8
8	0,012	0,013	0,022	11,8
19	0,020	0,008	0,014	7,3
49	0,055	0,004	0,006	2,8
91	0,082	0,003	0,004	1,7
195	0,178	0,013	0,022	6,3
403	0,392	0,013	0,022	3,8
605	0,604	0,014	0,021	2,7
1021	1,007	0,056	0,091	7,7
2064	1,860	0,073	0,073	3,6
4141	2,218	0,055	0,088	3,7
6207	2,286	0,050	0,048	2,0

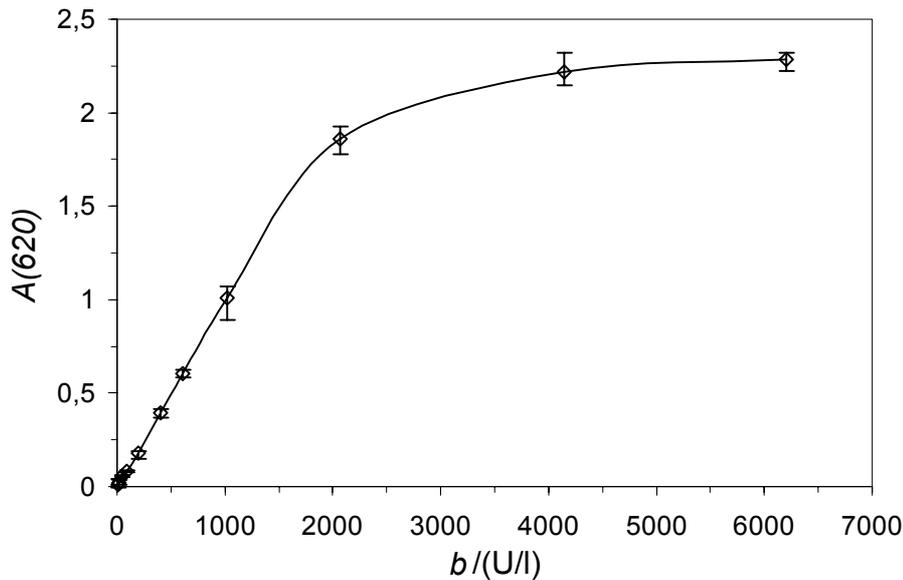


Abbildung 14: Kalibrierkurve des Phadebas[®]-Assays in Mikrotiterplatten.

In Abbildung 14 sind die gemessenen Absorptionswerte über die Aktivitätskonzentrationswerte aufgetragen.

Aus Abbildung 14 ist ersichtlich, dass sich die Aktivitätskonzentrationskurve im Wertebereich von 0-1000 U/l linear verhält, sie bei höheren Aktivitätskonzentrationen abflacht und in den Sättigungsbereich übergeht. Der lineare Bereich des Phadbeas[®]-Assays liegt demnach zwischen 0-1 Absorptionseinheiten bzw. zwischen einer Aktivitätskonzentration von 0 U/l und 1000 U/l und ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Messpunkte liegen dabei mit sehr hoher Genauigkeit auf einer Geraden mit der Formel:

$$A(620) = 9,883 \times 10^{-4} \times b - 0,0013$$

wobei $A(620)$ die Absorption bei 620 nm und b die Aktivitätskonzentration in U/l ist.

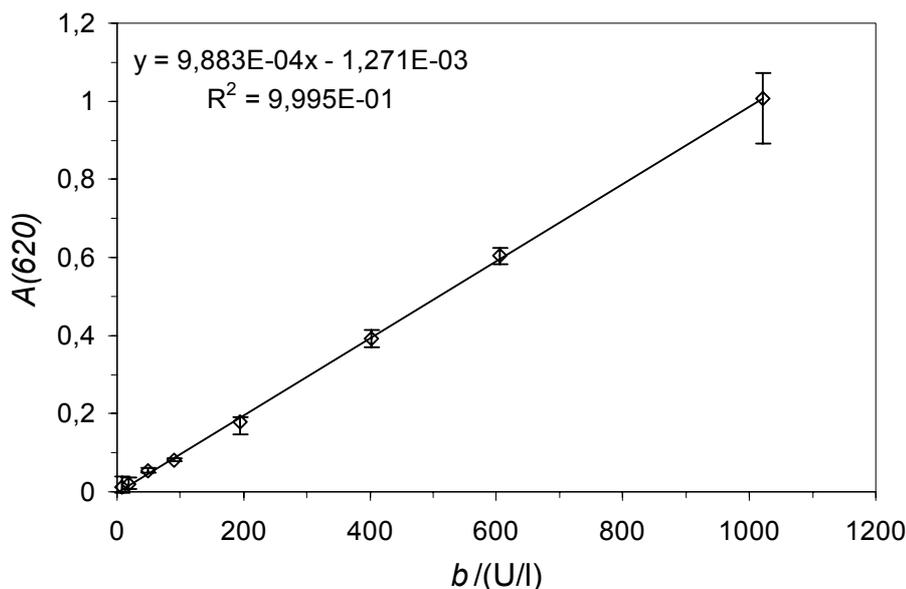


Abbildung 15: Linearer Bereich des Phadebas[®]-Assays in Mikrotiterplatten.

4.2.3 BESTIMMUNG DES WERTEBEREICHS FÜR DEN BAA-WILDTYP

4.2.3.1 ZIELSETZUNG

Die Aktivität einer für ein Screening eingesetzten Enzymlösung, die aus einer *E. coli*-Expressionskultur gewonnen wird, ist von der Menge des darin enthaltenen aktiven Enzyms und dessen spezifischer Aktivität abhängig. In der Praxis zeigt das hier verwendete Expressionssystem pGBAA-WT eine Variation der Expressionsmenge von 20% in Schüttelkulturen (Daten nicht aufgeführt). Dies würde bei einem Screening auf BAA-Aktivität bei pH 10 zu einem breiten Bereich an Datenpunkten führen, in dem es schwierig wäre positive Klone, also Klone mit einer gegenüber dem Wildtyp verbesserten Aktivität bei pH 10, zu finden. Es war deshalb notwendig, zusätzlich auf eine bekannte Größe zu testen, welche in diesem Fall die Aktivität bei pH 7 war. Mit dieser Doppelbestimmung kann auch bei stark variierender Expressionsrate der Bereich, der von Wildtyp oder wildtypähnlichen Klonen abgedeckt wird, eingegrenzt werden. Des weiteren sollte auch der Wertebereich, den amylaseinaktive Klone abdecken, bestimmt werden, um so ein Maß für das Hintergrundrauschen zu erhalten.

4.2.3.2 DURCHFÜHRUNG

Zur Bestimmung des Hintergrundrauschens wurde die α -Amylaseaktivität von pGASTON-Tansformanten, die anstelle des BAA-Gens ein Esterasegen besitzen und somit

keine α -Amylaseaktivität aufweisen, bestimmt. Dazu wurden 96 *E. coli* XL1-Blue (pGASTON, pJL3)-Transformanten in einer 96-well Mikrotiterplatte kultiviert, mit Rhamnose (Endkonzentration 0,2%) und 5 μ M IPTG induziert, nach Protokoll aufgeschlossen und auf α -Amylaseaktivität mit dem Phadebas[®]-Assay für Mikrotiterplatten bei pH 7 und pH 10 untersucht.

Der erhaltene Wertebereich ist in Abbildung 16 wiedergegeben. Der Bereich des Hintergrundes erstreckt sich nach Abzug des systematischen Hintergrundes, der durch Absorption durch den Assaypuffer und die Enzymlösung erzeugt wird, sowohl für den Assay bei pH 7 als auch bei pH 10 von 0 bis 0,15 Absorptionseinheiten.

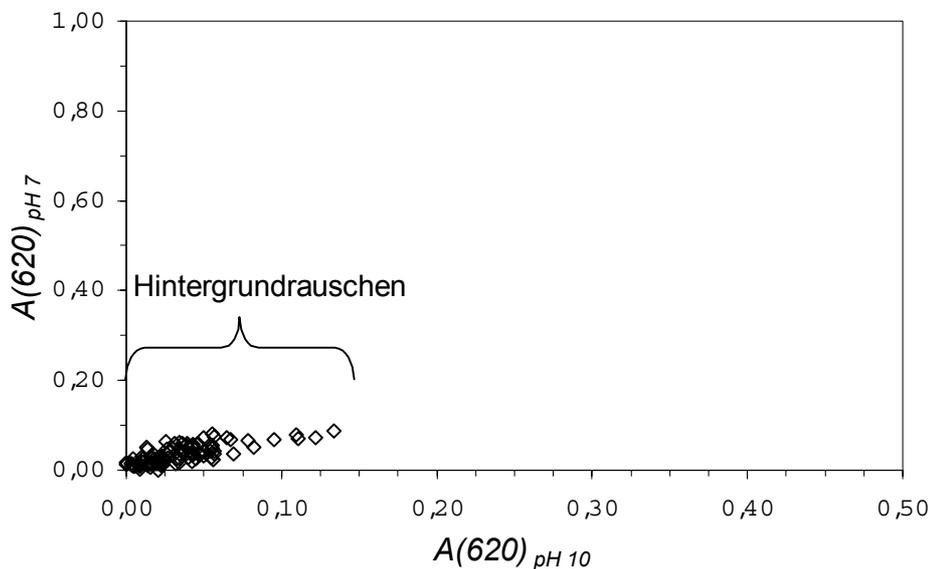


Abbildung 16: Schaubild zur Bestimmung des Hintergrundrauschens des Phadebas[®]-Assays in Mikrotiterplatten unter Verwendung von α -Amylase-negativen pGASTON-Transformanten. Die Absorption wurde standardmässig bei einer Wellenlänge von $\lambda=620$ nm gemessen.

Weitere Experimente ergaben, dass sich dieser Bereich durch die Verwendung von direkt vor dem Versuch zubereiteter Substratlösung auf 0 bis 0,1 eingrenzen lässt.

In einem zweiten Ansatz wurde die α -Amylaseaktivität von 96 verschiedenen *E. coli* XL1-Blue (pGBAA-WT, pJL3)-Transformanten bei pH 7 und pH 10 bestimmt. Die jeweiligen Absorptionswerte wurden in Abbildung 17 gegeneinander aufgetragen.

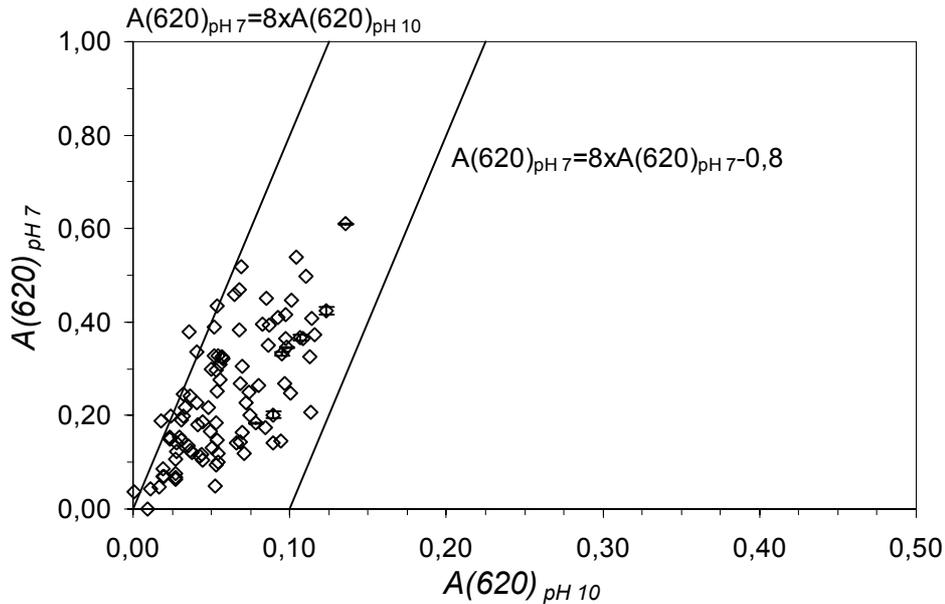


Abbildung 17: Bestimmung der α -Amylaseaktivität von pGBAA-WT-Transformanten mit dem Phadebas[®]-Assay bei pH 7 und pH 10. Die Messpunkte liegen im Bereich zwischen zwei parallelen Geraden mit der Steigung 8 (s. Text). Die Absorption wurde standardmässig bei einer Wellenlänge von $\lambda=620$ nm gemessen.

Da die BAA bei pH 10 etwa 10% der Aktivität bei pH 7 besitzt, war zu erwarten, dass Klone, die das native BAA-Gen exprimieren, entlang einer Ursprungsgeraden mit der Steigung 10 liegen ($A(620)_{pH 7} = 10 \times A(620)_{pH 10}$). Unter Beachtung des Hintergrundrauschens von 0,1 Absorptionseinheiten ergibt sich daraus ein Bereich zwischen der Ursprungsgeraden mit der Steigung von 10 und einer Parallelen im Abstand des Hintergrundrauschens von 0,1 Absorptionseinheiten ($A(620)_{pH 7} = 10 \times A(620)_{pH 10} - 0,1$), in dem Messpunkte des Wildtyps auftreten sollten.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich ist, liegen die Messpunkte tatsächlich in einem Bereich zwischen zwei Parallelen. Der Bereich wird allerdings von den Geraden $A(620)_{pH 7} = 8 \times A(620)_{pH 10}$ bzw. $A(620)_{pH 7} = 8 \times A(620)_{pH 10} - 0,8$ begrenzt, was einer Restaktivität von 12,5% bei pH 10 entspricht. Dieser Bereich wurde als Wildtypbereich definiert.

Somit ergab sich die Möglichkeit, durch Mutagenese veränderte Varianten der BAA aufgrund ihrer Lage im Diagramm beurteilen zu können. Varianten, die eine dem Wildtyp ähnliche Aktivität bei pH 7 und pH 10 besitzen, sollten sich in dem Bereich zwischen den beiden Parallelen befinden. Varianten mit einer gegenüber dem Wildtyp verbesserten Alkaliaktivität sollten sich im Diagramm rechts des Wildtypbereichs, also bei höherer Aktivität bei pH 10, befinden. Gleiches gilt auch für Varianten, die eine gegenüber dem

Wildtyp verbesserte Aktivität bei pH 7 besitzen, die folglich im Diagramm links des Wildtypbereichs liegen würden.

4.3 IDENTIFIKATION INTERESSANTER STELLEN ZUR MUTAGENESE

Aus der Literatur sind alkaliaktive α -Amylasen bekannt, die eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit von 60% und mehr zur BAA besitzen. Dazu gehören die α -Amylasen aus *Bacillus* sp. Stamm KSM-1378 (LAMY) (Igarashi *et al.* 1998a), aus *Bacillus* sp. Stamm TS-23 (TS-23) (Lin *et al.* 1998) und *Bacillus* sp. Stamm #707 (S707) (Tsukamoto *et al.* 1988).

Durch den Vergleich der Eigenschaften, Aminosäuresequenzen und Strukturen der nicht-alkaliaktiven BAA mit alkaliaktiven α -Amylasen sollte es möglich sein, Stellen zu identifizieren, die für die Alkaliaktivität verantwortlich sein könnten.

4.3.1 PI-VERGLEICH DER BAA MIT ALKALIAKTIVEN α -AMYLASEN

In Tabelle 17 sind die pH-Optima sowie die experimentell ermittelten und theoretischen pI-Werte der BAA, der BLA (Vihinen und Mantsala 1989) und der alkaliaktiven α -Amylasen LAMY (Igarashi *et al.* 1998a), S707 (Tsukamoto *et al.* 1988) und TS-23 (Lin *et al.* 1998) angegeben.

Der Vergleich zeigt einen eindeutigen Zusammenhang zwischen pH-Optimum und theoretischem pI-Wert. Je höher das pH-Optimum, desto höher der theoretische pI. Dies lässt den Schluss zu, dass bei alkaliaktiven α -Amylasen negativ geladene Aminosäuren selektiv durch neutrale oder positiv geladene Aminosäuren ersetzt sind. Die Betrachtung der Aminosäurezusammensetzung zeigt, dass dies tatsächlich der Fall ist (Tabelle 18).

Tabelle 17: Vergleich von pH-Optimum und pI-Werten der BAA und anderen α -Amylasen aus *Bacillus*.

α -Amylase	pH-Optimum	pI (experimentell)	pI (theoretisch)
BAA	6,0	5,2	5,3
BLA	7,5	6,5	6,05
LAMY	8,0-9,0	~9,0	6,31
S707	8,5	-	6,4
TS-23	9,0	4,2	6,3

Tabelle 18: Aminosäurezusammensetzung der α -Amylasen BAA, BLA, TS-23, LAMY und S707 im Vergleich. Es wurden nur die reifen α -Amylasen betrachtet, Signalpeptide wurden nicht berücksichtigt.

Stamm	AS	Positive AS	Negative AS	Neg-Pos	Σ geladene AS
BAA	483	50 (10,4%)	67 (13,9%)	17 (3,5%)	117 (24,2%)
BLA	481	50 (10,4%)	62 (12,9%)	12 (2,5%)	112 (23,3%)
LAMY	486	45 (9,3%)	52 (10,7%)	7 (1,4%)	97 (20,0%)
S707	485	47 (9,7%)	53 (10,9%)	6 (1,2%)	100 (20,6%)
TS-23	583	55 (9,4%)	60 (10,3%)	5 (0,9%)	115 (19,7%)

Der Anteil an geladenen Aminosäuren nimmt von der BAA zu den alkaliaktiven α -Amylasen hin kontinuierlich von 24,2% auf 19,7% (TS-23) ab. Zudem ist die Differenz zwischen negativ und positiv geladenen Aminosäuren bei alkaliaktiven α -Amylasen mit 5-7 Aminosäuren (0,9-1,4%) niedriger als bei der BAA mit 17, was einem prozentualen Anteil von 3,5% entspricht.

Alkaliaktive α -Amylasen besitzen somit nicht nur weniger geladene Aminosäuren, ihre Ladung ist vielmehr aufgrund der geringeren Differenz zwischen negativ und positiv geladenen Aminosäuren geringer als bei den nicht-alkaliaktiven α -Amylasen BAA und BLA.

4.3.2 SEQUENZVERGLEICH DER BAA MIT ALKALIAKTIVEN α -AMYLASEN

Die alkaliaktiven α -Amylasen LAMY, TS-23 und S707 besitzen eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit von 76-79% zur BAA, sind aber untereinander mit 79-82% sehr nahe verwandt. Durch Aminosäuresequenz-Vergleich sollte es demnach möglich sein, Aminosäuren zu finden, die in den alkaliaktiven α -Amylasen konserviert, in der BAA jedoch ausgetauscht sind. Um die Anzahl dieser Aminosäuren zu reduzieren, sollten durch den Vergleich mit der Aminosäuresequenz der BLA Aminosäuren gefunden werden, die in den alkaliaktiven α -Amylasen und in der BLA konserviert sind. Diese sind vermutlich nicht für eine verbesserte Alkaliaktivität verantwortlich, da die BLA keine alkaliaktive α -Amylase ist. Das hierfür angefertigte Aminosäuresequenz-Alignment ist in (6.5) dargestellt. Abbildung 18 zeigt einen Ausschnitt, wobei konservierte Bereiche grau unterlegt sind.

		400		410		420	
BAA	VFYGDMYGT	TKGTSPKEI	P	SLKDNIE	P	IILKA	421
BLA	VFYGDMYGT	TKGDSQREI	P	ALKHKIE	P	IILKA	419
LAMY	VFYGDYYGI	P---	THGVPS	MKSKID	PLLQA		423
S707	VFYGDYYGI	P---	THGVPA	MRSKID	P	ILEA	425
TS-23	VFYGDYYGI	P---	KYNI	PGLKSK	ID	PLLIA	421
Consensus	*****Y**	IP	---	I*SLKSK*	D*I*	*	

Abbildung 18: Aminosäuresequenz-Vergleich verschiedener α -Amylasen (Ausschnitt). Konservierte Regionen sind grau unterlegt.

Das Alignment zeigt neben konservierten Regionen auch Sequenzbereiche, die eine hohe Sequenzdiversität besitzen. Für die Alkaliaktivität bedeutsame Bereiche sollten sich durch eine hohe Ähnlichkeit der alkaliaktiven α -Amylasen untereinander und einer niedrigen Sequenzähnlichkeit zwischen alkaliaktiven α -Amylasen auf der einen und den nicht-alkaliaktiven α -Amylasen (BAA und BLA) auf der anderen Seite auszeichnen.

Aus Abbildung 18 ist zu ersehen, dass im gezeigten Bereich die Aminosäuren G402-S404 (bezogen auf die BAA-Sequenz mit Signalsequenz) in den Sequenzen der alkaliaktiven α -Amylasen nicht vorhanden sind. Vermutlich spielt dieser Bereich eine wichtige Rolle für die Alkaliaktivität. Desweiteren gibt es fünf AS, die in den alkaliaktiven α -Amylasen konserviert, in der BAA und der BLA aber nicht konserviert sind, nämlich M397 (Y), T400 (I), K401 (P), D412 (S) und E415(D).

4.3.3 STRUKTURVERGLEICH VON BAA MIT ALKALIAKTIVEN α -AMYLASEN

Die hohe Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit der α -Amylasen untereinander erlaubt ein Homologiemodelling mit der Kristallstruktur der BLA als Template. Die Aminosäuresequenzen wurden an den SwissModel-Server geschickt und die erhaltenen Modelle im SwissPDB-Viewer visualisiert. Abbildung 19 zeigt eine Superimposition der Strukturen der BAA und LAMY, wobei strukturell unterschiedliche Bereiche rot markiert sind. Die Strukturen unterscheiden sich in zwei Bereichen: Ile200-Ala212 und Met397-Pro409 (bezogen auf die BAA-Sequenz mit Signalsequenz). Hierbei beinhaltet der 2. Bereich die in 4.3.2 identifizierte Deletion der Aminosäuren G402-S404.

Der Bereich Ile200-Ala212 wurde in anderen Arbeiten untersucht. Er scheint eine geringe Auswirkung auf die Alkaliaktivität zu haben (Fünfzig 2001). Die Deletion von zwei

Aminosäuren in dieser Region erhöht jedoch die Thermostabilität der BAA (Conrad *et al.* 1995) und auch der LAMY (Igarashi *et al.* 1998b).

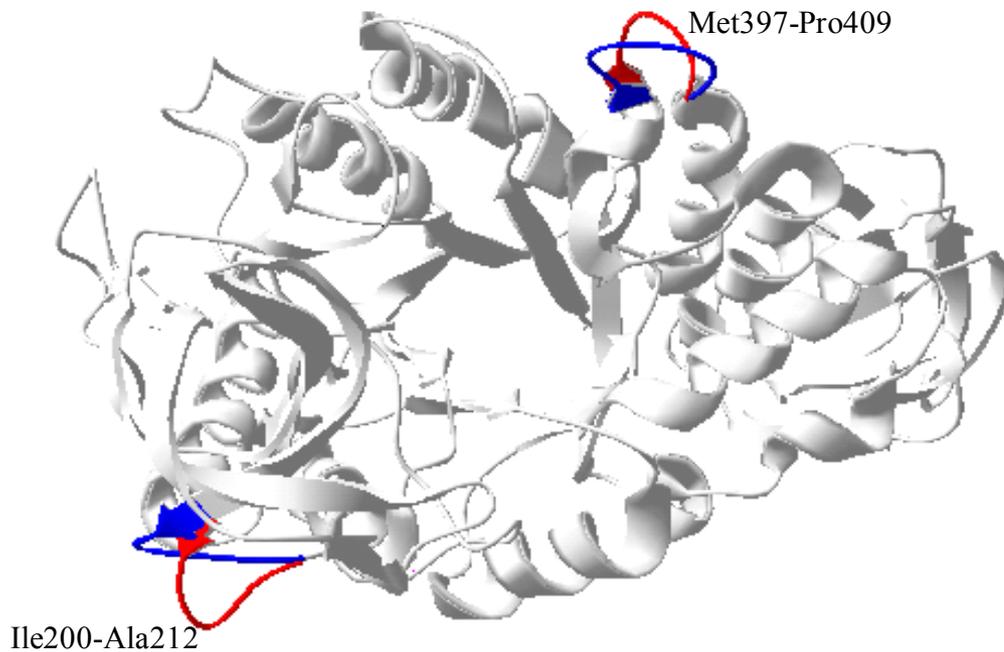


Abbildung 19: Strukturvergleich von BAA und LAMY. Die übereinander gelegten Strukturen unterscheiden sich in den Bereichen Ile200-Ala212 und Met397-Pro409. Die Struktur der BAA ist blau, die Struktur der LAMY rot markiert.

4.3.4 ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE

Nachdem für den Bereich Met397-Pro409 sowohl Sequenz- als auch Strukturdaten darauf hindeuten, dass dieser für eine verbesserte Alkaliaktivität verantwortlich sein könnte, sollte dieser durch ortsspezifische Mutagenese verändert werden. In einer ersten Runde wurden die für die drei Aminosäuren G402-S404 kodierenden Nukleotide mittels ortsspezifischer Mutagenese aus dem Plasmid pGBAA-WT deletiert und so das Plasmid pGBAA- Δ erhalten. Die Richtigkeit der Deletion wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Das Plasmid pGBAA- Δ wurde in *E. coli* XL1-Blue (pJL3) transformiert, induziert und auf Stärkeagar ausplattiert. Klone, die das verkürzte Gen trugen, zeigten auf Stärkeagarplatten keine α -Amylaseaktivität.

In einer zweiten Runde wurden im Plasmid pGBAA- Δ zusätzlich die Codons der Aminosäuren K401 und P405 mittels ortsspezifischer Mutagenese gegen ein Codon für P und Codon 405 mittels degenerierter Primer durch alle mögliche Codons ersetzt. Das daraus resultierende Plasmid pGBAA- Δ KPPX wurde mittels Sequenzierung auf das Vorhandensein

der Mutationen überprüft. Allerdings zeigten Klone von pGBAA- Δ KPPX ebenfalls keine α -Amylaseaktivität auf Stärkeagarplatten.

In einer dritten Runde wurden bei den Plasmiden pGBAA- Δ und pGBAA- Δ KPPX in einem Ansatz die Codons für T400, K406 und E407 gegen Codons für I, H und N ausgetauscht. In einem zweiten Ansatz wurden anstelle der Codons für T400, K406 und E407 mittels degenerierter Primer alle möglichen Codons eingeführt. In keinem der beiden Ansätze wurden α -Amylase-aktive Klone gefunden.

4.4 ERROR-PRONE BIBLIOTHEK DER 1. GENERATION

4.4.1 EINSTELLUNG DER MUTATIONSRATE

Aus der Literatur (Cadwell und Joyce 1994; Rellos und Scopes 1994) ist bekannt, dass ein bestimmter Prozentsatz an Mutationen zur Inaktivierung des zu mutierenden Enzyms führt. Somit kann der Anteil an inaktiven Klonen an der Gesamtheit, also die Inaktivierungsrate, als Maß für die Mutationshäufigkeit (Mutationsrate) betrachtet werden. In der Literatur wird für ein Gen der Länge 1000 bp eine Inaktivierungsrate von 30% empfohlen (Zhao *et al.* 1999), um so im Durchschnitt eine Mutationsrate von einer Mutation pro 1000 bp zu erhalten. Die Mutationsrate sollte im Fall der BAA bei einer Mutation pro Gen, also etwa bei einer Mutation pro 1500 bp liegen. Hierbei wurde angenommen, dass dies bei einer Inaktivierungsrate von 30% gegeben ist.

Um die Mutationsrate für die BAA einzustellen, wurde die Error-prone PCR mit MnCl₂-Stammlösungen verschiedener Konzentrationen und dem BAA-Gen als Template (pGBAA-WT) durchgeführt. Das Produkt wurde mit dem Qiagen-PCR-Purification-Kit aufgereinigt, verdaut, über die entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pGASTON kloniert und in *E. coli* XL1-Blue (pJL3) transformiert. α -Amylase-aktive Transformanden bildeten auf Stärkeagarplatten klare Höfe. Die Inaktivierungsrate wurde als Quotient aus nicht aktiven Klonen und der Gesamtzahl der Klone berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 aufgeführt. Es zeigte sich, dass eine Inaktivierungsrate von 30% bei einer Endkonzentration von 30-60 μ M MnCl₂ erreicht werden kann.

Tabelle 19: Einstellung der Mutationsrate.

Endkonzentration MnCl ₂	Inaktivierungsrate
0 µM	10-20%
15 µM	20%
30 µM	30%
60 µM	30%
150 µM	50-60%

Die Sequenzierung von 10000 Basenpaaren ergab eine Mutationsrate von 0,7/1500 bei einer Konzentration von 30 µM MnCl₂ im PCR-Ansatz bzw. von 1/1500 bp bei einer Konzentration von 60 µM MnCl₂. Da eine Mutationsrate von 1/1500 bp der gewünschten Mutationsrate von ungefähr einer Mutation pro Gen entspricht, wurde in weiteren Experimenten die Error-prone PCR mit einer MnCl₂-Konzentration von 60 µM (2 mM MnCl₂-Stammlösung) durchgeführt.

4.4.2 AUFBAU DER MUTANTENBIBLIOTHEK

Zur Erstellung der Mutantenbibliothek wurde die Error-prone PCR mit den Templates pGBAA-WT, pGBAA-S201N und pGBAA-N297D mit einer MnCl₂-Konzentration von 60 µM durchgeführt. Da die durch ortsspezifische Mutagenese erhaltenen Deletionsmutanten keine α-Amylaseaktivität zeigten, wurden diese auch nicht als Template für die Zufallsmutagenese eingesetzt.

Die Produkte wurden wie oben beschrieben in den Vektor pGASTON kloniert und in *E. coli* XL1-Blue (pJL3) transformiert. So erhaltene Transformanden wurden zur Erstellung von Glycerolstocks mit Hilfe eines Pickroboters in 384-well bzw. 96-well Mikrotiterplatten vereinzelt und bei -80°C gelagert. Außerdem wurden alle in den Versuchen zu 4.4.1 erhaltenen Transformanden in diese Bibliothek aufgenommen, wodurch eine Bibliothek von 7296 Transformanten erhalten wurde.

Damit jede mögliche Einfachmutation mindestens einmal vorhanden sein kann, muss eine Bibliothek eine Anzahl von Klonen enthalten, die mindestens dreimal so groß ist wie die Nukleotidsequenzlänge, in diesem Fall also $3 \cdot 1545 = 4635$ Klone. Um eine spezielle Mutation mit der Wahrscheinlichkeit P zu finden, müssten allerdings

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-\frac{1}{b})}$$

Klone gescreent werden, wobei a die Anzahl der zu findenden Mutationen, also $a=1$ ist und b die Gesamtzahl an Mutationen also $b=4635$ ist. Für eine 95%ige Wahrscheinlichkeit ($P=0,95$) ergibt sich die Anzahl der Klone N zu $N=13883$ Klone. Für eine Bibliothek von 7296 Klonen ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 80%, jede Mutation einmal zu finden. Ob es möglich ist, eine ausreichende Anzahl an verbesserten Klonen zu finden, sollte in dem sich anschließenden Screening überprüft werden.

4.4.3 SCREENING DER ERROR-PRONE BIBLIOTHEK

Nach der Bestimmung des Wertebereichs des Wildtyps wurde die Mutantenbibliothek nach Varianten mit erhöhter Aktivität bei pH 10 durchmustert. Dazu wurden alle 7296 Klone nach Protokoll kultiviert und dem Phadebas[®]-Assay unterzogen. Dabei wurde nach Klonen gesucht, die rechts des definierten Wildtypbereichs liegen, deren Aktivität also bei pH 10 im Vergleich zu der Aktivität bei pH 7 höher ist als die des Wildtyps. Um zudem von einem eindeutigen Signal sprechen zu können, wurden nur solche Klone betrachtet, deren Absorption bei pH 10 mit mehr als 0,2 Absorptionseinheiten mehr als doppelt so hoch wie das Hintergrundrauschen ist.

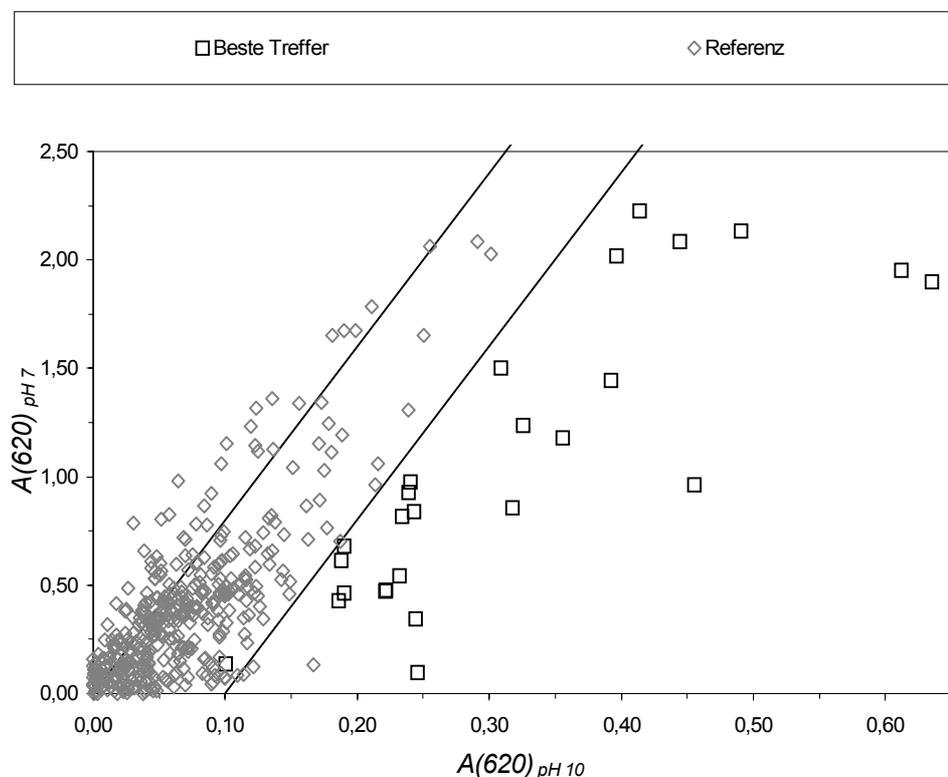


Abbildung 20: Screening auf verbesserte α -Amylaseaktivität bei pH 7 und pH 10 mit dem Phadebas[®]-Assay. Neben den 26 Treffern sind zur Veranschaulichung 768 typische Datenpunkte und die den Wildtypbereich begrenzenden Geraden aufgetragen.

Durch dieses Auswahlverfahren wurden 26 Treffer gefunden, die zusammen mit einer repräsentativen Auswahl von 768 Messpunkten in Abbildung 20 wiedergegeben sind. Die meisten Klone finden sich im Wildtypbereich (blau), nur Klone die nach den oben genannten Kriterien eine verbesserte Aktivität bei pH 10 zeigten, wurden als positive Klone rot markiert.

Die Mehrzahl der verbesserten Klone liegt nicht in unmittelbarer Nähe des Wildtypbereichs, sondern über einen Bereich von $>0,3$ Absorptionseinheiten auf der pH 10-Achse vom Wildtypbereich entfernt.

4.4.4 ANALYSE DER MUTANTEN

Die BAA-Gene der 26 Klone, deren Expressionsprodukt eine gegenüber dem Wildtyp verbesserte Alkaliaktivität bei pH 10 aufwies, wurden vollständig sequenziert. 16 dieser Klone zeigten eine Nukleotidsequenz im BAA-Gen, die so mutiert war, dass sich eine veränderte Aminosäuresequenz ergab. Bei 10 Klonen lag das Wildtypgen oder ein Gen mit Mutationen vor, die zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz der BAA führten. Die vollständige Auflistung der Mutationen, die in den 26 Klonen gefunden wurde, ist im Anhang dargestellt (s. 6.7).

Tabelle 20: Mutationen, die nach der Error-prone PCR des BAA-Gens erhalten wurden. Mehrfach vorkommende Mutationen sind farbig markiert. Die Mutation N297D wurde durch ortsspezifische Mutagenese eingeführt.

Klon #	AS Pos.	Mutation	Klon #	AS Pos.	Mutation
1	414	N/S	9	7	R/Q
2	185	H/L	9	11	F/S
2	297	N/D	11	229	Y/N
2	505	D/N	13	31	V/A
3	297	N/D	17	199	K/R
4	406	K/R	18	194	W/R
4	505	D/H	19	356	E/D
6	100	K/N	20	17	C/R
8	153	N/H	23	233	D/V
8	297	N/D	25	205	K/R
8	505	D/N	26	312	Q/H
8	514	K/N			

Die BAA-Varianten mit veränderter Aminosäuresequenz tragen zwischen 1 und 3 Mutationen, die zur Übersicht in Tabelle 20 dargestellt sind. Mutationen, die in mehreren Klonen auftreten sind farblich markiert. Der Klon 3 trägt ausser der Mutation N297D, die durch ortsspezifische Mutagenese eingeführt wurde keine weitere Mutationen, ist hier aber der Vollständigkeit halber aufgeführt, zumal die Mutation N297D zu einer verbesserten Alkaliaktivität führt.

Die Klone 1, 3, 6, 11, 13, 17, 18, 19, 20, 23, 25, 26 tragen jeweils eine Mutation, wohingegen die Klone 4 und 9 zwei und die Klone 2 bzw. 8 jeweils 3 bzw. 4 Mutationen im Vergleich zum Wildtyp tragen.

Die durch ortsspezifische Mutagenese eingeführte Mutation N297D wurde in den Klonen 2, 3 und 8 wieder gefunden, wohingegen die Mutation S201N, die ebenfalls durch das Template BAA S201N im Pool vorhanden war, nicht wieder gefunden wurde.

Auffällig ist das dreimalige Auftreten einer Mutation an der Aminosäure 505 bei den Klonen 2 und 8 in ein Asparagin beziehungsweise in ein Histidin im Klon 4. Außerdem tritt die Mutation eines Lysins in ein Asparagin (bei den Klonen 6, 8) bzw. in ein Arginin (bei den Klonen 4, 17, 25) insgesamt fünfmal auf, wobei hier bemerkenswert ist, dass jeweils die gleichen Basen im Lysin-Codon mutiert wurden (vgl. 6.7).

4.5 REKOMBINATIONSEXPERIMENTE

Inwieweit die durch Error-prone PCR erhaltenen Mutationen für die verbesserte Alkaliaktivität der BAA entscheidend sind und inwieweit die oben genannten Häufungen signifikant sind, wurde durch Rekombination der Mutanten durch DNA-Shuffling und erneutes Screening der Rekombinationsprodukte überprüft. Dadurch sollte zwischen für die Alkaliaktivität positiven und negativen Mutanten unterschieden werden. Zudem sollte der additive Charakter der Mutationen untersucht werden und so weiter verbesserte Mutanten gefunden werden.

4.5.1 MODIFIKATION DES DNA-SHUFFLING-PROTOKOLLS ZUR SENKUNG DER INAKTIVIERUNGSRATE

Das ursprüngliche Protokoll zur Rekombination (Abécassis *et al.* 2000) ergab eine Inaktivierungsrate von mehr als 95 % (1000 getestete Klone). Da Methoden mit solch hohen Inaktivierungsraten zum schnellen Aufbau einer Mutanten-Bibliothek mit 1000 oder mehr

Klonen nicht geeignet sind, musste die Inaktivierungsrate zur effektiven Herstellung einer Bibliothek von rekombinierten BAA-Varianten gesenkt werden.

Die Sequenzierung einiger inaktiver Klone ergab, dass die Gene zum einen eine Vielzahl neuer Mutationen trugen, zum anderen nur unvollständig rekombiniert wurden. Mit dem Ziel, die Inaktivierungsrate zu senken, wurden folgende Überlegungen angestellt.

Die Entstehung von neuen Mutationen kann durch die Verwendung von Polymerasen mit niedriger Fehlerrate, wie z. B. der *Pfu*-Polymerase verringert werden.

Da unvollständig rekombinierte Gene durch das fehlerhafte Zusammenfügen von Teilstücken entstehen, müssen die Teilstücke möglichst selektiv aneinander gereiht werden, was durch die Verbesserung der Selektivität der Anlagerung überlappender Teilstücke erreicht werden sollte. Dies gelingt typischerweise durch die Anhebung der Annealing-Temperatur im Rekombinationsschritt.

Ein weiterer Ansatzpunkt ergibt sich aus der Tatsache, dass es in diesem Fall um eine Kombination von Punktmutationen geht, also weite Teile der zu kombinierenden Gene gleich sind. Deshalb ist es nicht notwendig, diese Gene in kleine Fragmente (<100 bp) zu zerschneiden. Dadurch würden die Überlappungen einzelner Fragmente größer und selektiver werden, was mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu funktionellen Rekombinationsprodukten führen würde. Inwieweit dies aber die Shuffling-Effizienz senkt, d.h. die Wahrscheinlichkeit der Kombination benachbarter Mutationen erschwert, sollte ebenfalls untersucht werden.

Als Lösungsansatz wurden demnach folgende Punkte gewählt.

- Ersetzen der *Taq*-Polymerase durch *Pfu*-Polymerase bei der Rekombinations-PCR zur Vermeidung zusätzlicher Mutationen.
- Verwendung eines anderen PCR-Protokolls zur selektiveren Rekombination der Zufallsfragmente (z. B. durch eine höhere Anlagerungstemperatur)
- Verwendung längerer Fragmente (250-500 bp) zur Rekombination.

In Tabelle 21 sind die Inaktivierungsraten, die durch additive Anwendung der Modifikationen erhalten wurden, dargestellt. Die Inaktivierungsraten wurden durch qualitatives Screening auf Agarplatten von 1000 Klonen je Versuch bestimmt.

Tabelle 21: Senkung der Inaktivierungsrate durch additive Modifikation des Shuffling-Protokolls.

Altes Rekombinationsprotokoll	X				
Neues Rekombinationsprotokoll		X	X	X	X
Längere Fragmente			X	X	
<i>Pfu</i> -Polymerase				X	X
Inaktivierungsrate	95%	90-95%	90%	<80%	<80%

Tabelle 21 zeigt, dass die Inaktivierungsrate durch die Verwendung eines neuen Rekombinationsprotokolls nur leicht und durch die zusätzliche Verwendung längerer Fragmente (250 bp-500 bp) nicht signifikant gesenkt werden kann. Die Verwendung der *Pfu*-Polymerase in Verbindung mit dem neuen Rekombinationsprotokoll und längeren Fragmenten senkt die Inaktivierungsrate auf unter 80%. Eine vergleichbare Inaktivierungsrate wurde erhalten, indem kürzere Fragmente in Kombination mit dem neuen Rekombinationsprotokoll und *Pfu*-Polymerase verwendet wurden. Deshalb wurde in weiteren Experimenten neben der *Pfu*-Polymerase, aufgrund der Zeitersparnis, das neue Rekombinationsprotokoll verwendet. Um einen optimalen Austausch von Sequenzinformationen zu gewährleisten, wurden aber weiterhin auch kleinere Fragmente (<200 bp) verwendet, da die Fragmentlänge keine Auswirkung auf die Inaktivierungsrate hatte.

4.5.2 ERSTELLUNG EINER DNA-SHUFFLING-BIBLIOTHEK

Mit dem modifizierten DNA-Shuffling-Protokoll wurden ausgehend von 12 Template-Klonen (1, 3, 4, 9, 11, 12, 13, 18, 19, 23, 25, 26) etwa 3000 Klone erzeugt, die qualitativ auf α -Amylaseaktivität hin untersucht wurden. Hinzugezogen wurden auch 7000 Klone, die während der Versuche zur Modifikation des Shuffling-Protokolls erhalten wurden. Insgesamt wurden 960 α -Amylase-aktive Klone mittels qualitativem Screening selektiert, gepickt und in Mikrotiterplatten gelagert.

4.5.3 SCREENING DER SHUFFLING-BIBLIOTHEK

Das Screening der DNA-Shuffling-Bibliothek mit dem bereits bekannten Assay bei pH 10 und pH 7 ergab 34 Klone, deren Expressionsprodukte eine gegenüber dem Wildtyp verbesserte Aktivität bei pH 10 aufwiesen. Die Messpunkte dieser Klone sind in Abbildung

21 rot dargestellt; die Daten der 960 Klone der Shuffling-Bibliothek sind blau und die Daten der besten Klone aus der Error-prone Bibliothek sind grau aufgetragen. Der Wildtypbereich ist durch zwei durchgehende Geraden gekennzeichnet. Die 34 Treffer erhielten die Nummern 27 bis 60, die dazugehörigen Daten sind im Anhang aufgeführt (vgl. 6.8). Rechts der gepunkteten Geraden in Abbildung 21 liegen Klone, die alkaliaktiver sind als 25 der 26 besten Klone aus der Error-prone PCR-Bibliothek.

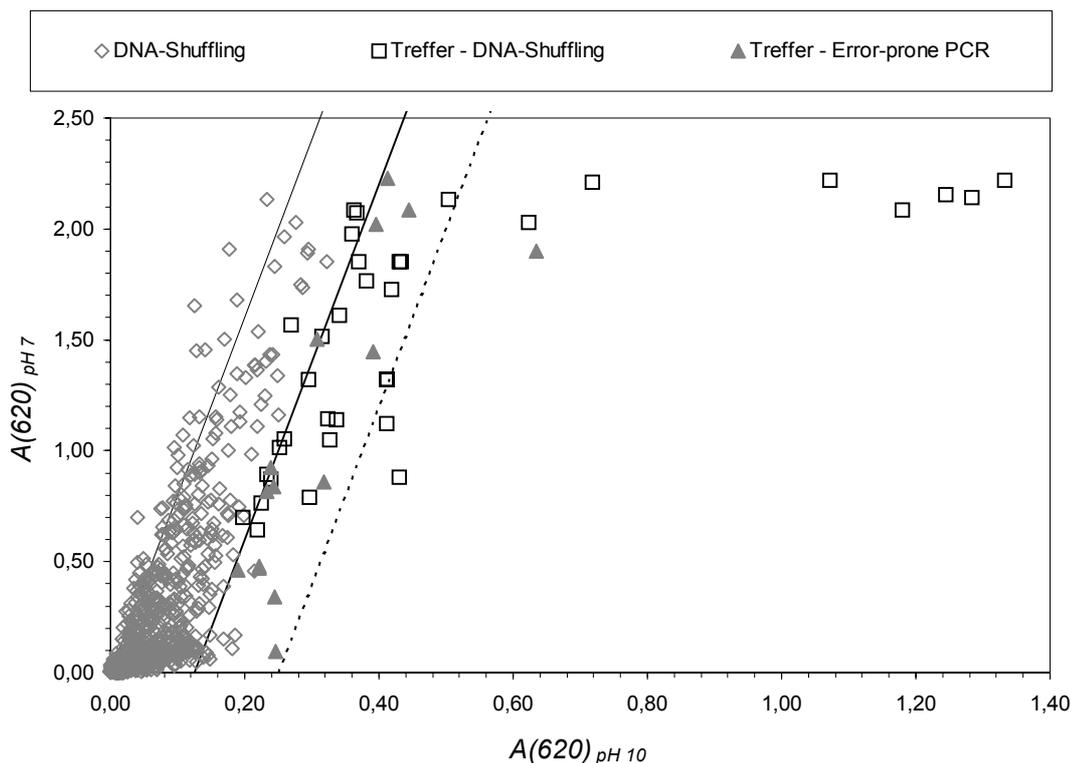


Abbildung 21: Messpunkte der besten Klone aus der Shufflingbibliothek im Vergleich mit allen Messpunkten der Shuffling-Bibliothek und den besten Klonen aus der Error-prone Bibliothek. Klone mit Wildtyp-ähnlichen Eigenschaften liegen zwischen den zwei parallelen, durchgezogenen Geraden. Klone, die alkaliaktiver als 95% der besten Klone aus der Error-prone Bibliothek sind, liegen rechts der gepunkteten Gerade.

4.5.4 RESCREENING

Die 35 besten Klone aus dem Screening der Shuffling-Bibliothek wurden je in eine weitere Mikrotiterplatte gepickt. Dabei wurden je zwei Wells mit dem gleichen Klon angeimpft. Für das Rescreening wurden von dieser Platte 2 Replikplatten angelegt, kultiviert und gescreent, so dass also für jeden Klon 4 Datenpunkte erhalten wurden. Abbildung 22 zeigt die Mittelwerte der vier Messpunkte für jeden Klon.

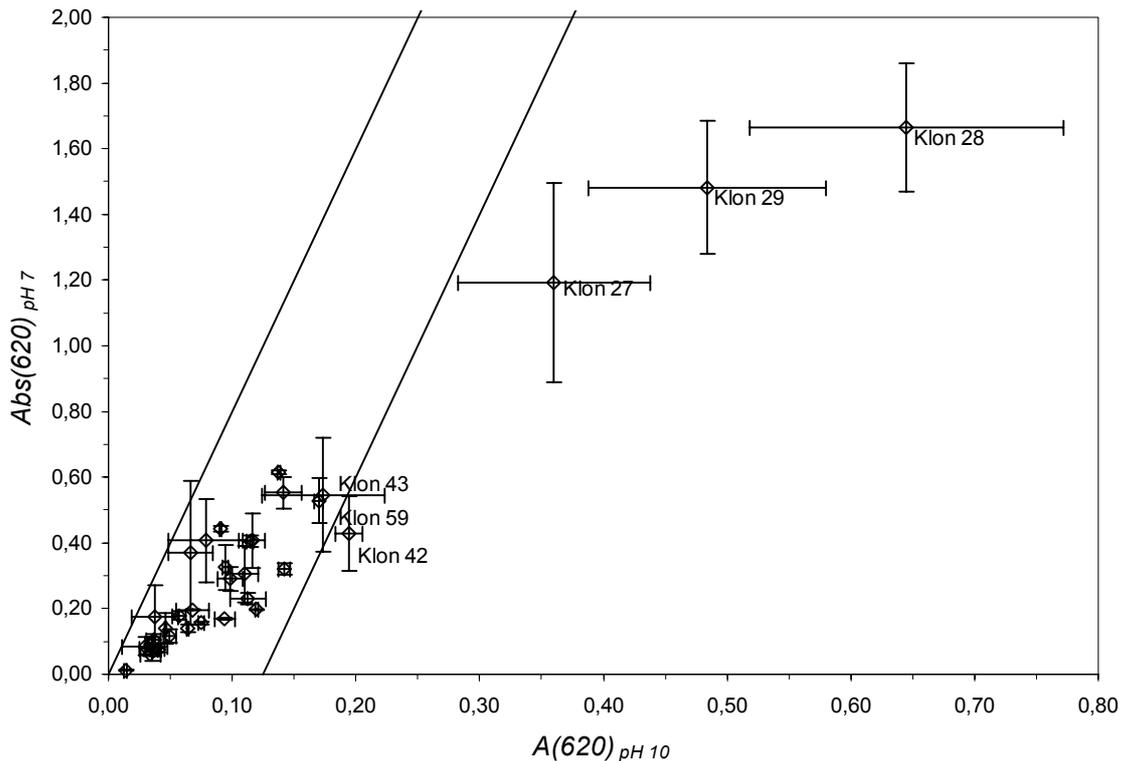


Abbildung 22: Rescreening der besten Treffer aus dem DNA-Shuffling. Vollständig oder teilweise außerhalb liegende Klone sind annotiert.

Die Klone 27, 28 und 29 liegen ebenso wie der Klon 42 ausserhalb des Wildtypbereichs. Die Klone 59 und 43 liegen am Rande des Wildtypbereichs, wobei jeder Klon seine Fehlerbalken in den Wildtypbereich hinein ersteckt. Bei den restlichen Datenpunkten, die innerhalb des Wildtypbereichs liegen, handelt es sich vermutlich um fälschlicherweise als positiv identifizierte Klone.

4.5.5 RETRANSFORMATION

Die Plasmide der Mutanten 27, 28, 29, 42, 43 und 59 wurden isoliert und in *E. coli* XL1-Blue (pJL3) transformiert. Expressionskulturen in der Mikrotiterplatte wurden auf α -Amylaseaktivität bei pH 10 und pH 7 getestet. Dabei zeigte nur die Mutante 42 eine verbesserte Aktivität bei pH 10 gegenüber dem Wildtyp. Die Mutanten 27, 28, 43 und 59 hingegen befanden sich im Wildtypbereich. Die Mutante 29 zeigte zwar keine verbesserte Aktivität bei pH 10 aber dafür eine konstant hohe Aktivität, was bedeutet, dass sie entweder eine höhere spezifische Aktivität besitzt, oder dass sie besser als der Wildtyp exprimiert wird.

4.6 ERROR-PRONE PCR, 2. RUNDE

Ausgehend von den Genen der Mutanten 29 und 42 wurde eine Error-prone PCR-Bibliothek mit je 96 Klonen aufgebaut, um gegebenenfalls weiter verbesserte BAA-Varianten zu finden. Hierzu wurde die Error-prone PCR mit einer $MnCl_2$ -Konzentration von 60 μM durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit dem PCR-Purification Kit von Qiagen gereinigt, verdaut und in die *NdeI-PstI*-Schnittstellen des Vektors pGASTON kloniert. Nach Transformation in *E. coli* XL1-Blue (pJL3) und Selektion auf LB-Amp-Agar-Platten wurden je 96 α -Amylase-aktive Klone in Mikrotiterplatten vereinzelt.

4.6.1 SCREENING

Zur Bestimmung der Inaktivierungsrate wurden die Klone mittels qualitativem Screening auf Stärkeagarplatten auf ihre α -Amylaseaktivität getestet. Von den 192 Klonen zeigten 140 α -Amylaseaktivität, was einer Inaktivierungsrate von 30% entspricht.

Zur quantitativen Durchmusterung wurden die 192 Klone in Mikrotiterplatten exprimiert, aufgeschlossen und die Aktivität bei pH 10 und pH 7 bestimmt. In Abbildung 23 sind die 192 Datenpunkte im Vergleich mit den Mutanten 29 und 42, Daten aus dem Rescreening) dargestellt. Klone, die eine deutlich verbesserte Aktivität bei pH 10 gegenüber den Mutanten 42 und 29 zeigten und deren DNA-Sequenz bestimmt wurde sind **rot** eingezeichnet. Zudem wurden durchgezogene Geraden eingefügt, die den Wildtypbereich begrenzen, sowie gestrichelte Geraden, die einen Bereich begrenzen, in dem Klone mit einer um den Faktor zwei verbesserten Aktivität bei pH 10 (ggü. Wildtyp) liegen müssten.

Aus Abbildung 23 ist ersichtlich, dass sich die Messwerte der Klone in drei Gruppen zusammen fassen lassen. Klone, die die Mutante 29 als Vorlage haben, werden in einem Absorptionsbereich von 0,25-0,5 für die Aktivität bei pH 10 und 1,7-2,2 für die Aktivität bei pH 7 gefunden. Klone, die von der Mutante 42 abstammen, sind in einem Absorptionsbereich von 0,18-0,4 (pH 10) bzw. 0,5-1 (pH 7) angesiedelt. Inaktive Klone erzeugen eine Absorption bei pH 10 von $<0,1$ und eine Absorption bei pH 7 von $<0,2$. Zudem liegt eine Minderheit der Klone außerhalb der genannten Bereiche.

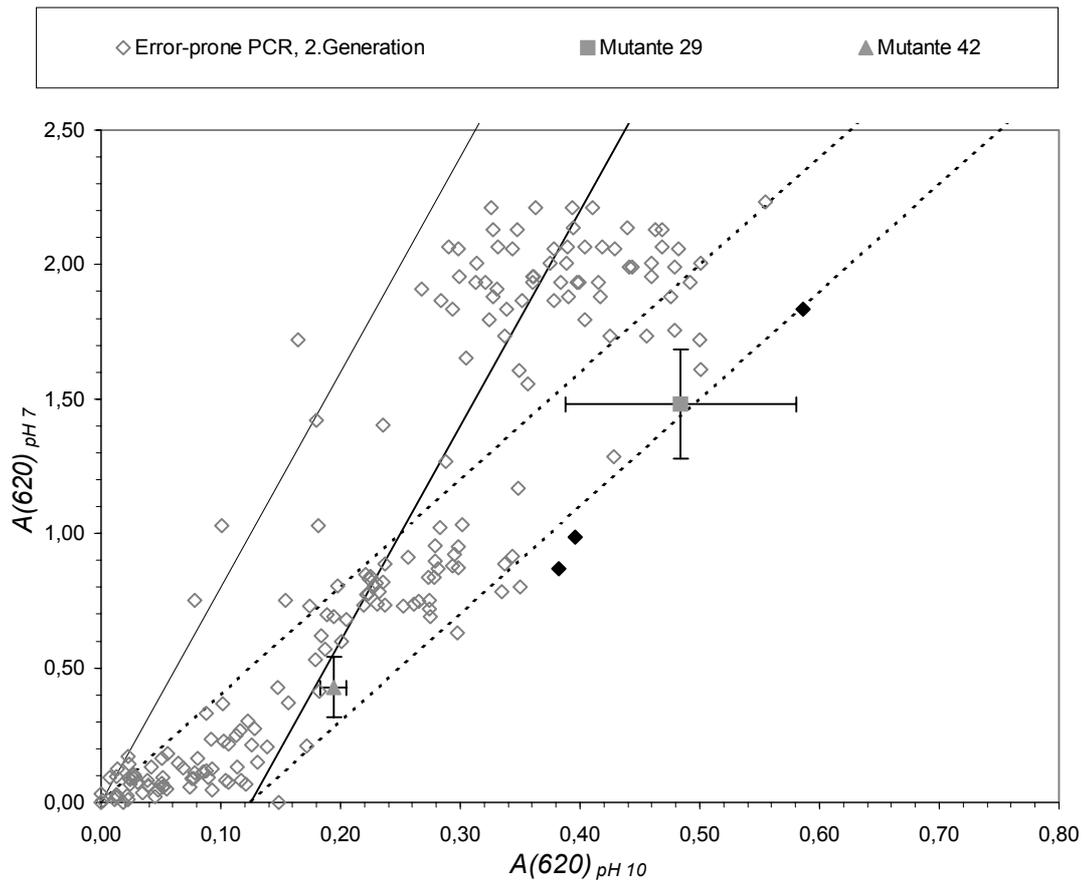


Abbildung 23: Error-prone PCR, 2. Generation. Eine Anzahl von repräsentativen Datenpunkten ist dargestellt. Zum Vergleich sind die Werte der Mutanten 29 und 42 aus dem Rescreening aufgetragen. Klone, die näher charakterisiert wurden sind schwarz eingezeichnet. Die gepunkteten Geraden begrenzen einen Bereich, in dem sich Klone mit einer doppelten Aktivität (im Vergleich zum Wildtyp) bei pH 10 befinden sollten.

4.7 CHARAKTERISIERUNG DER MUTANTEN

4.7.1 DNA-SEQUENZEN

Zwei Klone aus dem DNA-Shuffling wurden näher betrachtet: Mutante 42 und Mutante 29. Beide zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verbesserte Aktivität bei pH 10.

Die DNA-Sequenzierung der Mutanten 42 ergab 5 proteinogene Mutationen, die in Tabelle 22 aufgeführt sind. Zudem wurden noch 2 stille Mutationen gefunden.

Tabelle 22: Mutante 42 und ihre proteinogenen Mutationen. Die Sequenznummerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz der BAA mit Signalsequenz.

Mutante 42	Mutation	Vorlage
Signalsequenz	L13P	neu
Reife α -Amylase	W194R	Mutante 18
	S197P	neu
	E356D	Mutante 19
	N414S	Mutante 1

Die Mutation L13P befindet sich im Signalpeptid, die anderen Mutationen sind im reifen Protein lokalisiert. Die Mutationen W194R, E356D und N414S wurden von den Klonen 18, 19 und 1 übernommen. Die Mutationen L13P und S197P stammen aus keinem der verwendeten Klone, was darauf schliessen lässt, dass sie während des Shuffling-Prozesses erzeugt wurden.

Im Gen der Mutante 29 wurden 6 Aminosäureaustausche gefunden, die in Tabelle 23 dargestellt sind. Desweiteren trägt das Gen der Mutante 29 3 stille Mutationen.

Tabelle 23: Mutationen der Mutante 29. Die Sequenznummerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz der BAA mit Signalsequenz. * Die Mutation N297D wurde von der rationalen Mutante N297D über den Klon 3 vererbt.

Mutante 29	Mutation	Vorlage
Signalsequenz	L13P	neu
Reife α -Amylase	V32A	Mutante 13
	A230V	neu
	N297D	Mutante 3*
	K406R	Mutante 4
	N414S	Mutante 1

Das Signalpeptid der Mutante 29 besitzt die Mutation L13P, die auch in der Mutante 42 auftritt. Die Mutation V32A liegt am N-terminus des reifen Enzyms. Die Mutation N297D wurde über den Klon 3 von den rationalen Mutanten vererbt. Die Mutationen V32A, K406R und N414S stammen von den Klonen 13, 4 und 1. Die Mutation A230V ist in keinem Vorlagegen vorhanden und daher während des Shuffling-Prozesses eingeführt worden. Das gleiche gilt für die Mutation L13P, die aber auch in der Mutante 42 auftritt. Dies legt den

Schluss nahe, dass diese Mutation in einer frühen Phase des Shufflings, zum Beispiel während der ersten PCR-Zyklen, eingeführt wurde.

Drei Klone aus der zweiten Runde Error-prone PCR wurden ebenfalls sequenziert. Zwei der Klone, die nahe dem Bereich der Klone liegen, die von der Mutante 42 abstammen, besaßen die Nukleotidsequenz der Mutante 42. Der Klon B1, der dem Bereich der Klone, die von der Mutante 29 abstammen, näher liegt, besitzt zusätzlich zu den sechs Mutationen der Mutante 29 vier weitere Mutationen, wobei zwei davon stille und zwei proteinogene Mutationen sind. Die proteinogenen Mutationen sind I203L und K474Q und sind mit den weiteren Mutationen der Mutante 29 in Tabelle 24 zu finden.

Tabelle 24: Proteinogene Mutationen der Mutante B1 im Vergleich zum Wildtyp. Mutationen in der Signalsequenz sind grau unterlegt. * Die Mutation N297D wurde von der rationalen Mutante N297D über den Klon 3 vererbt. Die ursprünglichen Klone sind in Klammern angegeben.

Mutante B1	Mutation	Vorlage
Signalsequenz	L13P	29
	V32A	29 (13)
Reife α -Amylase	I203L	neu
	A230V	29
	N297D	29 (3 [*])
	K406R	29 (4)
	N414S	29 (1)
	K474Q	neu

4.7.2 STRUKTUR-ANALYSE

Das Molecular Modelling liefert Werkzeuge, die die Visualisierung, Analyse und den Vergleich von Proteinstrukturen sowie die quantitative Bewertung von Veränderungen in den Strukturen ermöglicht.

Durch die Anwendung von Basis-Methoden des Molecular Modellings wurden die Strukturen der Mutanten 42, 29 und B1 erzeugt und mit dem Wildtyp verglichen. Daraus erhaltene Werte sollten eine Erklärung für die veränderten Eigenschaften liefern.

Da von der BAA keine Kristallstruktur bekannt ist, wurde mittels Homologie Modelling eine theoretische Struktur der Aminosäuren 32-515 (entspricht dem reifen Protein) erzeugt. Dazu wurde die Aminosäuresequenz der BAA im FASTA-Format an den SwissModel-Server geschickt und die erhaltene Struktur im SwissPDB-Viewer evaluiert. Anschließend wurden

die Mutationen mit Hilfe des „Mutate“-Tools in die Strukturen eingefügt, die Seitenketten-Konformation angepaßt und die Struktur Energie-minimiert. Die Strukturen des Wildtyps und der Mutanten wurden übereinandergelegt und im Programm VMD visualisiert.

4.7.2.1 MUTANTE 42

Gegenüber dem BAA-Wildtyp sind in der Mutante 42 vier Aminosäuren ausgetauscht. Davon befindet sich die Mutation L13P im Signalpeptid, das nicht in der theoretischen Struktur enthalten ist und somit nicht strukturanalytisch behandelt werden kann.

W194R

Die Aminosäure 194 befindet sich in der Domäne B der BAA-Struktur auf einem β -Faltblatt. Wie Abbildung 24 zeigt, ist W194 im Wildtyp zu den Aminosäuren W167, E196 und K199 hin orientiert. In der Mutante 42 zeigt die Seitenkette in die Richtung von R194 zu Y229 und D192. Die Auswirkung auf die Oberfläche zeigt die Conolly-Darstellung der gleichen Region (Abbildung 25). Im Wildtyp wird rechts des W194 ein unpolarer Kanal gebildet, der in der Mutante 42 durch das R194 abgedeckt wird, wodurch sich andererseits eine Kavität links von R194 öffnet.

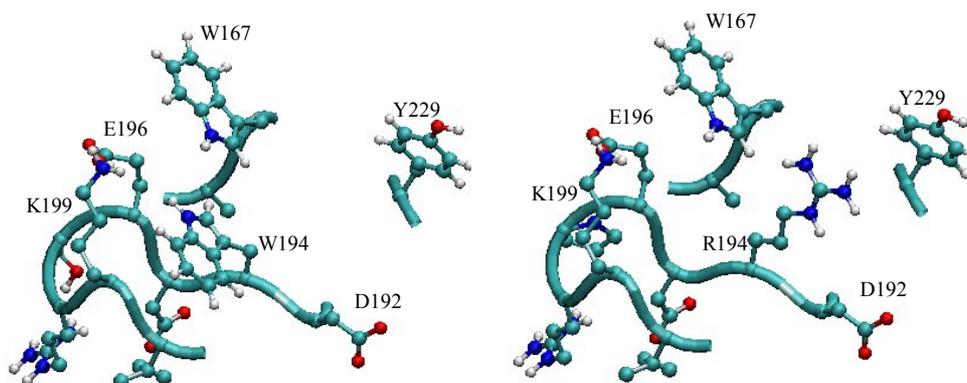


Abbildung 24: Umgebung der Aminosäure W194 bzw. R194 in der theoretischen Struktur der BAA (links) bzw. der Mutante 42 (rechts).

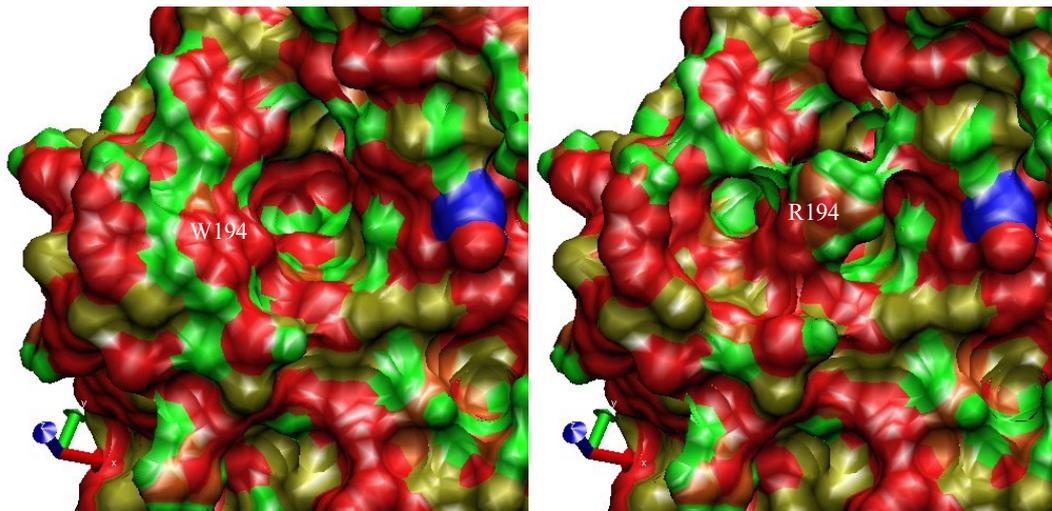


Abbildung 25: Die Aminosäure W194 bzw. R194 in der BAA (links) bzw. der Mutante 42 (rechts). Die Umgebung ist als Conolly-Oberfläche dargestellt. Negativ geladene Bereiche sind grün, neutrale rot und positiv geladene gelb gefärbt.

S197P

Die Aminosäure 197 liegt in der Domäne B in einem β -Turn zwischen zwei β -Strängen. Dieser β -Turn wird, neben den (hier nicht gezeigten) Wasserstoffbrücken-Bindungen auch durch zwei ionische Wechselwirkungen zwischen D195 und R198 sowie E196 und K199 stabilisiert. Das S197 in Wildtyp wird zu P197 in der Mutante 42 (Abbildung 26). Beide liegen mit ihren Torsionswinkeln im erlaubten Bereich des Ramachandran-Plots.

Die Analyse der Proteinoberfläche zeigt bei der Mutante 42 das Verschwinden der negativen Ladung des Sauerstoffs (grün) des S197 an dessen Stelle ein neutrales Kohlenstoffatom (rot) des P197 tritt (Abbildung 27).

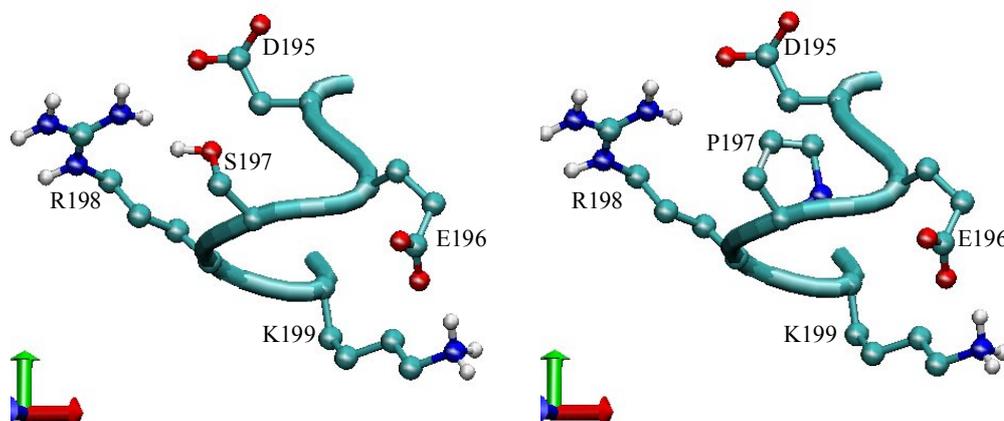


Abbildung 26: Die Aminosäure S197 bzw. P197 und ihre Umgebung in der theoretischen Struktur der BAA (links) bzw. der Mutante 42 (rechts).

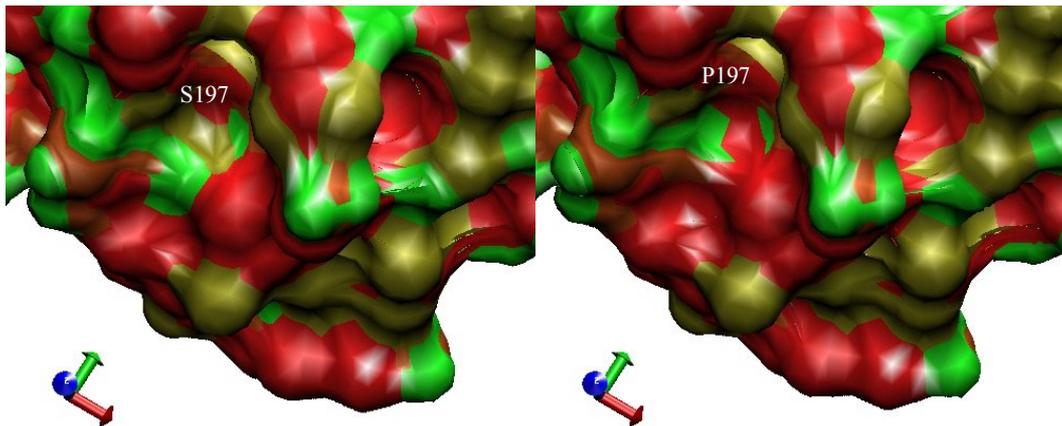


Abbildung 27: Veränderung in der Conolly-Oberfläche der Struktur der BAA (links) und der Mutante 42 (rechts) durch die Mutation S197P. In der Mutante 42 trägt die Oberfläche an dieser Position eine negative Ladung (grün) weniger. Neutrale Bereiche sind rot gefärbt, positiv geladene gelb.

E356D

Die Aminosäure 356 liegt in der Domäne A, genauer gesagt liegt sie in einer α -Helix im inneren des β -Barrels. Durch die Substitution von E durch D, ändert sich die Gesamtladung und die Polarität der Struktur nicht, Abbildung 28 zeigt jedoch die Auswirkung, welche durch die veränderte Sterik hervorgerufen wird. Im Wildtyp ist E356 zu T360 hin orientiert und der O(E356)-O(T360)-Abstand mit 2,95 Å ausreichend für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke an dieser Stelle (rot gestrichelt). In der Mutante 42 ist D356 allerdings aufgrund der geringeren Größe zu K375 hin orientiert, wodurch der O(D356)-N(K375)-Abstand 2 Å wird und damit ideal für eine Wasserstoffbrücke zwischen diesen Aminosäuren (rot und blau gestrichelt) ist.

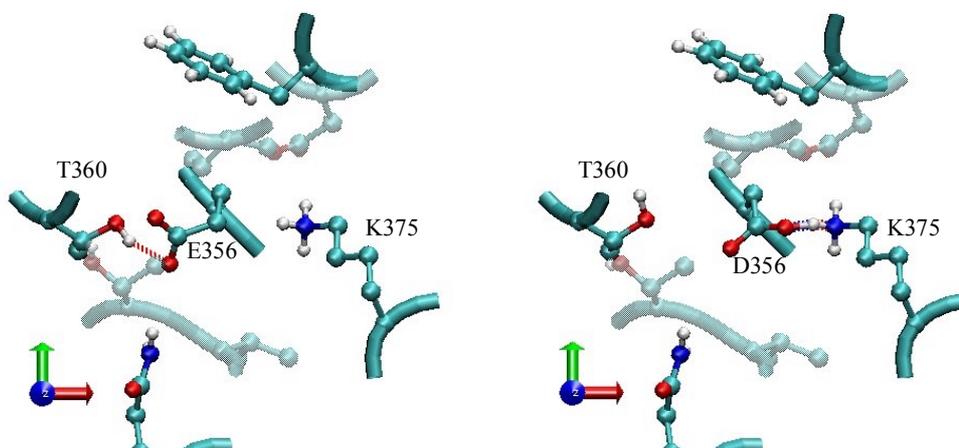


Abbildung 28: Darstellung der Umgebung der Aminosäure 356 in der Struktur der BAA (links) und der Mutante 42 (rechts). In der BAA-Struktur bildet E356 eine Wasserstoffbrücke zu T360 aus, in der Struktur der Mutante 42 bildet D356 eine Wasserstoffbrücke zu K375 aus.

N414S

An der Position 414 wird durch die Mutation N414S eine polare Aminosäure durch eine polare Aminosäure mit geringerem sterischen Anspruch ersetzt. Zudem besitzt S414 ein geringeres Dipolmoment (Abbildung 29).

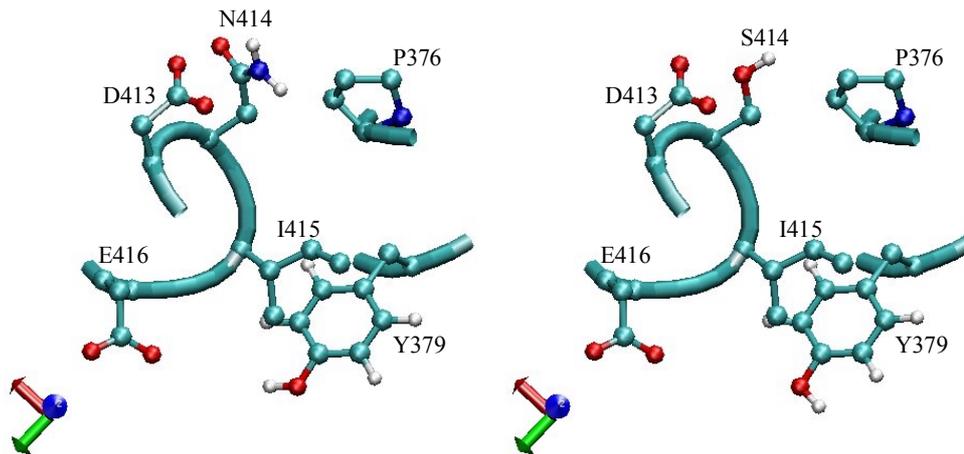


Abbildung 29: Die Umgebung der Aminosäure N414 in der theoretischen Struktur des BAA-Wildtyps (links) und der Aminosäure S414 in der Mutante 42 (rechts).

4.7.2.2 MUTANTE 29

Neben der Mutation L13P, die im Signalpeptid lokalisiert ist, besitzt die Mutante 29 vier weitere Mutationen. Die Mutation V32A liegt am N-Terminus des reifen Proteins, bzw. der theoretischen Struktur und kann so nicht strukturfunktionell betrachtet werden. Die Auswirkung der verbleibenden Mutationen A230V, K406R werden im folgenden analysiert. Die Mutation N414S ist auch in der Aminosäuresequenz der Mutante 42 vorhanden und wurde bereits betrachtet.

A230V

In der Domäne B lokalisiert, ist die Aminosäure 230 ein Teil des β -Strangs, der über dem katalytischen Zentrum liegt. In der direkten Umgebung befinden sich 3 aromatische Aminosäuren W184, F170 und F189 sowie das positiv geladene K135. Durch die Mutation des A230 des Wildtyps zum V230 der Mutante wird eine Aminosäure mit größerem sterischen Anspruch eingeführt (Abbildung 30).

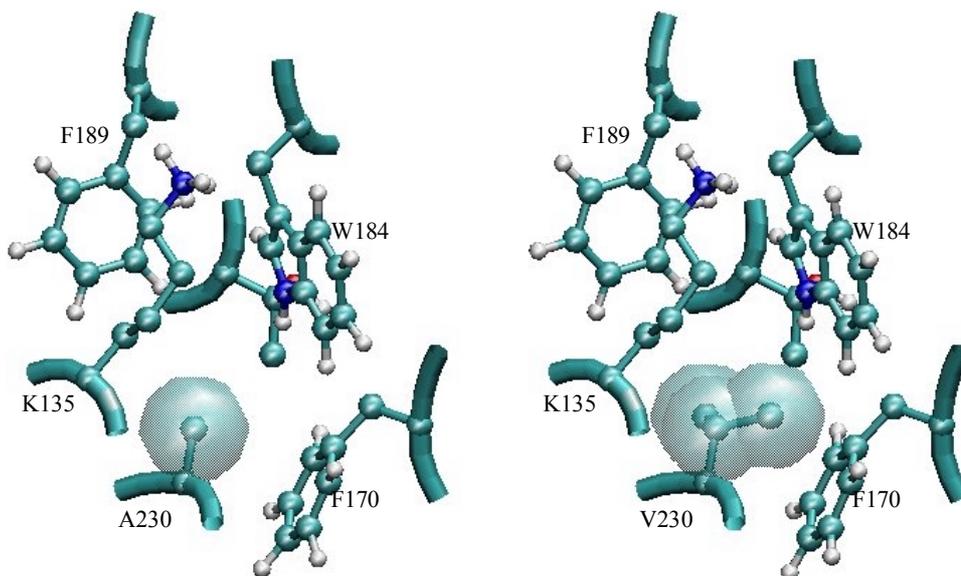


Abbildung 30: Darstellung der Umgebung der Aminosäure A230 in der Struktur des BAA-Wildtyps (links) und der Aminosäure V230 in der Struktur der Mutante 29 (rechts). Durch die Mutation A230V in der Mutante 29 wird eine Aminosäure mit größerem sterischen Anspruch in die Struktur eingeführt (Van der Waals-Radius).

K406R

Die Aminosäure liegt für das Lösungsmittel frei zugänglich in der Domäne A. In direkter Umgebung befindet sich mit E367 eine negativ geladene Aminosäure sowie mit T369, Q371 und S404 drei polare Aminosäuren (Abbildung 31). Die Oberflächendarstellung in Abbildung 32 zeigt zudem einen unpolaren Bereich unter der Aminosäure 406 (rot) und einen negativ geladenen Bereich in Nachbarschaft zu dem Ende der Seitenkette, der durch E367 und T369 gebildet wird. Das K406 ist in der Mutante 29 durch R406 ersetzt, was bedeutet, dass zwar eine positiv geladene Aminosäure durch eine Aminosäure mit gleicher Ladung substituiert wird, der pK_s -Wert an dieser Stelle aber von 10,54 auf 12,48 ansteigt.

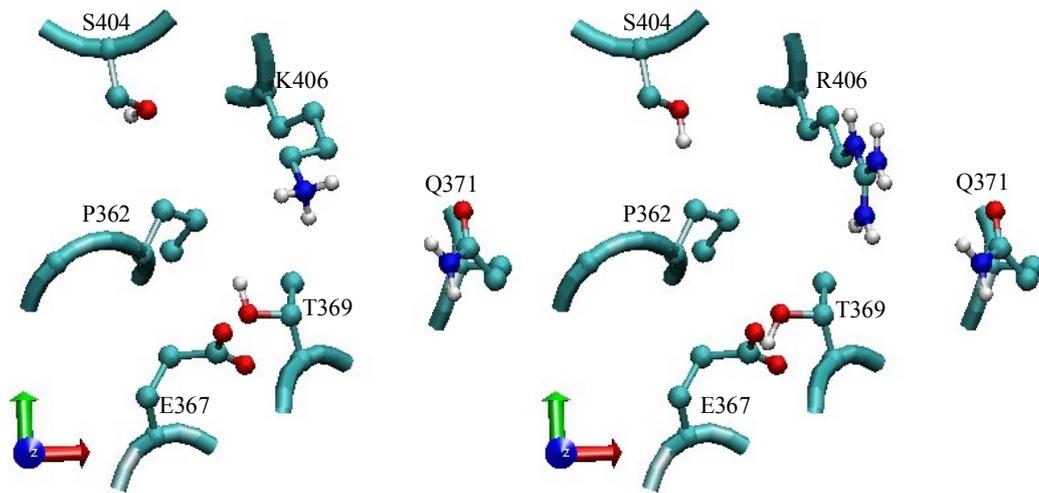


Abbildung 31: Umgebung der Aminosäure 406 in der Struktur der BAA (links) und der Mutante 29 (rechts).

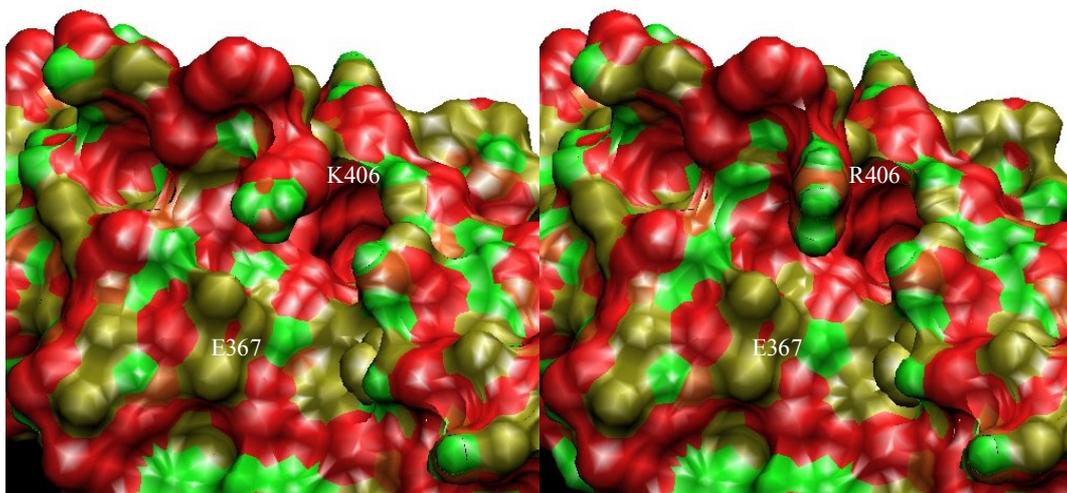


Abbildung 32: Conolly-Oberfläche der Umgebung der Aminosäure 406 in der Struktur der BAA (links) und der Mutante 29 (rechts). Die Aminosäure 406 bedeckt einen unpolaren Bereich (rot) und das Seitenkettenende liegt in der Nähe eines Bereichs mit negativer Ladung (grün, E367). Positive Ladungen sind gelb dargestellt.

4.7.2.3 MUTANTE B1

Da die Mutante B1 von der Mutante 29 abstammt, trägt sie auch die Mutation L13P im Signalpeptid und die vier Mutationen V32A, A230V, K406R und N414S im reifen Protein. Zudem ist in der Aminosäuresequenz der Mutante B1 I203 durch ein L ersetzt, und K474 durch ein Q. Um die Verringerung der spezifischen Aktivität bei der Mutante B1 gegenüber

der Mutante 29 erklären zu können (vgl. 4.7.5), wird die theoretische Struktur der Mutante B1 mit der theoretischen Struktur der Mutante 29 verglichen.

I203L

In der Domäne B befindet sich die Aminosäure 203 umgeben von den positiv geladenen Aminosäuren R154 und K205, die eine Salzbrücke mit der negativ geladenen Aminosäure D193 bildet (Abbildung 33). Die Substitution von I203 durch L203 in der Mutante B1 führt zu einer Veränderung in der Sterik. Der Abstand D193-L203 ist mit 3,18 Å um 0,24 Å kleiner als der Abstand D193-I203 im in der Mutante 29. Gleichzeitig verringert sich auch der Abstand L203-R154 von 3,45 Å im Wildtyp auf 2,70 Å in der Mutante B1.

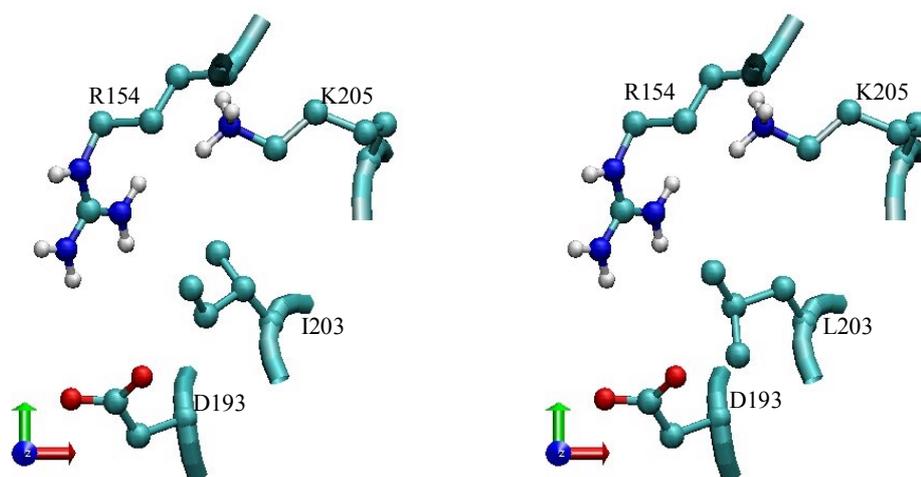


Abbildung 33: Die Aminosäure I203 in der Mutante 29 (links) und L203 in der Mutante B1 (rechts) und die umliegenden Aminosäuren.

K474Q

Die Aminosäure 474 liegt in der Domäne C und ist von den polaren Aminosäuren N475 und S448 und dem negativ geladenen D447 umgeben (Abbildung 34). In der Mutante 29 bildet K474 eine Salzbrücke mit D447, die in der Mutante B1 von Q474 nicht gebildet werden kann. Dadurch wird der von K474 bedeckte negative Bereich um D447 und S448 dem Lösungsmittel zugänglich.

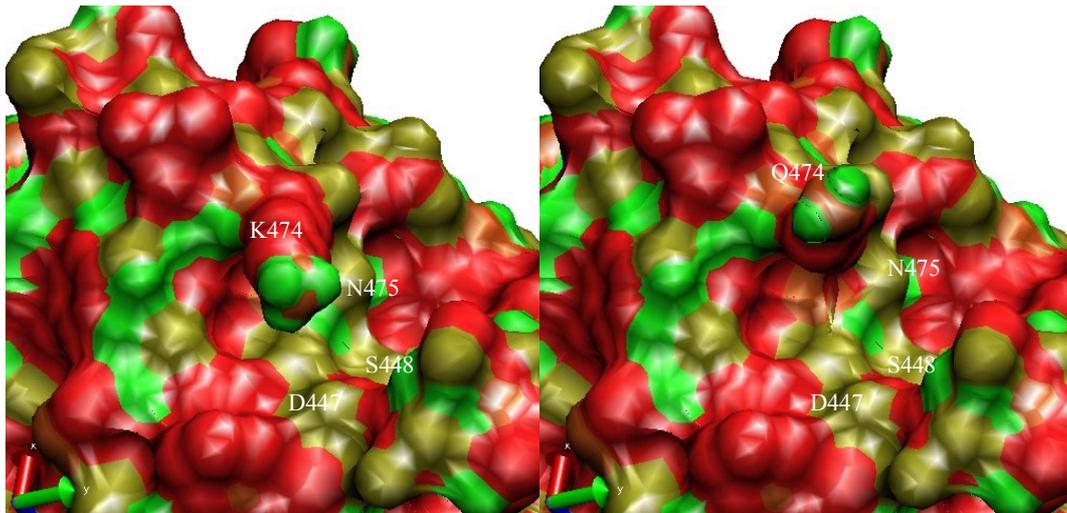


Abbildung 34: Conolly-Oberfläche der Umgebung der Aminosäure K474 in der Struktur der Mutante 29 (links) und der Aminosäure N475 in der Struktur der Mutante B1 (rechts). Die Farbgebung gibt die Ladungsverteilung an: grün: negativ, rot: neutral, gelb: positiv.

4.7.3 AKTIVITÄT DER PERIPLASMAFRAKTIONEN

Um ausreichende Mengen an Enzym zu erhalten, wurden der BAA-WT Klon sowie die Mutanten 29, 42 und B1 im 250 ml-Maßstab kultiviert und die periplasmatischen Fraktionen isoliert. Diese wurden entsprechend verdünnt und mit dem Phadebas[®]-Schnelltest auf ihre α -Amylaseaktivität getestet. Die in den Periplasmafraktionen enthaltenen Gesamtaktivitätskonzentrationen sind in Abbildung 35 dargestellt.

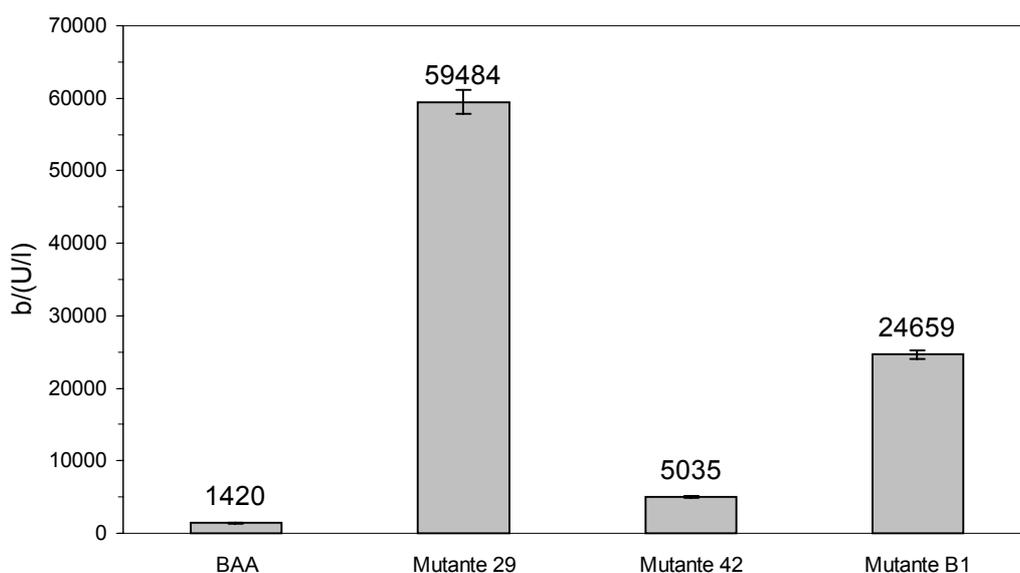


Abbildung 35: Gesamtaktivitätskonzentrationen der Periplasmafraktionen des BAA-Wildtyps und der Mutanten 29, 42 und B1.

Der Klon 29 besitzt mit einer Aktivitätskonzentration von 59484 U/l eine um den Faktor 42 erhöhte Aktivitätskonzentration gegenüber dem Wildtyp (1420 U/l). Auch der Klon 42 zeigt eine erhöhte Aktivitätskonzentration in der Periplasmafraktion, die mit 5035 U/l um den Faktor 3,5 höher ist als die des Wildtyps. Die Periplasmafraktion des Klons B1, der aus der 2. Error-prone PCR-Runde stammt und ein Abkömmling der Mutante 29 ist, zeigt eine um den Faktor 17 erhöhte Aktivitätskonzentration von 24659 U/l.

4.7.4 REINIGUNG DER PERIPLASMAFRAKTIONEN

Die Periplasmafraktionen der BAA und der Mutanten 29, 42 und B1 wurden bei 4 °C durch Zugabe eines Volumenteils Ethanol gefällt und in 50 mM Glycin/NaOH-Puffer (pH 9) aufgenommen. Durch Adsorption an lösliche Stärke, Waschen und Desorption wurden die α -Amylasen bis zur Homogenität gereinigt und über 30 kDa-Centricons 10-fach konzentriert. Proben aus den unterschiedlichen Reinigungsschritten wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Als Kontrolle diente kommerzielle BAA (BAN). In Abbildung 36 ist der Verlauf der Reinigung am Beispiel der Periplasmafraktion der Mutante 42 zu sehen.

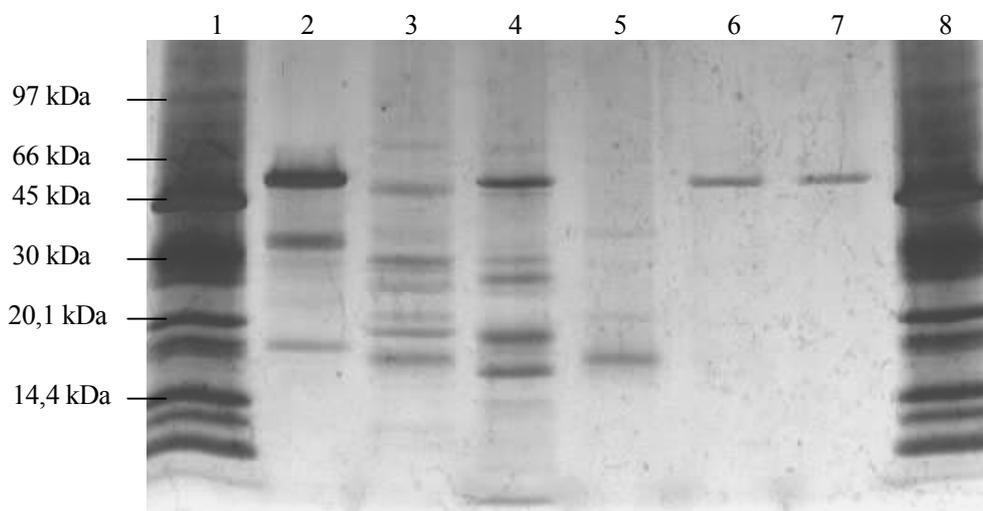


Abbildung 36: Aufreinigung der Periplasmafraktion der Mutante 42: Silbergefärbtes SDS-Gel. Spuren 1 und 8: LMW-Marker, Spur 2: BAN, Spur 3: Periplasmafraktion Mutante 42, Spur 4: Nach Ethanolfällung, Spur 5: Waschschrift, Spuren 6 und 7: Eluat aus Desorption, 10-fach konzentriert.

4.7.5 SPEZIFISCHE AKTIVITÄT

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden die bis zur Homogenität gereinigten Enzymlösungen verwendet. Die Bestimmung der Aktivität wurde in entsprechend verdünnten

Lösungen (<1000 U/l) mit dem Phadebas[®]-Schnelltest durchgeführt. Die Proteinmenge wurde unter Verwendung des BCA Kits mit BSA als Standard bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten ergeben sich als der Quotient aus der Aktivität z und der Enzymmasse m_E und sind in Abbildung 37 dargestellt.

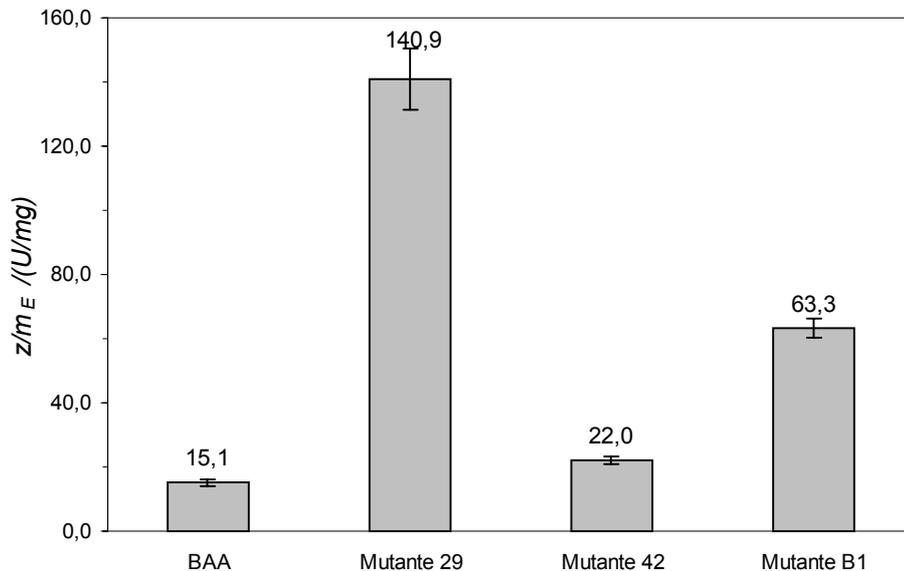


Abbildung 37: Spezifische Aktivitäten z/m_E des BAA-Wildtyps und der Mutanten 29, 42 und B1.

Die spezifische Aktivität der Mutante 29 liegt mit 141 U/mg um den Faktor 9,3 höher als die des Wildtyps mit 15 U/mg. Auch die spezifischen Aktivitäten der Mutanten 42 und B1 sind mit 22 U/mg und 63 U/mg um den Faktor 1,5 bzw. 4,2 höher als die des Wildtyps.

4.7.6 PH-PROFILE

Zur Bestimmung der α -Amylaseaktivität bei verschiedenen pH-Werten wurde der Phadebas[®]-Assay mit den Periplasmafraktionen von BAA-WT und den Mutanten 29, 42 und B1 entsprechend verdünnt in 50 mM Puffer des jeweiligen pH-Wertes durchgeführt.

Um zu zeigen, dass Matrixeffekte die Testergebnisse nicht beeinflussen, wurden zudem die pH-Profile von BAN, einer kommerziellen BAA-Zubereitung und von gereinigter Mutante 42 aufgenommen. Die gemessenen Aktivitäten z bzw. Aktivitätskonzentrationen b wurden auf das jeweilige Aktivitätsmaximum z_{max} bzw. die maximale Aktivitätskonzentration b_{max} bezogen und so die relativen Aktivitäten erhalten, die in Abbildung 38 dargestellt sind.

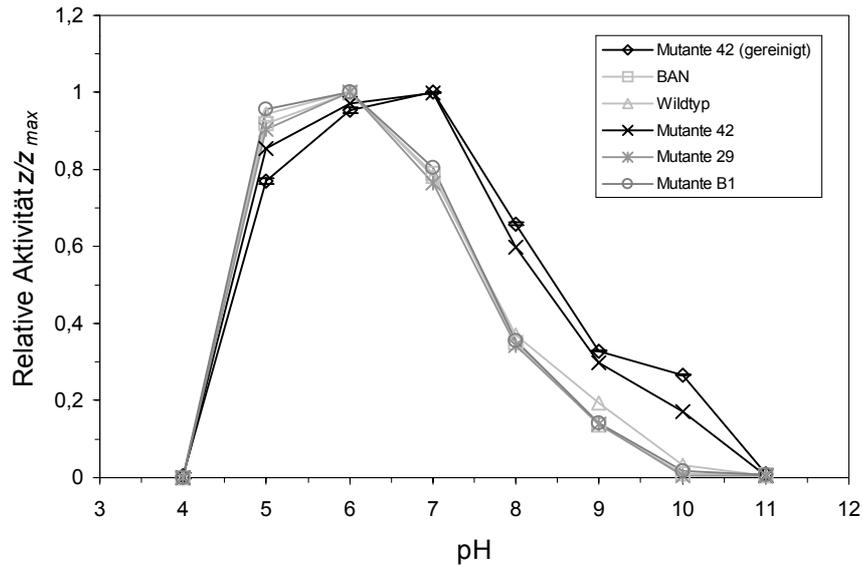


Abbildung 38: pH-Profile der Mutanten 29, 42 und B1 sowie des BAA WT und der kommerziellen BAN. Zudem wurde das pH-Profil von gereinigter Mutante 42 aufgenommen.

Während die Mutanten 29 und B1 ein weitgehend dem Wildtyp identisches pH-Profil zeigen, ist das der Mutante 42 im Vergleich zum Wildtyp deutlich verbreitert (Abbildung 38). Der optimale pH der Mutante 42 wurde von pH 6 um eine pH-Einheit zu pH 7 verschoben. Die relative Aktivität der Mutante 42 bei pH 5 beträgt 90% der relativen Aktivität des Wildtyps. Im alkalischen Bereich besitzt sie somit deutlich höhere relative Aktivitäten als der Wildtyp. Die relative Aktivität bei pH 8 ist 1,5 mal höher als die des Wildtyps, die relative Aktivität bei pH 9 und 10 sogar doppelt bzw. dreimal so hoch. Alle Enzyme besitzen nur noch Restaktivität bei pH 11.

5 DISKUSSION

5.1 BAA-EXPRESSION

Die Expression des BAA-Gens erfolgte in den *E. coli*-Stämmen DH5 α und XL1-Blue unter der Kontrolle des λ -Promotors des Plasmids pCYTBAA-WT und des Rhamnose-Promotors des Plasmids pGBAA-WT. Durch die Kotransformation von pGBAA-WT und dem Plasmid pJL3 sollte durch Expression des BRP-Gens die Sekretion der BAA ins Medium erreicht werden. Die Plasmide pJL3 und pCYTBAA-WT sind zueinander inkompatibel, da das Plasmid pJL3 bei den für die Expression der BAA unter Kontrolle des hitzeinduzierbaren λ -Promotors benötigten Temperaturen >37 °C instabil ist. Dadurch war die Sekretion der BAA ins Medium nicht möglich.

Die Expression des BAA-Gens unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors im Plasmid pGBAA-WT erlaubt die effektive funktionelle Expression der BAA in *E. coli*. Die Aktivitätskonzentration der Periplasmafraktionen aus DH5 α (pGBAA-WT)-Kulturen ist mit 381 U/l im Vergleich zu denen aus DH5 α (pCYTBAA-WT)-Kulturen mit 139 U/l um den Faktor 2,7 höher. Daraus folgt, dass die Expression des BAA-Gens unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors zu größeren Mengen an aktiver α -Amylase führt als unter der Kontrolle des λ -Promotors. Allerdings zeigen DH5 α (pGBAA-WT)-Kulturen auch ohne Induktion der BAA-Expression eine deutliche Aktivitätskonzentration von 456 U/l in den Periplasmafraktionen, die auf eine signifikante Basalexpression zurück zu führen ist. Da DH5 α (pCYTBAA-WT)-Kulturen dieses Verhalten nicht in diesem Ausmass zeigen, liegt der Schluss nahe, dass die hohe Basalexpression in DH5 α (pGBAA-WT)-Kulturen vom verwendeten Promotorsystem abhängt. Der λ -Promotor wird ausschließlich durch einen Temperaturshift auf 42 °C induziert und ist somit unabhängig von der Anwesenheit von Induktormolekülen. Die Expression von Genen unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors hingegen wird durch Rhamnose induziert.

Der Rhamnose-Promotor ist wie der Arabinosepromotor ein doppelt positiv-negativ regulierter Promotor. Das Arabinosepromotorsystem besteht aus dem *araC* Gen, das für den Regulator kodiert, dem Promotor P_{ara} , dem Operator O_{ara} und dem Initiator I_{ara} . In Abwesenheit von Arabinose agiert der Regulator als Inhibitor indem er an den Operator bindet und so die Transkription blockiert. Arabinose bindet an den Regulator, der daraufhin seine Konformation ändert und an den Promotor bindet und so als Modulator agiert. Im Falle

sehr geringen Mengen exprimiert wird (Henke 2001). Dies unterstützt die Annahme, dass es sich im Fall der BAA um eine genabhängige Rückkopplungsreaktion handeln könnte.

Die α -Amylaseaktivität in den Periplasmafraktionen aus XL1-Blue (pGBAA-WT)-Kulturen (466 U/l) ist mit denen aus DH5 α (pGBAA-WT)-Kulturen vergleichbar. Auch hier tritt eine signifikante Basalexpression (378 U/l) in Kulturen ohne Induktorzugabe auf, die auf die gleichen Gründe zurückzuführen ist, die aber im Gegensatz zu DH5 α (pGBAA-WT)-Kulturen niedriger ist als in induzierten XL1-Blue (pGBAA-WT) Kulturen. Die Gründe hierfür sind unklar.

Durch die Kotransformation des Plasmids pJL3 und die damit verbundene Koexpression von BRP nach Induktion mit IPTG war es möglich, eine deutliche α -Amylaseaktivität im Überstand zu detektieren. Induzierte XL1-Blue (pGBAA-WT, pJL3) Kulturen zeigen eine deutliche α -Amylaseaktivitätskonzentration im Überstand von 116 U/l, die sich im Bereich der Aktivitätskonzentration von Periplasmafraktionen von *E. coli* DH5 α (pCYTBAA-WT) Kulturen bewegt. Allerdings war auch im Falle von nichtinduzierten XL1-Blue (pGBAA-WT, pJL3) Kulturen eine Aktivitätskonzentration von 256 U/l im Überstand und zu einer Aktivitätskonzentration von 258 U/l im Periplasma meßbar. Das ist niedriger als die bei XL1-Blue (pGBAA-WT) Kulturen, macht aber in der Summe eine erhöhte Aktivität aus. Die Aktivitätskonzentration der Periplasmafraktion von induzierten XL1-Blue (pGBAA-WT, pJL3) Kulturen ist mit 799 U/l allerdings um den Faktor 5,7 größer als die der Periplasmafraktionen von DH5 α (pCYTBAA-WT) Kulturen und immerhin noch 1,7 größer als die Periplasmafraktionen aus XL1-Blue (pGBAA-WT) Kulturen.

Dieses Ergebnis läßt den Schluss zu, dass die BRP-Koexpression nicht nur die äußere Membran der *E. coli*-Zellen permeabilisiert, sondern auch einen Einfluss auf die innere Membran hat, und somit die Translokation der BAA in das Periplasma erleichtert. Die erhöhte Permeabilität der äußeren Membran und die damit verbundene geringere Konzentration von Proteinen erleichtert zudem vermutlich die funktionale Faltung von Proteinen was wiederum einen positiven Einfluss auf die BAA-Konzentration im Periplasma hat.

In der Literatur sind weitere Expressionssysteme für die BAA beschrieben. Pretorius und Mitarbeiter (Pretorius *et al.* 1988) berichten die Expression der BAA unter der Kontrolle ihres eigenen Promotors in *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Bacillus subtilis*. In *E. coli* wurden Aktivitäten von 4000-22000 U/l in Periplasmafraktionen gemessen. Im Überstand wurden dagegen nur geringe Aktivitäten gemessen, was die Annahme unterstreicht, dass die

BAA im Periplasma von *E. coli* angereichert wird. Im Überstand von *S. cerevisiae*- und *B. subtilis*-Kulturen wurden Aktivitäten von 123000-125000 U/l gefunden.

Die heterologe Expression der BAA in *Lactobacillus planarum* führte zu einer α -Amylaseaktivität von 43-53 U/l im Kulturüberstand (Jones und Warner 1990).

Dies bedeutet, dass das vorliegende pGBAA, pJL3-Expressionssystem im Vergleich mit anderen Expressionssystemen in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *B. subtilis* eine geringere Aktivitätskonzentration an α -Amylase erzeugt, es werden jedoch höhere Aktivitätskonzentrationen als bei dem *L. planarum*-System erhalten. Zudem ist es das einzige Expressionssystem für die BAA in *E. coli*, das eine effektive Sekretion ins Medium ermöglicht. Gegenüber *S. cerevisiae* zeichnet sich das vorliegende Expressionssystem durch kürzere Regenerationszeiten aus. Im Vergleich zu *B. subtilis* und *S. cerevisiae* ist anzumerken, dass Klonierungs- und Mutagenesemethoden für das hier beschriebene Expressionssystem einfacher durchzuführen sind.

5.2 ASSAY

Die wichtigen Parameter für einen Assay sind die Empfindlichkeit, der maximale Fehler im linearen Bereich und die Standardabweichung. Durch die Vermessung von BAA-WT-Verdünnungsreihen mit dem DNS-Assay bzw. mit dem Phadebas[®]-Assay konnten sie für beide Testsysteme bestimmt werden. Der Phadebas[®]-Assay erwies sich als um den Faktor zwei empfindlicher als der DNS-Assay. Da zudem die maximalen Fehler im linearen Bereich identisch waren und sich die relativen Standardabweichungen der beiden Assays nur um 1% unterschieden, wurde das Screening im Mikrotiterplattenmaßstab unter Verwendung des Phadebas[®]-Assays aufgebaut.

Der für ein Screening im Mikrotiterplattenmaßstab modifizierte Phadebas[®]-Assay erlaubt die reproduzierbare Messung der α -Amylaseaktivitätskonzentration in Mikrotiterplatten im Bereich von 0-1000 U/l. Die relative Standardabweichung ist mit 0,8 – 7,3% (Durchschnitt 2,6%) für Assays in diesem Format sehr gering. Der Fehlerbereich von maximal 11,8% und der lineare Bereich von 0-1000 U/l bzw. 0-1 Absorptionseinheiten erlauben somit auch die reproduzierbare Detektion von kleinen Veränderungen in den Eigenschaften der BAA bzw. ihrer Mutanten. Zudem ist es möglich, auch relativ geringe Mengen an α -Amylase reproduzierbar zu messen, was eine Voraussetzung bei der Verwendung von Rohextrakten aus *E. coli*-Expressionenkulturen ist. Die Auftragung der einzelnen Messpunkte zeigt keinen Ringeffect an den äußeren Wells. Durch die Verwendung

von vollständig mit H₂O equilibrierten Inkubatoren und sorgfältiges Pipettieren kann der Einfluss diese Fehlerquelle weiter verringert werden.

Der vorliegende Assay ist zudem hoch flexibel in der Anwendung. Durch geeignete Wahl der Reaktionspuffer kann durch Zugabe von Detergenzien auf Aktivität bzw. Stabilität der Amylase gescreent werden. Auch die Wahl der Reaktionstemperatur kann im Bereich von 0-100 °C variiert werden. Somit ist der modifizierte Phadebas[®]-Assay im Mikrotiterplattenformat der erste Literatur bekannte Assay für α -Amylasen, der ein HTS im Mikrotiterplattenformat unter der Variation einer Vielzahl von Parametern ermöglicht.

Durch die Messung von α -Amylase inaktiven bzw. aktiven Klonen in Mikrotiterplatten konnte der Wildtypbereich für ein Screening definiert werden. Unter Einbeziehung des Hintergrundrauschens liegt dieser zwischen der Ursprungsgerade mit der Steigung 8 und einer Parallelen im Abstand 0,1. Die Steigung ist ein Maß für die Alkaliaktivität der BAA unter den vorherrschenden Bedingungen. Sie entspricht einer Restaktivität von 12,5% im Vergleich zu pH 7 und einer Restaktivität von 10% bei pH 10 im Vergleich zu pH 6, was, unter der Berücksichtigung der Messungenauigkeit, in Übereinstimmung mit den Literaturwerten von 4-10% ist (Granum 1979). Somit gibt der Phadebas[®]-Assay in dieser Form ein realistisches Bild der Aktivitätsverhältnisse bei pH 7 und pH 10 wieder.

Die Expression der BAA in Mikrotiterplatten erfolgte in Anwesenheit des BRP durch 40-stündige Inkubation bei 37 °C in Anwesenheit beider Induktoren. Obwohl IPTG zur BRP-Induktion schon zu Beginn zugesetzt wurde, wuchsen die Zellen und produzierten BAA, die in das Medium ausgeschleust wurde. Durch den anschließenden Frier-Tau-Zyklus wurden die Zellen zusätzlich aufgeschlossen. Dies geschah zwar nicht quantitativ, steigerte aber die α -Amylaseaktivität.

Die Messergebnisse der Wildtypkulturen zeigten eine Streuung über einen relativ großen Bereich, was vor allem durch das unterschiedliche Wachstums- und Expressionsverhalten zu erklären ist. Dies bestätigt die Annahme, dass es notwendig ist, auf zwei Parameter parallel zu screenen, um so Expressionseffekte ausschließen zu können. Zudem ermöglicht ein zweidimensionales Screening auch, das Verhalten der Gesamtaktivität während der Mutageneseexperimente zu beurteilen.

5.3 IDENTIFIKATION INTERESSANTER STELLEN

Durch den Vergleich von pI, pH-Optimum, Sequenz und Struktur wurde der Bereich G402-S404 gefunden, der in alkaliaktiven α -Amylasen deletiert ist. Die Einführung der

Deletion in das BAA-Gen führte zu einem Verlust der α -Amylaseaktivität. Auch die Mutation der zur Deletion benachbarten Aminosäuren brachte keinen Rückgewinn an Aktivität. Dies führt zu dem Schluss, dass diese Deletion nur in der Kombination mit weiteren, in der Sequenz und Struktur weiter entfernten Mutationen zu einer aktiven α -Amylase führt. Aus dem Sequenzvergleich der BAA mit den alkaliaktiven α -Amylasen geht hervor, dass zwar eine hohe Ähnlichkeit zwischen den Enzymen besteht, aber doch immerhin mehr als 60 von insgesamt 514 Aminosäuren verschieden sind. Da zudem die Aminosäuren G402-S404 in der Aminosäuresequenz der BStA ebenfalls deletiert sind (Abbildung 40), die BStA aber mit einem optimalen pH von 5,4-6,1 nicht zu den alkaliaktiven α -Amylasen gehört, ist zu bezweifeln, dass dieser Sequenzabschnitt einen Einfluss auf die Alkaliaktivität hat. Vielmehr scheint er ein Strukturmerkmal von α -Amylasen zu sein, die zur gleichen Familie gehören.

Allerdings wurde schon vorher gezeigt, dass es möglich ist, mit dieser Methode selektiv Aminosäuren zu finden, deren Substitution zu einer Verbesserung der Alkaliaktivität führen (Bessler 1999).

		400		410		420	
BAA	VFYGD	MYG	TKGT	SPKEI	PSL	KDN	IEPILKA 421
BStA	VFYGD	YYG	IP---	QYN	IPSL	KSK	IDPLLIA 424
Consensus	*****	**	---	****	*	*	* * *

Abbildung 40: Aminosäuresequenzvergleich der BAA mit der BStA.

5.4 ERROR-PRONE PCR

Unter Verwendung der Error-prone PCR wurden Mutationen in das BAA-Gen und die Gene der zwei BAA-Mutanten S201N und N297D eingeführt. Bei einer $MnCl_2$ -Konzentration von 60 μM im PCR-Ansatz lag die Mutationsrate bei 1/1500 bp, was ungefähr einer Mutation pro BAA-Gen entspricht. Die Inaktivierungsrate lag bei 30%, was bedeutet, dass inaktive Klone nicht nur durch die Einführung von Stop-Codons, sondern auch durch die Einführung negativer Mutationen erzeugt werden. Aus diesem Befund folgt ebenfalls, dass das BAA-Gen anfällig für die Inaktivierung durch Mutationen ist.

Neuere theoretische Untersuchungen von Miura und Mitarbeitern (Miura und Sonigo 2001) zeigen aber, dass für die Mutagenese von Genen höhere Mutationsraten und demnach auch höhere Inaktivierungsraten von Vorteil sind. Sie unterscheiden zwischen negativen, neutralen und positiven Mutationen und betrachten die Wahrscheinlichkeit der Einführung

positiver Mutationen E in Abhängigkeit der Mutationsrate m . Dazu wird ein Variabilitätsfaktor f definiert, der sich aus

$$f = 1 - \frac{K_A}{K_S}$$

berechnet, wobei K_A die Anzahl der Aminosäuren ist, deren Veränderung zu einem Verlust der Funktionalität führen würde und K_S die Gesamtzahl der Aminosäuren ist. Aus dem Aminosäuresequenzalignment mit den α -Amylasen BLA, LAMY, S707 und TS-23 kann K_A als die Zahl der konservierten Aminosäuren abgeschätzt werden, wobei sich $K_A=228$ ergibt. Mit $K_S=514$ ergibt sich $f=0,56$. Die Zahl der gesamten negativen Mutationsstellen k kann als

$$k = gf$$

berechnet werden, wobei g die Gesamtlänge des BAA-Gens, also $g=1545$ ist. Daraus ergibt sich $k=860$, was bedeutet, dass im BAA-Gen 860 Stellen existieren, deren Veränderung zu einem Verlust der Funktionalität führen würde.

Für den Fall der Einführung positiver Mutation geben Miura und Mitarbeiter folgende Formel an:

$$E(m) = a_1 a_2 \dots a_j m^j (1 - m)^k$$

Wobei $E(m)$ die Wahrscheinlichkeit zur Einführung einer positiven Mutation, m die Mutationsrate, j die Anzahl der positiven Mutationen und a_1 , a_2 und a_j polymerasespezifische Koeffizienten sind. Für den Fall der BAA ($k=860$) und der Einführung einer positiven Mutation ($j=1$) mit der *Taq*-Polymerase ($a_1=0,3$) ergibt sich eine Wahrscheinlichkeitsfunktion zur Einführung positiver Mutationen $E(m)$, die ihr Maximum bei $m=1,2 \cdot 10^{-3}$ und $E(m)=1,28 \cdot 10^{-4}$ hat. Das bedeutet, dass eine Mutationsrate von 1,2/1000 bp oder 1,9/1545 bp=1,9/BAA-Gen die höchste Wahrscheinlichkeit zur Einführung einer positiven Mutation bedingt.

Die in dieser Arbeit verwendete Mutationsrate von $m=6,67 \cdot 10^{-4}$ (1/1500 bp) ergibt eine Wahrscheinlichkeit für $E(6,5 \cdot 10^{-4})=1,13 \cdot 10^{-4}$, die um 12% niedriger liegt als die maximale Wahrscheinlichkeit und demnach auch zu positiven Mutationen führen sollte.

Mit Hilfe des Error-prone PCR Protokolls wurde eine 7200 Klone umfassende Mutantenbibliothek aufgebaut, die auf verbesserte Aktivität bei pH 10 gescreent wurde. Hierbei wurden 26 Klone als positiv bewertet und vollständig sequenziert. Davon besitzen 16 Klone tatsächlich eine veränderte Aminosäuresequenz.

Dass in dem Screening auch Wildtypklone als vermeintlich verbesserte Mutanten identifiziert wurden, hat vornehmlich seine Gründe in der Durchführung des Screenings. Jede

Expressions-MTP wurde zuerst komplett auf Aktivität bei pH 10 gescreent, anschließend wurde die verbleibende Flüssigkeitsmenge zur Aktivitätsmessung bei pH 7 verwendet. Dadurch kam es durch die Verwendung des Pipettierroboters und aufgrund des gesunkenen Flüssigkeitspegels zur Aufnahme von Zelldebris. Dadurch wurden die Messergebnisse bei pH 7 verfälscht, da eine niedrigere Aktivität gemessen wurde. Dieses Problem konnte durch die Modifikation des Pipettierprotokolls behoben werden, das dann für das Screening der Shuffling-Bibliothek, das Rescreening und das Screening der Retransformanden eingesetzt wurde.

Der lineare Messbereich des Assays erstreckt sich von 0-1 Absorptionseinheiten bzw. auf Aktivitäten von 1-1000 U/l. Das bedeutet, dass bei höheren Aktivitäten, wie sie im Laufe des Screenings gemessen wurden, der lineare Zusammenhang zwischen Aktivität bei pH 7 und pH 10 nicht mehr gegeben ist. Somit erscheinen Messpunkte mit einer Absorption von mehr als 1,5 bei pH 7 nach rechts verschoben und können somit im schlechtesten Fall rechts des Wildtypbereichs auftreten und so als positiv identifiziert werden. Abhilfe kann hier nur durch die Verwendung von geringeren Volumina an α -Amylase-haltiger Lösung oder einer Verdünnung derselbigen geschaffen werden.

Die 16 als positiv identifizierten Klone mit veränderten Aminosäuresequenzen zeigen, dass es möglich ist, aus einer Bibliothek, die mit 80%iger Wahrscheinlichkeit jede Einfachmutation enthält, positive Klone zu finden. Somit scheint es nicht unbedingt notwendig zu sein, Bibliotheken aufzubauen, die jede Einfachmutation mit 95%iger oder höherer Wahrscheinlichkeit enthalten. Allerdings ist dann auch der Sequenzraum weniger dicht abgedeckt. Auch für weitere Rekombinationsexperimente zur Untersuchung der Additivität der Einzelmutationen ist nur eine begrenzte Menge an Ausgangsgenen notwendig, da der Mutagenese-Rekombinationszyklus mehrfach durchlaufen werden kann.

Dies ist allerdings nur möglich, wenn das Gen durch Mehrfachmutationen verbessert werden kann, was vor allem dann der Fall ist, wenn wenig ausgeprägte Eigenschaften verbessert werden, wie zum Beispiel die Aktivität der BAA bei pH 10. Sollen schon ausgeprägte Eigenschaften verbessert werden, werden mehr Mutationen zu einer Verschlechterung führen, was wiederum zu einer verringerten Wahrscheinlichkeit führt, verbesserte Mutanten zu finden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, größere Bibliotheken anzulegen und zu durchmustern.

Die Sequenzen der 16 verbesserten Klone zeigen 1-4 Mutationen, wobei 12 Mutanten eine Mutation, drei Mutanten zwei und eine Mutante drei Mutationen tragen.

Dabei zeigt sich, dass offensichtlich manche Mutationen bevorzugt sind. So tritt zum Beispiel die Mutation an der Stelle 505 in den Klonen 2, 4 und 8 auf. Die Mutationen $K \rightarrow N$ und $K \rightarrow R$ treten zweimal bzw. dreimal bei verschiedenen Klonen auf. So findet man sie in den Klonen 6 und 8 bzw. 4, 17 und 25.

Vergleicht man die Lage der Mutationen mit einem Alignment der BAA mit BLA, LAMY, S707 und TS-23, so kann man sie in drei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe gehören Mutationen, die an konservierten Positionen eingeführt wurden. Dazu gehören die Mutationen K100N (Klon 6), W194R (Klon 18), K205R (Klon 25) und D233V (Klon 23). Den Einfluss dieser Mutationen kann man nicht ohne weitere Experimente bestimmen. Ausgehend von der Annahme, dass konservierte Regionen essentiell für die Funktion der α -Amylase sind, ist es bemerkenswert, dass Mutationen an eben diesen Stellen nicht notwendigerweise zur Inaktivierung führen.

Die zweite Gruppe enthält Mutationen, die an nicht konservierten Positionen eingeführt wurden. Im Klon 8 wurde N153 durch H ersetzt. Die alkaliaktiven α -Amylasen besitzen hier ebenfalls ein N, BLA ein D. Im Klon 2 wurde H185 durch L ersetzt. Die alkaliaktiven α -Amylasen besitzen hier ein R, das wie H aber im Gegensatz zu L zu den positiv geladenen Aminosäuren gehört. Klon 17 trägt die Mutation K199R, die in S707 ebenfalls enthalten ist, nicht aber in LAMY und TS-23. Die Mutation Y229N ist in der Gensequenz des Klons 11 eingeführt. Die alkaliaktiven α -Amylasen besitzen an dieser Position ein F oder Y.

Der Klon 26 trägt die Mutation Q312H, die in den alkaliaktiven α -Amylasen LAMY und S707 genauso wie in BLA auftritt. Diese Mutation tritt aber nicht in TS-23 auf, vielmehr besitzt TS-23 an dieser Stelle ein M. Die Mutation E356D im Klon 19 tritt in allen alkaliaktiven α -Amylasen und der BLA auf. Im Klon 4 ist K406 wie bei der BLA durch ein R ersetzt. Diese Mutation liegt in dem Bereich, der bei den alkaliaktiven α -Amylasen deletiert ist. Der Klon 1 trägt die Mutation N414S. Die BLA sowie die alkaliaktiven α -Amylasen besitzen an dieser Position ein K. Gleich dreimal tritt in den sequenzierten Klonen der Error-prone PCR eine Mutation an der Stelle 505 auf. In den Klonen 2 und 8 ist das D durch ein N und im Klon 4 durch ein H ersetzt. Die anderen α -Amylasen im Alignment besitzen hier ein G.

Der Klon 8 schließlich, trägt die Mutation K514N. Diese Aminosäure ist in den Aminosäuresequenzen der S707 und TS-23 ein K. In der Aminosäuresequenz der LAMY ist an dieser Stelle ein Q, in der BLA ein R.

Die dritte Gruppe an Mutationen besteht aus R7Q und F11S (beide Klon 9) und C17R (Klon 20) sowie V32A (Klon 13), die allesamt im Signalpeptid oder am N-Terminus des

reifen Enzyms (V32A) lokalisiert sind. Dass Klone mit diesen Mutationen als positiv identifiziert wurden, liegt unter Umständen an einer besseren Translokation der BAA ins Periplasma (vgl. 6.9).

Die durch ortsspezifische Mutagenese entstandenen Klone S201N und N297D wurden ebenfalls als Template für die Error-prone PCR verwendet. Die Mutation S201N wurde in keinem positiven Klon gefunden, womit davon ausgegangen werden kann, dass diese Mutation nicht direkt zu weiter verbesserten Mutanten führt, sondern wahrscheinlich nur in Kombination mit weiteren Mutationen zu alkaliaktiveren BAA-Varianten führt. Die Mutation N297D wurde in den Klonen 2, 3 und 8 gefunden und trägt hier wahrscheinlich zur verbesserten Alkaliaktivität bei.

Um den Einfluss der einzelnen Mutationen auf die Alkaliaktivität bestimmen zu können, wurden die als positiv identifizierten Klone mittels DNA-Shuffling rekombiniert. Durch die Durchmusterung der Shuffling-Bibliothek nach verbesserten Klonen und anschließende DNA-Sequenzierung sollten positive Mutationen von neutralen und negativen unterschieden werden: positive Mutationen sollten in verbesserten Rekombinationsprodukten gehäufiger auftreten als andere Mutationen. Zudem können durch diese Vorgehensweise weiter verbesserte Mutanten gefunden werden, die durch die Kombination positiver Mutationen entstehen.

5.5 REKOMBINATIONSEXPERIMENTE

Das Shuffling von 12 Klonen aus der Error-prone PCR-Runde wurde zuerst nach dem Protokoll von Abécassis (Abécassis *et al.* 2000) durchgeführt. Von den erhaltenen Klonen zeigten nur noch 5% α -Amylaseaktivität, was einer Inaktivierungsrate von 95% entspricht. Da es mit einem derartigen Protokoll schwierig ist, eine Shufflingbibliothek effektiv aufzubauen, wurden verschiedene Parameter variiert, um die Inaktivierungsrate zu senken. Dazu wurde das Rekombinationsprotokoll verändert und der Einfluss längerer Fragmente und die Verwendung von *Pfu*-Polymerase untersucht.

Die Verwendung des neuen Rekombinationsprotokolls senkte die Inaktivierungsrate um 5%. Der Vorteil des neuen Rekombinationsprotokolls liegt aber in dem geringeren Zeitaufwand für die Durchführung (3 h anstatt 8 h), da anstatt der 6 Anlagerungsschritte von je 90 s nur noch 3 Schritte á 60 s nötig sind. Desweiteren wurde berücksichtigt, dass die PCR-Produkte von Schritt zu Schritt länger werden, indem die Extensionszeit bei jedem Zyklus um 5 s verlängert wurde. Die Variation der Fragmentlänge hatte keine Auswirkung auf die

Inaktivierungsrate. Eine deutliche Senkung der Inaktivierungsrate auf weniger als 80% gelang durch die Verwendung der *Pfu*-Polymerase. Da sie eine proof-reading Aktivität besitzt und deshalb ihre Mutationsrate um den Faktor 100 niedriger ist als die der *Taq*-Polymerase (Cline *et al.* 1996), werden während des Shufflings keine weiteren Mutationen eingeführt. Mit der proof-reading Aktivität verbunden ist auch eine Exonuklease-Aktivität, welche die Korrektur falsch rekombinierter Abschnitte erlaubt.

Es wurde eine Bibliothek von 10000 Klonen, davon 960 α -Amylase-aktiven Shuffling Klonen aufgebaut, die auf Klone mit verbesserter Aktivität bei pH 10 gescreent wurde. Dabei wurden 34 Klone mit gegenüber dem Wildtyp verbesserter Aktivität bei pH 10 gefunden, von denen 11 besser waren als die besten Klone aus der Error-prone Bibliothek. Bildet man die Quotienten der als positiv identifizierten Klone und der Gesamtzahl der Klone ergibt sich für die Error-prone PCR $16/7296=2,2*10^{-3}$ und für den Shuffling-Prozess $34/10000=3,4*10^{-3}$, was einem Faktor von ungefähr 2 entspricht. Dies spiegelt zum einen wieder, dass es einfacher ist, verbesserte Klone aus einem Pool von Mutanten zu finden, zum anderen, dass die Shuffling-Methode effizient in der Erzeugung neuer Funktionalität ist. Dies ist auch aus dem relativ hohen Anteil an Shuffling-Klonen mit verbesserter Aktivität bei pH 7 ersichtlich, die links des Wildtypbereichs liegen.

Durch ein Rescreening konnten aus den 34 gefundenen Klonen 6 gefiltert werden, die eine deutlich verbesserte Alkaliaktivität im Vergleich zu den anderen Klonen besitzen. Diese wurden retransformiert, analysiert und so die zwei weiter verbesserten Klone 42 und 29 gefunden. Die Tatsache, dass aber 32 Klone aus dem ersten Screening fälschlicherweise als alkaliaktiver eingestuft wurden, zeigt zum einen, dass das Screeningsystem noch optimiert werden muss, zum anderen wird aber auch die Bedeutung des Rescreenings und der Retransformation als essentieller Bestandteil des Screenings unterstrichen.

Es ist anzumerken, dass einige Klone, die im Screening Aktivität zeigten im Rescreening inaktiv waren, also ihre Absorptionen bei pH 7 und pH 10 kleiner als 0,05 Einheiten waren. Dies spiegelt ein allgemeines Problem der Stammhaltung und der Kultivierung wieder. Zwar sind alle Zellen, die aus dem selben Klon hervorgehen am Anfang in ihren Eigenschaften gleich, jedoch scheint sich nach einigen Reproduktionszyklen eine Differenzierung, z.B. durch Inhomogenität des Mediums, einzustellen. Bedeutet dies ein Defizit an Nährstoffen, könnten manche Zellen die Fähigkeit zur Expression des eingeschleusten Gens verlieren. Exprimierende Zellen hätten dann einen Wachstumsnachteil gegenüber nicht-exprimierenden, die aufgrund der geringeren Belastung des Stoffwechsels schneller wachsen könnten und so exprimierende Zellen überwachsen. Um dies zu verhindern

sollten Stockplatten nur kurz aufgetaut werden und Kulturen mit möglichst frisch ausplattierten Kolonien bzw. frischen Glycerolstocks angeimpft werden.

5.6 ERROR-PRONE PCR, 2TE GENERATION

Die Mutanten 29 und 42 dienten als Template für eine Error-prone PCR-Bibliothek von je 96 Klonen. Bei der Durchmusterung mit dem modifizierten Phadebas®-Assay zeigten drei Klone eine leicht verbesserte Aktivität bei pH 10 als die Vorlagen. Die DNA-Sequenzierung ergab bei zwei Klonen die Sequenz der Mutante 42. Die Mutante B1 hingegen besaß neben den Mutationen der Mutante 29 noch zwei weitere proteinogene Mutationen.

Durch das Screening einer sehr kleinen Bibliothek können also bei geeigneter Mutationsrate veränderte Klone gefunden werden. Allerdings ist der zugängliche Sequenzraum mitnichten abgedeckt, denn die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer bestimmten Mutation in einer Bibliothek von 96 Klonen ist mit 4% sehr gering. Dies spiegelt sich auch in der geringen Ausbeute von 3 Klonen, bzw. einer tatsächlich veränderten Mutante wieder.

5.7 CHARAKTERISIERUNG DER MUTANTEN

5.7.1 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG

Mutante 42

Der Klon 42 besitzt eine um den Faktor 1,5 erhöhte spezifische Aktivität. Die Aktivitätskonzentration in den Periplasmafraktionen ist um den Faktor 3,5 höher als beim Wildtyp. Das heißt, dass der F-Quotient für die Mutante 42 $3,5/1,5=2,3$ beträgt. Um diesen Zahlenwert wird die Mutante 42 besser exprimiert als der Wildtyp.

Der Klon 42 hat eine um den Faktor 4 erhöhte Aktivitätskonzentration im Periplasma und ein pH-Optimum bei pH 7, was einer Verschiebung um eine pH-Einheit nach rechts zu höheren pH-Werten entspricht. Zudem besitzt er eine zweifach höhere relative Aktivität bei pH 9 gegenüber dem Wildtyp und eine dreifach höhere relative Aktivität bei pH 10, was zusammen mit dem geringen Aktivitätsverlust bei pH 5 (20%) zu einem verbreiterten pH-Profil führt.

Mutante 29

Die Analyse des Klons 29 zeigt eine um den Faktor 42 erhöhte Aktivitätskonzentration in der Periplasmafraktion und eine um den Faktor 9 verbesserte spezifische Aktivität gegenüber dem Wildtyp. Durch Bildung des Quotienten aus diesen beiden Faktoren wird der F-Quotient als ein Maß für die Verbesserung der Expression/Translokation der Mutante 29 erhalten, der sich zu 4,7 ergibt. Dies bedeutet, dass die Mutationen im Gen der Mutante 29 nicht nur zu einer Verbesserung der spezifischen Aktivität sondern auch zu einer Verbesserung der Expression und Translokation der Mutante 29 führen. Das pH-Profil der Mutante 29 ist mit dem des Wildtyps weitgehend identisch.

Mutante B1

Die Aktivitätskonzentration in den Periplasmafraktionen von Kulturen der Mutante B1 sind um den Faktor 17 höher als von Periplasmafraktionen des Wildtyps. Da die spezifische Aktivität um den Faktor 4,2 gegenüber dem Wildtyp verbessert wird, ergibt sich der F-Quotient aus diesen beiden Faktoren zu 4,1. Da dieser Wert sich wenig von dem F-Quotienten der Mutante 29 (4,7) unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, dass die zwei zusätzlichen Mutationen der Mutante B1 die Expression/Translokation nicht beeinträchtigen. Allerdings ist auch das pH-Profil weitgehend mit dem des Wildtyps identisch.

5.7.2 SEQUENZ UND STAMMBAUM DER MUTANTEN: PHYLOGENETISCHE INTERPRETATION

Aus dem Vergleich der Sequenzdaten der Mutanten mit denen der Parentalstränge, lässt sich ein Stammbaum ableiten, der die Weitergabe von Mutationen vom Wildtyp und den Mutanten der ortsgerichteten Mutagenese über die Error-prone PCR-Klone zu den DNA-Shuffling-Klonen wiedergibt (Abbildung 41).

Mutante 42

Das Gen der Mutante 42 besitzt 5 proteinogene Mutationen, wovon die Mutation L13P in der Signalsequenz liegt und die Mutationen W194R, S197P, E356D und N414S im reifen Enzym liegen. Die Mutation L13P tritt ebenso in der Mutante 29 auf. Da keiner der Parentalstränge diese Mutation, liegt der Schluss nahe, dass die Mutation L13P während der ersten PCR oder in einem frühen Stadium der Rekombinations-PCR eingeführt wurde. Unter den proteinogenen Mutationen im reifen Protein sind drei Mutationen, die von drei unterschiedlichen Parentalsträngen übernommen wurden. Die Mutation W194R stammt vom

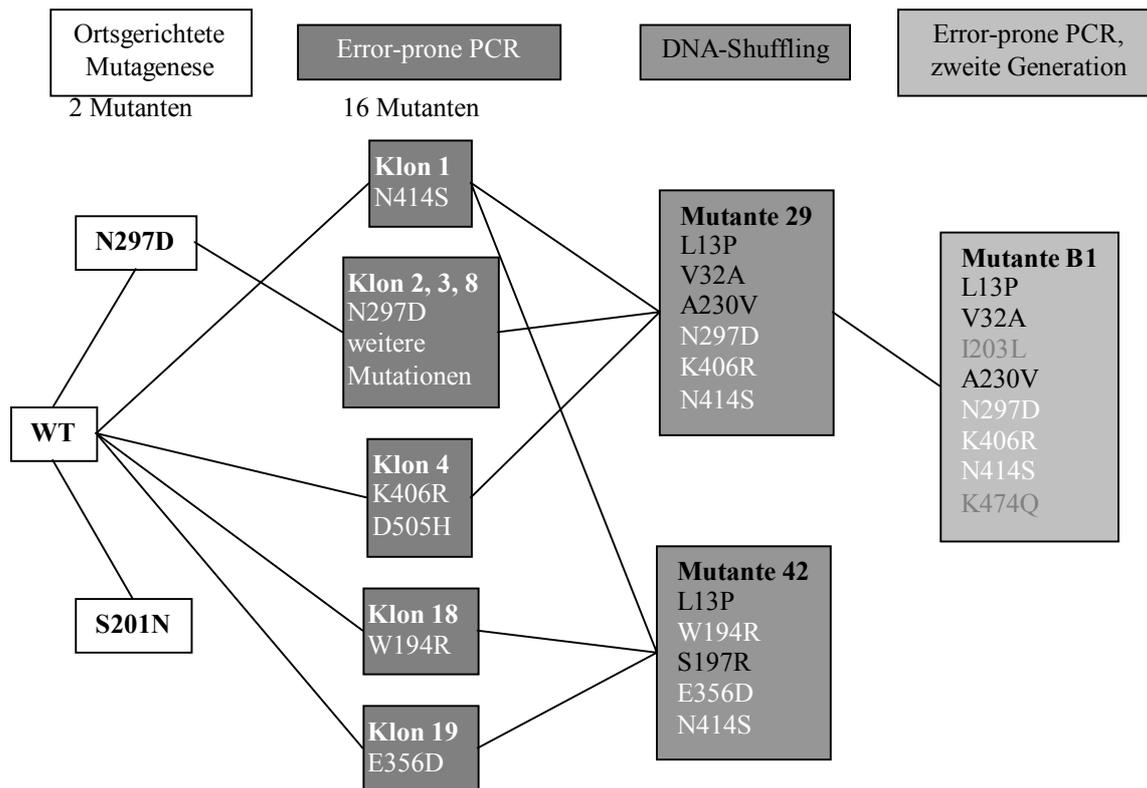


Abbildung 41: Stammbaum der Mutanten 29 und 42, die durch DNA-Shuffling erzeugt wurden sowie der Mutante B1, die durch Error-prone PCR mit der Mutante 29 als Template erhalten wurde.

Klon 18, die Mutation E356D wurde vom Klon 19 geerbt. Aus dem Klon 1 stammt die Mutation N414S. Die Mutation S197P tritt in keinem Parentalstrang auf und wurde demnach während des DNA-Shuffling-Prozesses eingeführt.

Mutante 29

In der Nukleotidsequenz der Mutante 29 befinden sich 6 proteinogene Mutationen. In der Signalsequenz liegt die Mutation L13P. Im reifen Enzym liegen neben der Mutation V32A, die den N-Terminus bildet, die Mutationen A230V, N297D, K406R und N414S vor. Die Mutante 29 und die Mutante 42 besitzen demnach zwei gemeinsame Mutationen: die Mutation L13P und die Mutation N414S. Die Mutation V32A stammt von dem Klon 13. Die Mutation A230V ist wie die Mutation L13P während des Shuffling-Prozesses erzeugt worden. Die Mutante N297D stammt von einem der rationalen Mutanten und wurde die Error-prone PCR-Klone 2, 3 oder 8 weitergegeben. Die Mutation N406R wurde vom Klon 4, die Mutation N414S, die auch in der Mutante 42 zu finden ist, wurde vom Klon 1 geerbt.

Mutante B1

Die Mutante B1 besitzt zusätzlich zu den Mutationen der Mutante 29 zwei weitere Mutationen: I203L und K474Q. Beide wurden während der zweiten Error-prone PCR-Runde eingeführt.

Allgemeine Betrachtung

Ein augenscheinliches Merkmal ist, dass nur ein Teil der Mutationen weitergegeben wurden. So tritt die Mutation S201N, die in den rationalen Mutanten zu einer verbesserten Alkaliaktivität führte, in den Error-prone PCR-Mutanten nicht mehr auf. Die Mutation N297D hingegen wurde in den Klonen 2, 3 und 8 gefunden. Von den 23 Mutationen der Error-prone PCR-Klone wurden 6 an die Mutanten 29 und 42 weitervererbt: V32A, N297D, K406R, N414S, W194R und E356D.

Unter der Voraussetzung, dass alle Mutationen als positive Mutationen, also Mutationen, die entweder die spezifische Aktivität oder die Alkaliaktivität steigern identifiziert wurden, heißt dies, dass die Kombination nur von einigen Mutationen zu einer weiteren Verbesserung führt. Wird zu Grunde gelegt, dass auch die Mutationen, die nicht weitervererbt wurden zu weiter verbesserten Enzymen führen, folgt, dass diese Mutationen eingeführt werden können, um das Enzym weiter zu verbessern. Es ist jedoch zu erwarten, dass nicht jede Kombination von Mutationen zu weiter verbesserten Mutanten führt.

5.7.3 SEQUENZ- UND STRUKTURANALYSE: FUNKTIONELLE INTERPRETATION

Durch den Vergleich der Sequenzdaten und Eigenschaften der Mutanten 42, 29 und B1 untereinander und mit denen des Wildtyps sowie weiteren homologen α -Amylasen können Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Mutation gezogen werden. Durch die Einbeziehung theoretischer Daten über die Veränderungen in der Proteinstruktur, die durch die Mutationen hervorgerufen werden, sollte es möglich sein, rudimentäre Struktur-Funktionsbeziehungen der einzelnen Mutationen abzuleiten.

Mutante 42

Die Mutation L13P befindet sich im Signalpeptid der Mutanten 42 und 29. Da beide Mutanten besser als der Wildtyp exprimiert bzw. translokiert werden, kann davon ausgegangen werden, dass die Mutation L13P einen Einfluss darauf hat. Es ist nicht zu erwarten, dass eine Mutation in der Signalsequenz, die während der Translokation ins Periplasma abgespalten wird einen Einfluss auf die spezifische Aktivität oder sogar das pH-

Profil hat. Da die Signalsequenzen homologer α -Amylasen eine sehr große Diversität aufweisen, ist es nicht möglich Rückschlüsse auf die Bedeutung dieser Mutation aufgrund eines Sequenzvergleichs zu ziehen.

Das Aminosäurealignment mit den α -Amylasen LAMY, S707, TS-23 und BLA zeigt, dass die Mutationen W194R und S197P der Mutante 42 in einem hochkonservierten Bereich liegen. Dieser Befund ist in zweierlei Hinsicht bemerkenswert. Zuerst bedeutet dies, dass auch hochkonservierte Bereiche mutiert werden können, ohne dass die Aktivität des Enzym verloren geht. Somit ist gezeigt, dass die Anzahl der nicht mutierbaren Aminosäuren nicht notwendigerweise aus einem Aminosäuresequenzalignment als die am meisten konservierten Aminosäuren angegeben werden kann. Somit muss die Berechnung des Variabilitätsfaktors aus der theoretischen Betrachtung der Error-prone PCR nach Miura neu überdacht werden (Miura und Sonigo 2001). Ein Ansatz wäre die Betrachtung weiter entfernt verwandter α -Amylasen. Ein so erzeugtes Alignment besäße dann jedoch unter Umständen Insertionen und Deletionen, die nicht mit in das theoretische Modell eingebunden werden können.

Zum zweiten sind Aminosäuren, die an der Oberfläche einer Struktur liegen, im direkten Kontakt mit dem Solvens. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Mutationen an der Oberfläche, W194R und S197P einen direkten Einfluss auf die Alkaliaktivität haben. Die Struktur weist diesen Bereich als eine Loop-Region an der Oberfläche der Mutante 42 in der Domäne B aus, der durch je eine Salzbrücke zwischen D195 und R198 bzw. D196 und K199 stabilisiert wird. Das Auftreten von Prolinen in ähnlichen Strukturen ist recht häufig. Somit verwundert es nicht, dass auch die Backbone-Winkel von P197 im erlaubten Bereich des Ramachandran-Plots liegen. Die Mutation S197P hat zudem Auswirkungen auf die Sterik und die Oberflächenladung. Da P197 einen geringeren sterischen Anspruch als S197 hat, wird die Salzbrücke D195-R198 gestärkt. Gleichzeitig verschwindet eine negative Ladung an der Oberfläche, wodurch dem Solvent eine Koordinationsmöglichkeit genommen wird. Die Mutation W194R ist schon durch ihre sterischen Auswirkungen interessant. Dies spiegelt sich auch in der theoretischen Struktur wieder, die für R194 eine von W194 vollkommen verschiedene Konformation zeigt. Da es sich hierbei um eine Mutation einer dem Solvent gut zugänglichen Aminosäure handelt, sind zur Beurteilung dieser Konformationsänderungen eingehende Molekulardynamik-Studien vonnöten.

Die Mutation E356D liegt im inneren der Struktur und tritt auch in den α -Amylasen BLA, LAMY, TS-23 und S707 auf, die allesamt eine bessere Alkaliaktivität haben als der BAA-Wildtyp. In der theoretischen Struktur des Wildtyps bildet E356 eine Wasserstoffbrücke zu T360 aus. In der Mutante 42 zeigt D356 aufgrund seines sterischen Anspruchs in

die Richtung von K375. Da zwischen diesen beiden Resten sowohl eine Salzbrücke als auch eine Wasserstoff-Brücke ausgebildet werden kann, ist eine Stabilisierung im Inneren der Struktur wahrscheinlich. Auch dies ist ein starkes Indiz dafür, dass diese Mutation wahrscheinlich zu einer verbesserten Alkaliaktivität führt.

Die Mutation N414S, die auch in der Mutante 29 auftritt, liegt an einer Stelle, bei der die α -Amylasen BLA, LAMY, S707 und TS-23 ein K besitzen. Da die Mutante 42 eine verbesserte Alkaliaktivität besitzt, die Mutante 29 aber nicht, hat diese Mutation wahrscheinlich keinen Einfluss auf das pH-Profil. Da beide Mutanten aber eine erhöhte spezifische Aktivität besitzen, scheint die Mutation N414S hierfür verantwortlich zu sein. Aus der theoretischen Struktur ist ersichtlich, dass durch die Mutation N414S das negative Dipolmoment an dieser Stelle verringert wird, was zu einer geringeren Repulsion mit D413 führt. Zudem könnte S414 theoretisch eine Wasserstoffbrücke zu D413 ausbilden, was die Sekundärstruktur zudem stabilisieren würde. In wieweit diese Stabilisierung zu der Erhöhung der spezifischen Aktivität beiträgt, müsste durch eine eingehende molekulardynamische Untersuchung untersucht werden.

Mutante 29

Von den beiden Mutationen L13P und V32A, die in der Signalsequenz der Mutante 29 bzw. am N-Terminus des reifen Enzyms liegen, wurde erstere schon im Abschnitt über die Mutante 42 diskutiert. Zweitere befindet sich an der Schnittstelle zwischen der Signalsequenz und dem reifen Enzym. Da die Mutante 29 doppelt so gut exprimiert wird wie die Mutante 42, trägt die Mutation V32A vermutlich ebenfalls zu einer verbesserten Expression/Translokation bei. Erkennungssequenzen für die Signalpeptidase von *E. coli* beinhalten kleine, ungeladene Aminosäuren an der ersten und der dritten Position (P1 bzw. P3) im reifen Protein. Wobei Alanin-Reste die häufigsten Aminosäuren an der P1 und P3-Position sind, woraus von Heijne die Ala-X-Ala-Regel abgeleitet (von Heijne 1985), die auch für Signalpeptidasen anderer Prokaryoten gültig ist. Weitere häufig auftretende Aminosäuren an diesen Positionen sind Glycin und Serin an P1 und Serin, Glycin, Leucin und Cystein an P3 (Izard und Kendall 1994; Karamyshev *et al.* 1998), weniger häufig treten dagegen Valin und Isoleucin auf (Izard und Kendall 1994). Die Mutation V32A bedeutet also die Substitution der nicht favorisierten Aminosäure Valin durch die bevorzugte Aminosäure Alanin in der Erkennungssequenz der Signalpeptidase, woraus wohl eine effektivere Abspaltung der Signalsequenz resultiert. Durch N-terminale Sequenzierung von aus dem Periplasma isolierter α -Amylase könnte hierfür der Beweis erbracht werden.

Die Mutation A230V ist in den Aminosäuresequenzen der BLA, LAMY, S707 und TS-23 konserviert. Ihre Nähe zum aktiven Zentrum macht sie zudem interessant. Durch die Substitution von A durch V wird der Raum zwischen K135, W184, F179 und F189 besser ausgefüllt, wodurch der Kettenabschnitt, auf dem V230 liegt, Richtung katalytisches Zentrum gedrückt werden könnte. Es wäre interessant, durch längere Dynamiksimulationen das Verhalten dieser Region und die Auswirkung auf das katalytische Zentrum zu untersuchen.

Die Mutation N297D bewirkte in der rationalen Mutante eine leicht erhöhte Aktivität bei pH 10, die sich in der Mutante 29 nicht wiederfand. Dies deutet darauf hin, dass diese Eigenschaft durch die Anwesenheit der anderen drei Mutationen A230V, K406R und N414S kompensiert wird. Somit liegt hier ein Fall vor, bei dem die Kombination potentiell positiver Mutationen nicht zu einer Verbesserung des gewünschten Parameters, der Alkaliaktivität führt, sondern vielmehr ein ganz anderer Parameter, nämlich die spezifische Aktivität deutlich verbessert wird.

Durch die Substitution von K406 durch R406 in der Mutante 29 ändert sich der pKs-Wert an dieser Stelle von 10,54 auf 12,48. Die gleiche Aminosäure tritt an dieser Stelle auch in der Aminosäuresequenz der BLA auf. In den Aminosäuresequenzen der alkaliaktiven α -Amylasen ist dieser Bereich deletiert. Die Strukturbetrachtung dieser Mutation und ihrer Umgebung bringt keine Erkenntnisse über die Struktur-Funktionsbeziehung für diese Mutation und den Zusammenhang mit der erhöhten spezifischen Aktivität der Mutante 29.

Der positive Einfluss der Mutation N414S auf die spezifische Aktivität wurde schon im Abschnitt über die Mutante 42 besprochen.

Mutante B1

Zusätzlich zu den Mutationen der Mutante 29 besitzt die Mutante B1 zwei weitere proteinogene Mutationen: I203L und K474Q. Die Mutation I203L liegt in einem konservierten Bereich. Die Mutation K474Q tritt in dieser Form auch in der BLA auf, die alkaliaktive TS-23 besitzt, wie der BAA-Wildtyp an dieser Stelle ein K. Daraus lässt sich schliessen, dass vor allem die Mutation I203L zu der niedrigeren spezifischen Aktivität gegenüber der Mutante 29 führt. Einen Hinweis gibt zudem die Betrachtung der theoretischen Struktur von Mutante 29 und Mutante B1. Der Abstand von I203 zu D193 beträgt 3,42 Å für die Mutante 29, dagegen ist der Abstand zwischen L203 und D193 in der Mutante B1 mit 3,18 Å geringer und somit die van-der-Waals-Abstoßung größer, was zu einer Destabilisierung der Struktur der Mutante B1 führen könnte. Gleichzeitig verringert sich der

Abstand zwischen I203 bzw. L203 zu R154 von 3,45 Å auf 2,70 Å, was zu einer Schwächung der Anziehungskräfte zwischen R154 und D193 führt.

Da die Mutation K474Q auch in der BLA auftritt und diese α -Amylase eine vergleichbare spezifische Aktivität wie die BAA besitzt (Maassen 1991), ist zu bezweifeln, dass diese für die Verringerung der spezifischen Aktivität verantwortlich ist. Auch der Vergleich der theoretischen Strukturen der Mutante 29 und der Mutante B1 zeigt keine eindeutige Tendenz. Zwar verliert die Mutante B1 durch die Substitution von K474 mit Q die Möglichkeit, eine Salzbrücke zu E445 bzw. D446 auszubilden, jedoch ändert sich an der Zugänglichkeit des Bereichs unter der Aminosäure 474 für das Solvent nichts, wie aus der Oberflächendarstellung zu sehen ist.

5.7.4 SCHLUSSFOLGERUNG

Der Ansatz der gerichteten Evolution erlaubt die parallele Verbesserung mehrerer Eigenschaften, wie im vorliegenden Fall die Verbesserung der Alkaliaktivität, der spezifischen Aktivität und der Prozessierung. In der Mutante 42 bewirken die Mutationen L13P, W194R, S197P, E356D und N414S eine Verbesserung der Alkaliaktivität und der spezifischen Aktivität, sowie der Expression/Translokation. Somit ist gezeigt, dass mehrere positive Mutationen additiv zusammen wirken können um so zu einer Verbesserung einer oder mehrerer Eigenschaften zu führen. Ein Beispiel, dass dies nicht immer der Fall sein muss, ist die Mutante 29. Durch die Einführung der Mutationen A230V, K406R und N414S geht die durch die Mutation N297D bewirkte Alkaliaktivität verloren. Jedoch verbessern diese Mutationen zusammen die spezifische Aktivität. Die Mutationen L13P und V32A führen zu einer stark verbesserten Prozessierung der α -Amylase.

Aus der theoretischen Betrachtung kann die Funktion jeder einzelnen Mutation in diesen Experimenten nicht eindeutig determiniert werden. Vielmehr müssten diese einzeln in das Wildtypgen der BAA eingeführt werden und jede Einfachmutante analysiert werden. Desweiteren müssten alle Kombinationen der hier diskutierten Mutationen *in vitro* und *in silico* untersucht werden um die Additivität der einzelnen Mutationen zu bestimmen, da davon auszugehen ist, dass nicht eine einzelne Mutation, sondern die Gesamtheit der Mutationen zu den verbesserten Eigenschaften führt. Hieraus könnten dann Regeln aufgestellt werden, die die theoretische Vorhersage zur Verbesserung der BAA durch Kombinationen von Mutationen ermöglicht. Allerdings konnten durch diese Experimente grundlegende Ideen

zur Verbesserung der Alkaliaktivität und spezifischen Aktivität der BAA im Besonderen und α -Amylasen im Allgemeinen vorgestellt werden.

In der Literatur sind viele Beispiele für die Veränderung von der BAA verwandten α -Amylasen beschrieben. Die Veränderung des pH-Profiles gelang Takase (Takase 1993) durch zielgerichtete Mutagenese von Aminosäuren nahe des katalytischen Zentrums der *Bacillus stearothermophilus* α -Amylase. Zudem besaßen einige Mutanten veränderte Temperaturprofile. Shaw (Shaw *et al.* 1999) erhielt durch gerichtete Evolution der *Bacillus licheniformis* α -Amylase (BLA) Mutanten mit verbesserter Stabilität bei saurem pH, wobei er ausschließlich Mutationen fand, die entweder in der Aminosäuresequenz der BAA oder der BStA vorhanden waren. Nielsen (Nielsen *et al.* 1999; Nielsen *et al.* 2001) versuchte durch die Einflussnahme auf die Elektrostatik am katalytischen Zentrum durch zielgerichtete Mutagenese das pH-Profil der BLA zu verändern. Allerdings zeigte keine der Mutanten ein deutlich verändertes pH-Profil, wohingegen einige eine erhöhte spezifische Aktivität besaßen. Die Mutationen, die dies bewirkten lagen in der Nähe des aktiven Zentrums, in dieser Arbeit wurden Mutationen mit gleicher Wirkung abseits des aktiven Zentrums beschrieben.

Die Verbesserung der Prozessierung durch Mutationen in der Signalsequenz der BStA wurde von Suominen und Mitarbeitern (Suominen *et al.* 1995) untersucht. Es wurde erkannt, dass Signalpeptide von Enzymen in *Bacillus* und *E. coli* nicht an der gleichen Stelle geschnitten werden. Eine verbesserte Prozessierung wurde hier von Erkennungssequenzen bewirkt, welche die Ala-X-Ala-Regel erfüllen (von Heijne 1985).

Somit stellt die erfolgreiche Verbesserung der Alkaliaktivität der BAA durch gerichtete Evolution die erste ihrer Art dar. Außerdem gelang erstmals die effektive Verbesserung der Prozessierung und der spezifischen Aktivität einer mikrobiellen α -Amylase mittels gerichteter Evolution.

5.7.5 AUSBLICK

In weiteren Arbeiten muss geklärt werden, welchen Einfluss die einzelnen Mutationen auf die Expression/Translokation, die spezifische Aktivität und das pH-Spektrum haben. Hieraus können weitere Struktur-Funktionsbeziehungen zur Verbesserung der Alkaliaktivität und der spezifischen Aktivität erhalten werden. Durch Kombination der einzelnen Mutationen könnten dann noch bessere α -Amylasen erzeugt werden. Zudem könnten auch zusätzliche Mutagenese- und Rekombinationsrunden durchlaufen werden um die Alkaliaktivität weiterhin

zu verbessern. Hierzu stellen die Mutante 29 und besonders die Mutante 42 erfolgsversprechende Startpunkte dar.

6 ANHANG

6.1 HERLEITUNG DER WAHRSCHEINLICHKEITSVERTEILUNG VON MUTANTEN BEI DER ERROR-PRONE PCR

Das vorliegende Modell setzt die Nicht-Unterscheidbarkeit von Mutationen und die Äquivalenz der Positionen auf der Basensequenz voraus. Betrachtet wird nur das Produkt der Error-prone PCR und nicht der Entstehungsprozess. Dieses Modell wird deshalb auch statisches Modell genannt. Zudem werden methodische Parameter, wie die unterschiedliche Anzahl an Transversionen und Transitionen nicht berücksichtigt. Eine präzise Methode, die diese und weitere Parameter berücksichtigt ist in Moore und Maranas (Moore und Maranas 2000) dargestellt. Beide Methoden sollten tendenziell ähnliche Werte liefern.

Gegeben sei ein Gen der Länge L in einem Error-prone PCR-Experiment, unter der Verwendung der Mutationsrate m . Für jede Position auf dem Gen wird mit der Wahrscheinlichkeit m eine Mutation eingeführt, bzw. mit der Wahrscheinlichkeit $(1-m)$ bleibt diese Position unmutiert. Für die Einführung von n Mutationen gilt demnach die Wahrscheinlichkeit:

$$m^n (1-m)^{(L-n)}$$

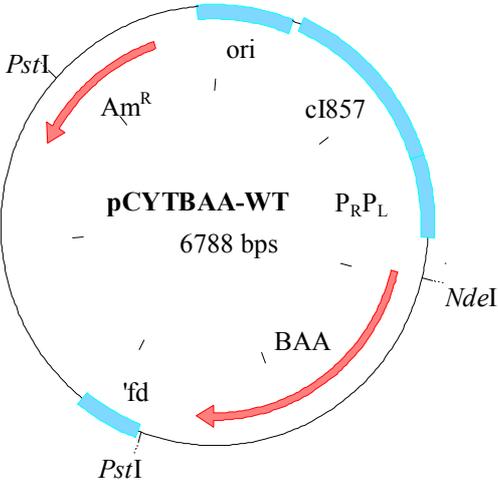
Die Anzahl der Kombinationen von n Mutationen ist durch die Binomialverteilung gegeben. Somit folgt für die Wahrscheinlichkeit $P_{L,m}(n)$ einer n -fach Mutante:

$$P_{L,m}(n) = \binom{L}{n} m^n (1-m)^{(L-n)}$$

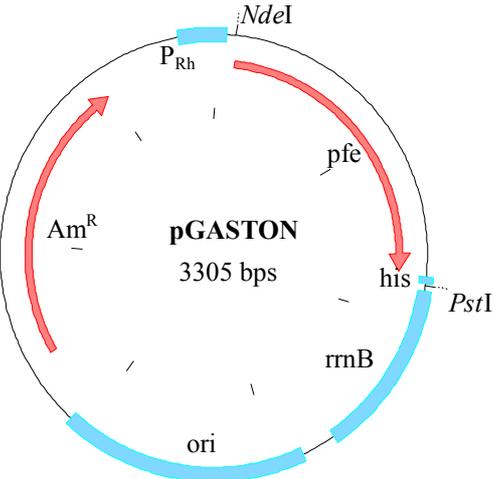
Einen vergleichbaren Ausdruck erhalten (Miura und Sonigo 2001) für die Wahrscheinlichkeit zur Einführung positiver Mutationen.

6.2 PLASMIDE

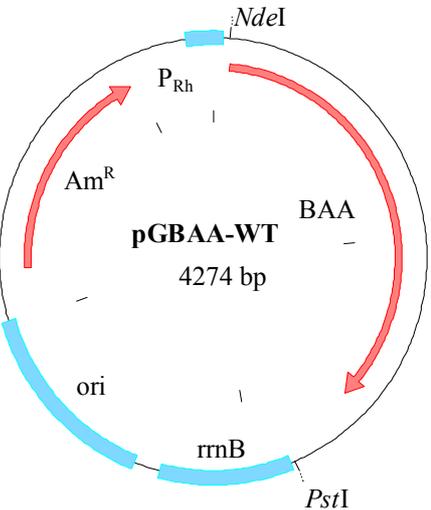
6.2.1 pCYTBAA-WT



6.2.2 pGASTON



6.2.3 pGBAA-WT



6.3 DNA-SEQUENZ VON PGBAA-WT

```

1   atgattcaaa aacgaaagcg gacagtttcg ttcagacttg tgcttatgtg cacgctgtta
61  tttgtcagtt tgccgattac aaaaacatca gccgtaaagt gcacgctgat gcagtatctt
121 gaatggtata cgccgaacga cggccagcat tggaaacgat tgcagaatga tgcggaacat
181 ttatcggata tcggaatcac tgccgtctgg attcctcccg catacaaagg attgagccaa
241 tccgataacg gatacggacc ttatgatttg tatgatttag gagaattcca gcaaaaaggg
301 acggtcagaa cgaaatacgg cacaaaatca gagcttcaag atgcatcggc ctactgcat
361 tcccggaacg tccaagtata cggagatgtg gttttgaatc ataaggctgg tgctgatgca
421 acagaagatg taactgccgt cgaagtcaat ccggccaata gaaatcagga aacttcggag
481 gaatatcaaa tcaaagcgtg gacggatctt cgttttccgg gccgtggaaa cacgtacagt
541 gattttaaat ggcattggta tcatttcgac ggagcggact gggatgaatc ccggaagatc
601 agccgcatct ttaagtttcg tggggaagga aaagcgtggg attgggaagt atcaagtгаа
661 aacggcaact atgactatct aatgtatgct gatggtgact acgaccacc tgatgtcgtg
721 gcagagacaa aaaaatgggg tatctgggat gcgaatgaac tgtcattaga cggcttccgt
781 attgtgccc ccaaacatat taaatcttca tttctgctg attgggttca ggcggtcaga
841 caggcgacgg gaaaagaaat gtttacgggt gcggagtatt ggcagaataa tgcgggaaa
901 ctcgaaaact acttgaataa aacaagcttt aatcaatccg tgtttgatgt tccgcttcat
961 ttcaatttac aggcggcttc ctcaaaagga ggcggatatg atatgaggcg tttgctggac
1021 ggtaccgctg tgctccaggca tccggaaaag gcggttacct ttggtgaaaa tcatgacaca
1081 cagccgggac agtcattgga atcgacagtc caaacttggg ttaaaccgct tgcatacgcc
1141 tttatcttga caagagaatc cggttatcct cagggtgttct atggggatat gtacgggaca
1201 aaagggacat cgccaaagga aattccctca ctgaaagata atatagagcc gattttaaaa
1261 gcgcgtaagg agtacgcata cgggcccag cagcattata tgaccacc ggatgtgatc
1321 ggatggacga ggggaaggtg cagctccgcc gccaaatcag gtttgccgc ttaaatcacg
1381 gacggaccgg gcggatcaaa gcggatgtat gccggcctga aaaatgccgg cgagacatgg
1441 tatgacataa cgggcaaccg ttcagatact gtaaaaatcg gatctgacgg ctggggagag
1501 tttcatgtaa acgatgggtc cgtctccatt tatgttcaga aataaggtaa taaaaaaaca
1561 cctccaagct gagtgccggg atcagcttgg aggtgcgctt atttttcag ccgatgaca
1621 aggtcggcat cagggtgtgac aaatacggta tgctggctgt cataggtagc aaatccgggt
1681 tttgcgccgt ttggcttttt cacatgtctg atttttgtat aatcaacagg cacggagccg
1741 gaatctttcg ccttggaaaa ataagcggcg atcgtaggag ctccaataa tcaactagta
1801 attcgcggcc gcctgcagcc aagcttctgt tttggcggat gagagaagt tttcagcctg
1861 atacagatta aatcagaacg cagaagcgtt ctgataaaac agaatttgc tggcggcagt
1921 agcgcgggtg tcccactga ccccatgccc aactcagaag tgaaacgccg tagcgcgat
1981 ggtagtgtgg ggtctcccca tgcgagagta gggaaactgcc aggcatacaa taaaacgaaa
2041 ggctcagtcg aaagactggg cctttcgctt tatctgttgt ttgtcgggta acgctctcct
2101 gagtaggaca aatccgcccg gagcggattt gaacgttgcg aagcaacggc ccggagggtg
2161 gcgggcagga cgcccgccat aaactgccag gcatcaaatt aagcagaagg ccatcctgac
2221 ggatggcctt tttgcgtttc tacaactct tttgtttatt tttctaaata cattcaaata
2281 tgtatccgct catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaa aaggccgctg
2341 tgctggcgct tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa
2401 gtcagaggtg gcgaaaccgg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct
2461 ccctcgtgcg ctctcctgct ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc
2521 cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtagg
2581 tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgctc
2641 tatccggtaa ctatcgtctt gactccaacc cggtaagaca cgacttatcg cactggcag
2701 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gagttcttga
2761 agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatctgc gctctgctga
2821 agccagttac cttcggaaaa agagtggta gctcttgatc cggcaaaaaa accaccgctg
2881 gtacgggtgg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag
2941 aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaaa tcacgttaag
3001 ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat
3061 gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct
3121 taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatctcg ttcatacata gttgcctgac
3181 tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa
3241 tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg
3301 gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt
3361 gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca
3421 ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcatc agctccggtt
3481 cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct
3541 tcggtcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atgggttatgg

```

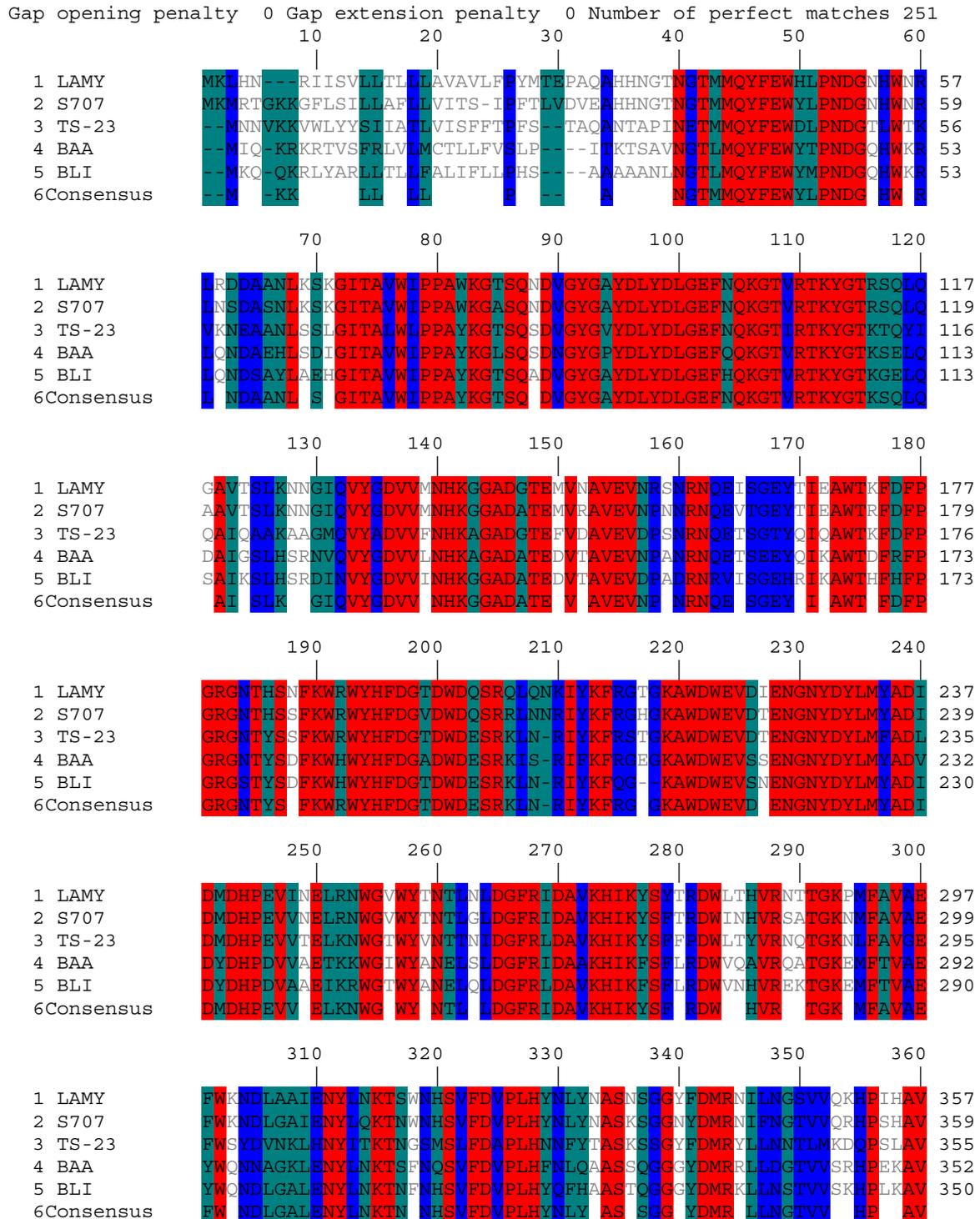
3601 cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg
3661 agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccg
3721 cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa
3781 aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt
3841 aaccactcg tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt
3901 gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaaat aagggcgaca cggaaatgtt
3961 gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca
4021 tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat
4081 ttccccgaaa agtgccacct gacgtcgaat ggtgcatgca tcgatcacca caattcagca
4141 aattgtgaac atcatcacgt tcatctttcc ctggttgcca atggcccatt ttcctgtcag
4201 taacgagaag gtcgcaatt caggcgcttt ttagactggg cgtaatgaac aattcttaag
4261 aaggagatat acat

6.4 AMINOSÄURESEQUENZ VON BAA

1 MIQKRKRTVS FRLVLMCTLL FVSLPITKTS AVNGTLMQYF EWYTPNDGQH WKRLQNDAEH
61 LSDIGITAVW IPPAYKGLSQ SDNGYGPYDL YDLGEFQQKG TVRTKYGTKS ELQDAIGSLH
121 SRNVQVYGDV VLNHKAGADA TEDVTAVEVN PANRNQETSE EYQIKAWTDF RFPGRGNTYS
181 DFKWHWHYFD GADWDESRKI SRIFKFRGEG KAWDWEVSSE NGNYDYLMYA DVDYDHPDVV
241 AETKKWGIWY ANELSLDGFR IDAAKHIFFS FLRDWVQAVR QATGKEMFTV AEYWQNNAGK
301 LENYLNKTSF NQSVFDVPLH FNLQAASSQG GGYDMRRLLD GTVVSRHPEK AVTFVENHDT
361 QPGQSLESTV QTWFKPLAYA FILTRESGYP QVFGDMYGT KGTSPKEIPS LKDNIEPILK
421 ARKEYAYGPQ HDYIDHPDVI GWTREGDSSA AKSGLAALIT DGPGGSKRMY AGLKNAGETW
481 YDITGNRSDT VKIGSDGWGE FHVNDGSVSI YVQK

6.5 AMINOSÄURE-ALIGNMENT DER BAA MIT WEITEREN α -AMYLASEN AUS BACILLUS

Amino acids identity : : 100
 >= 75
 >= 50
 < 50



	370	380	390	400	410	420	
1 LAMY	TFVDNHDSQPGEALESFVQS	WFKPLAYALITLTRE	QGYPSV	VFYGDYYGIP	THG	---	VPSMK 414
2 S707	TFVDNHDSQPGEALESFVEE	WFKPLAYALITLTRE	QGYPSV	VFYGDYYGIP	THG	---	VPAMR 416
3 TS-23	TLVDNHDTQPQSLQSWVEP	WFKPLAYAFILTR	QEGYPCV	VFYGDYYGIP	KYN	---	IPGLK 412
4 BAA	TFVENHDTQPQGSLESTVQI	WFKPLAYAFILTR	ESGYPQV	VFYGDYMG	TKGTS		PKEIPSLK 412
5 BLI	TFVDNHDTQPQGSLESTVQI	WFKPLAYAFILTR	ESGYPQV	VFYGDYMG	TKGDS		QREIPALK 410
6 Consensus	TFVDNHDTQPQGSLES	VC WFKPLAYAFILTR	E GYP VFYGDYYGIP				---IP LK
	430	440	450	460	470	480	
1 LAMY	SKIDPLLQARQTYAYGTQHDY	FDHHDII	IGWTREGDSS	HPNSGLAT	IMSDG	PPGGNKW	MYVG 474
2 S707	SKIDPILEARQKYAYGKQNDY	LDHNNII	IGWTREGNTA	HPNSGLAT	IMSDG	AGGSKWM	FVG 476
3 TS-23	SKIDPLLIARRDYAYGTQRDY	IDHQDII	IGWTREGIDT	KPNSGLAAL	ITDGP	GGSKW	MYVG 472
4 BAA	DNIEPILKARKEYAYGPPQHDY	IDHPDVI	IGWTREGDSS	AAKSGLAAL	ITDGP	GGSKRMY	YAG 472
5 BLI	HKIEPILKARKQYAYGAQHDY	FDHHDIV	IGWTREGDSS	VANSGLAAL	ITDGP	GGAKRMY	YVG 470
6 Consensus	SKIDPILAR YAYG QHDY	DHHDII	IGWTREGDSS	PN	SGLAALITDGP	GGSKW	MYVG
	490	500	510	520	530	540	
1 LAMY	KHKAGQVWRDITGNRSGT	VTINADGWGNFT	VNGGAVSVVW	KQ			----- 516
2 S707	RNKAGQVWSDITGNRTGT	VTINADGWGNFS	VNGGSVSIWV	NK			----- 518
3 TS-23	KKHAGKVFDITGNRSDT	VTINADGWGEFK	VNGGSVSIW	AKTSNV	TFTVNN	ATT	TSGQN 532
4 BAA	LKNAGETWYDITGNRSDT	VKIGSDGWGEFHV	NDGSVSIYV	QK			----- 514
5 BLI	RQNAGETWHDITGNRSE	PVVIINSEGWGEFHV	NCGSVSIYV	QR			----- 512
6 Consensus	AG VW DITGNRS	TVTINADGWGEF	VNGGSVSIW	K			-----
	550	560	570	580	590	600	
1 LAMY	-----	-----	-----	-----	-----	-----	516
2 S707	-----	-----	-----	-----	-----	-----	518
3 TS-23	VYVVANIPELGNWNTANA	IKNPSSYPTWKAT	IALPQGKAIEFKFI	KKDQAGNVI	WESTS		592
4 BAA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	514
5 BLI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	512
6 Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	610	620	630	640	650	660	
1 LAMY	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
2 S707	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
3 TS-23	NRTYTV	PFSS	TG	SYTASW	NVP		
4 BAA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
5 BLI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
6 Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

6.6 VERWENDETE PRIMER

Primer zur Deletion

Del9_F: 5`-GGG ATA TGT ACG GGA CAA AAC CAA AGG AAA TTC CCT C-3`
Del9_R: 5`-CAG GGA ATT TCC TTT GGT TTT GTC CCG TAC ATA TCC C-3`

Primer zur Sättigungsmutagenese, 1. Runde

KPPX_F: 5`-GAT ATG TAC GGG ACA CCA NNN AAG GAA ATT CCC TC-3`
KPPX_R: 5`-GAG GGA ATT TCC TTXN NNT GGT GTC CCG TAC ATA TC-3`

Primer zur Sättigungsmutagenese, 2. Runde

TIKHEN-F: 5`-GGG GAT ATG TAC GGG ATA CCA ACC CAT GGA ATT CCC TCA CTG-3`
TIKHEN-R: 5`-CAG TGA GGG AAT TCC ATG GGT TGG TAT CCC GTA CAT ATC CCC-3`
TKEX-F: 5`-GGG GAT ATG TAC GGG ADA CCA XXX XXX XXX ATT CCC TCA CTG-3`
TKEX-R: 5`-CAG TGA GGG AAT XXX XXX XXX TGG THT CCC GTA CAT ATC CCC-3`

Primer für die Error-prone PCR und für die zweite Amplifikation im Shufflingprozess

BAF: 5`-CCT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TG-3`
BAR: 5`-GCC AAA ACA GAA GCT TGG CTG CAG-3`

Primer für die erste Amplifikation im Shufflingprozess

AmpR: 5`-cct ccg ggc cgt tgc ttc gca acg-3`
AmpF: 5`-gca aaa aca gga agg caa aat gcc g-3`

Primer für die Sequenzierung

-100BAF: 5`-CAT CGA TCA CCA CAA TTC AG-3`
Seq2F: 5`-GAA TAT CAA ATC AAA GCG TGG-3`
Seq3F: 5`-GTC CAG GCA TCC GGA AAA GG-3`
Seq4R: 5`-CTG AAA CTG TTG AAA TTT GTT TG-3`

6.7 MUTANTEN AUS DER ERSTEN ERROR-PRONE PCR-RUNDE

Auflistung der Mutanten aus der ersten Error-prone PCR-Runde. Die AS Position (AS Pos.) bezieht sich auf BAA mit dem Signalpeptid. Die Aminosäuren sind im 1-Buchstaben-Code angegeben.

#	Mutante	A(620 nm)		bp Pos.	AS Pos.
		pH 10	pH 7		
1	+	0,3173	0,8587	a486t	Y162Y
1	+	0,3173	0,8587	a1241g	N414S
2	+	0,1006	0,1357	a554t	H152L
2	+	0,1006	0,1357	a889g	N297D
2	+	0,1006	0,1357	a900g	G299G
2	+	0,1006	0,1357	c903t	K300K
2	+	0,1006	0,1357	t1506c	H502H
2	+	0,1006	0,1357	a1508g	V503V
2	+	0,1006	0,1357	g1512a	D505N
3	+	0,3919	1,4446	a231t	G77G
3	+	0,3919	1,4446	a889g	N297D
3	+	0,3919	1,4446	a900g	G299G
3	+	0,3919	1,4446	c903t	K300K
4	+	0,2426	0,8391	a1217g	K406R
4	+	0,2426	0,8391	g1512c	D505H
5	-	0,1858	0,4296		
6	+	0,1897	0,681	a298t	K68N
6	+	0,1897	0,681	t515c	F172F
7	-	0,1903	0,463		
8	+	0,2454	0,0964	a458c	N153H
8	+	0,2454	0,0964	a889g	N297D
8	+	0,2454	0,0964	a900g	G299G
8	+	0,2454	0,0964	c903t	K300K
8	+	0,2454	0,0964	t1012c	L338L
8	+	0,2454	0,0964	1506	H502H
8	+	0,2454	0,0964	a1508g	V503V
8	+	0,2454	0,0964	g1512a	D505N
8	+	0,2454	0,0964	a1542t	K514N

9	+	0,2444	0,3424	t6a	I2I
9	+	0,2444	0,3424	g20a	R7G
9	+	0,2444	0,3424	t32c	F11S
10	+, s	0,4904	2,1341	a423t	T141T
11	+	0,2389	0,9255	t685a	Y229N
11	+	0,2389	0,9255	a1134g	A378A
12	-	0,3255	1,2361		
13	+	0,3086	1,5019	t95c	V32A
14	-	0,3552	1,1811		
15	+, s	0,6119	1,9521	c208t	Y70V
16	-	0,4552	0,9619		
17	+	0,222	0,4792	a596g	K199R
17	+	0,222	0,4792	t1023a	G341G
18	+	0,3961	2,0201	t580c	W194R
19	+	0,2338	0,816	a1068t	E356D
20	+	0,4136	2,2263	t49c	C17R
20	+	0,4136	2,2263	t394c	L132L
20	+	0,4136	2,2263	a765g	S255S
21	-	0,1882	0,6157		
22	-	0,2399	0,9749		
23	+	0,4445	2,0858	a698t	D233V
24	-	0,232	0,5424		
25	+	0,2211	0,4721	a616g	K205R
25	+	0,2211	0,4721	g870a	V290V
26	+	0,635	1,9	a936t	Q312H

6.8 MUTANTEN AUS DER DNA-SHUFFLING-RUNDE

Liste der Daten der 34 besten Klone aus der DNA-Shuffling-Runde. Die unterlegten Klone 27, 28, 29, 42, 43 und 59 zeigten auch im Rescreening verbesserte Alkaliaktivität. Die fett gedruckten Klone 29 und 42 wurden nach Retransformation als verbesserte Klone identifiziert.

#	A(620 nm)		#	A(620 nm)	
	pH 10	pH 7		pH 10	pH 7
27	1,0717	2,218	44	0,3814	1,7672
28	0,3668	2,0719	45	0,2953	1,3222
29	1,3329	2,218	46	0,6229	2,0279
30	0,2246	0,7631	47	0,4193	1,7269
31	0,2394	0,8701	48	0,1972	0,7005
32	0,2332	0,8942	49	1,2441	2,1528
33	1,2833	2,1404	50	0,3146	1,516
34	0,4116	1,3228	51	0,4298	1,8518
35	0,3271	1,0492	52	0,341	1,6088
36	0,2969	0,7905	53	0,3702	1,8518
37	0,259	1,0554	54	1,1796	2,0859
38	0,4299	0,8815	55	0,3598	1,9767
39	0,3361	1,1384	56	0,2691	1,5694
40	0,2182	0,6438	57	0,3632	2,0859
41	0,2517	1,0157	58	0,7184	2,2111
42	0,3243	1,1424	59	0,503	2,1319
43	0,4116	1,1209	60	0,4337	1,8528

6.9 MUTATIONEN DER MUTANTEN 29, 42 UND B1

Auflistung der besten Mutanten aus der DNA-Shuffling-Runde nach Rescreening und Retransformation. Die Template # gibt die Klonen an aus denen die jeweilige Mutation geerbt wurde. n bedeutet, dass diese Mutation im Shuffling-Prozess neu eingeführt wurde. Die AS-Mutationen sind im 1-Buchstaben-Code angegeben.

Mutante 29

bp Pos.	AS Pos.	Template
t38c	L13P	n
t95c	V32A	13
g303a	T101T	n
a630g	G210G	n
c689t	A230V	n
t870c	V290V	25
a889g	N297D	3
a900g	G299G	3
c203t	K300K	3
a1107c	T336T	n
a1217g	K406R	4
a1241g	N414S	1

Mutante 42

bp Pos.	AS Pos.	Template
t38c	L13P	n
t580c	W194R	18
t589c	S197P	n
t1029a	V343V	n
a1068t	E356D	19
a1241g	N414S	1
t1362c	G454G	n

Mutante B1

bp Pos.	AS Pos.	Template
t38c	L13P	n
t95c	V32A	13
g303a	T101T	n
a607c	I203L	n
a630g	G210G	n
c689t	A230V	n
t870a	V290V	25
a889g	N297D	3
a900g	G299G	3
c903t	K300K	3
t965c	N322N	n
a1107c	T336T	n
a1217g	K406R	4
a1241g	N414S	1
a1420c	K474Q	n
t1461a	R487R	n

7 LITERATUR

- Abécassis, V., Pompon, D. und Truan, G. (2000). "High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast: statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2." Nucleic Acids Res **28**(20): E88.
- Aehle, W. (1997). Development of New Amylases. Enzymes in Detergency. van Ee, J. H., Misset, O. und Baas, E. J. New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker Inc. **69**: 213-29.
- Altenbucher, J. (1999) "Plasmid pJOE 2792" Bessler, C.
- Belev, T. N., Singh, M. und McCarthy, J. E. (1991). "A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*." Plasmid **26**(2): 147-50.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. F., Jr., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. und Tasumi, M. (1977). "The Protein Data Bank. A computer-based archival file for macromolecular structures." Eur J Biochem **80**(2): 319-24.
- Bessler, C. (1999). Untersuchungen zur gentechnischen Optimierung einer Bacillus-Amylase. Diplomarbeit. Stuttgart, Universität Stuttgart, Institut für technische Biochemie
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Bornscheuer, U. T., Altenbuchner, J. und Meyer, H. H. (1998). "Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones." Biotechnol Bioeng **58**(5): 554-9.
- Cadwell, R. C. und Joyce, G. F. (1994). "Mutagenic PCR." PCR Methods Appl **3**(6): 136-40.
- Chary, S. J. und Reddy, S. M. (1985). "Starch degrading enzymes of two species of *Fusarium*." Folia Microbiol. (Praha) **30**: 452-7.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-5.
- Chung, H. und Friedberg, F. (1980). "Sequence of the N-terminal half of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase." Biochem J **185**(2): 387-95.
- Cline, J., Braman, J. C. und Hogrefe, H. H. (1996). "PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases." Nucleic Acids Res **24**(18): 3546-51.
- Conrad, B., Hoang, V., Polley, A. und Hofemeister, J. (1995). "Hybrid *Bacillus amyloliquefaciens* X *Bacillus licheniformis* α -amylases. Construction, properties and sequence determinants." Eur J Biochem **230**(2): 481-90.
- Declerck, N., Joyet, P., Trosset, J. Y., Garnier, J. und Gaillardin, C. (1995). "Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α -amylase: multiple amino acid replacements and molecular modelling." Protein Eng **8**(10): 1029-37.

- Endo, K., Igarashi, K., Hayashi, Y., Hagihara, H. und Ozaki, K. (2001). "Mutant α -Amylase" **EP1065277(00111911.4)**
- Freeman, M., Baehler, C. und Spotts, S. (1990). "Automated laser-fluorescence sequencing." Biotechnology (N Y) **8(2)**: 147-8.
- Fujimoto, Z., Takase, K., Doui, N., Momma, M., Matsumoto, T. und Mizuno, H. (1998). "Crystal structure of a catalytic-site mutant α -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose." J Mol Biol **277(2)**: 393-407.
- Fünzig, H. (2001). Untersuchung der Amylase auf *Bacillus amyloliquefaciens* mit ortsgerechter Mutagenese. Studienarbeit. Stuttgart, Universität Stuttgart, Institut für Technische Biochemie
- Granum, P. E. (1979). "Purification and physicochemical properties of an extracellular amylase from a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from dry onion powder." J. Food Biochem. **3**: 1-12.
- Greener, A., Callahan, M. und Jerpseth, B. (1996). "An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain." Methods Mol Biol **57**: 375-85.
- Greener, A. L. (1993). "Process of producing highly transformable bacterial cells and cells produced thereby" **5,512,468**
- Greener, A. L. (1996). "Process of producing highly transformable bacterial cells and cells produced thereby" **5,707,841**
- Guex, N. und Peitsch, M. C. (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18(15)**: 2714-23.
- Hagihara, H., Hayashi, Y., Endo, K., Igarashi, K., Ozawa, T., Kawai, S., Ozaki, K. und Ito, S. (2001a). "Deduced amino-acid sequence of a calcium-free α -amylase from a strain of *Bacillus*: Implications from molecular modeling of high oxidation stability and chelator resistance of the enzyme." Eur J Biochem **268(14)**: 3974-82.
- Hagihara, H., Igarashi, K., Hayashi, Y., Endo, K., Ikawa-Kitayama, K., Ozaki, K., Kawai, S. und Ito, S. (2001b). "Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38." Appl Environ Microbiol **67(4)**: 1744-50.
- Hall, F. F., Culp, T. W., Hayakawa, T., Ratliff, C. R. und Hightower, N. C. (1970). "An improved amylase assay using a new starch derivative." Am J Clin Pathol **53(5)**: 627-34.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166(4)**: 557-80.
- Henke, E. (2001). Plasmid pGASTON, persönliche Kommunikation. Doktorarbeit. Stuttgart, Universität Stuttgart, Institut für Technische Biochemie
- Hsiu, J., Fischer, E. H. und Stein, E. A. (1964). " α -Amylases as calcium-metalloenzymes. II. Calcium and the catalytic activity." Biochemistry **3**: 61-6.

- Humphrey, W., Dalke, A. und Schulten, K. (1996). "VMD-Visual Molecular Dynamics." J. Molec. Graphics **14**(1): 33-38.
- Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Kobayashi, T. und Ito, S. (1998a). "Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences." Appl Environ Microbiol **64**(9): 3282-9.
- Igarashi, K., Hatada, Y., Ikawa, K., Araki, H., Ozawa, T., Kobayashi, T., Ozaki, K. und Ito, S. (1998b). "Improved thermostability of a *Bacillus* α -amylase by deletion of an arginine-glycine residue is caused by enhanced calcium binding." Biochem Biophys Res Commun **248**(2): 372-7.
- Igarashi, K., Ozawa, T., Ikawakitayama, K., Hayashi, Y., Araki, H., Endo, K., Hagihara, H., Ozaki, K., Kawai, S. und Ito, S. (1999). "Thermostabilization by proline substitution in an alkaline, liquefying α -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-1378." Biosci Biotechnol Biochem **63**(9): 1535-40.
- Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S. und Hatada, Y. (1998). "Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures." Extremophiles **2**(3): 185-90.
- Izard, J. W. und Kendall, D. A. (1994). "Signal peptides: exquisitely designed transport promoters." Mol Microbiol **13**(5): 765-73.
- Jones, S. und Warner, P. J. (1990). "Cloning and expression of α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* in a stable plasmid vector in *Lactobacillus plantarum*." Lett Appl Microbiol **11**(4): 214-9.
- Karamyshev, A. L., Karamysheva, Z. N., Kajava, A. V., Ksenzenko, V. N. und Nesmeyanova, M. A. (1998). "Processing of *Escherichia coli* alkaline phosphatase: role of the primary structure of the signal peptide cleavage region." J Mol Biol **277**(4): 859-70.
- Kottwitz, B., Speckmann, H.-D., Maurer, K.-H. und Nitsch, C. (2001). "Detergents containing amylase" **EP1084221**(WO9963039)
- Kuchner, O. und Arnold, F. H. (1997). "Directed evolution of enzyme catalysts." Trends Biotechnol **15**(12): 523-30.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Leung, D. W., Chen, E. und Goeddel, D. V. (1989). "A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction." Technique **1**: 11-15.
- Li, Q. S., Schwaneberg, U., Fischer, P. und Schmid, R. D. (2000). "Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst." Chemistry **6**(9): 1531-6.
- Lin, L. L., Chyau, C. C. und Hsu, W. H. (1998). "Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23." Biotechnol Appl Biochem **28**(Pt 1): 61-8.

- Maassen, A. (1991). "Vergleich zweier α -Amylasen aus *B. amyloliquefaciens* und *B. licheniformis*." Biomed Biochim Acta **50**(2): 213-7.
- Madsen, G. B., Norman, B. E. und Slott, S. (1973). "A new, heat-stable bacterial amylase in the starch liquefaction process." Starch/Stärke **25**: 304.
- Metz, R. J., Allen, L. N., Cao, T. M. und Zeman, N. W. (1988). "Nucleotide sequence of an amylase gene from *Bacillus megaterium*." Nucleic Acids Res **16**(11): 5203.
- Michal, G. (1993). Biochemical Pathways. Würzburg, Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica.
- Miller, G. L. (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." Analytical Chemistry **31**(3): 426-428.
- Miura, T. und Sonigo, P. (2001). "A mathematical model for experimental gene evolution." J Theor Biol **209**(4): 497-502.
- Miyazaki, K. und Arnold, F. H. (1999). "Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function." J Mol Evol **49**(6): 716-20.
- Moore, G. L. und Maranas, C. D. (2000). "Modeling DNA mutation and recombination for directed evolution experiments." J Theor Biol **205**(3): 483-503.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51**(Pt 1): 263-73.
- Nakajima, R., Imanaka, T. und Aiba, S. (1985). "Nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* α -amylase gene." J Bacteriol **163**(1): 401-6.
- Ness, J. E., Welch, M., Giver, L., Bueno, M., Cherry, J. R., Borchert, T. V., Stemmer, W. P. und Minshull, J. (1999). "DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin." Nat Biotechnol **17**(9): 893-6.
- Nielsen, J. E., Beier, L., Otzen, D., Borchert, T. V., Frantzen, H. B., Andersen, K. V. und Svendsen, A. (1999). "Electrostatics in the active site of an α -amylase." Eur J Biochem **264**(3): 816-24.
- Nielsen, J. E. und Borchert, T. V. (2000). "Protein engineering of bacterial α -amylases." Biochim Biophys Acta **1543**(2): 253-274.
- Nielsen, J. E., Borchert, T. V. und Vriend, G. (2001). "The determinants of α -amylase pH-activity profiles." Protein Eng **14**(7): 505-12.
- Palva, I., Pettersson, R. F., Kalkkinen, N., Lehtovaara, P., Sarvas, M., Soderlund, H., Takkinen, K. und Kaariainen, L. (1981). "Nucleotide sequence of the promoter and NH₂-terminal signal peptide region of the α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*." Gene **15**(1): 43-51.
- Peitsch, M. C. (1995). "Protein modeling by E-mail." Bio/Technology **13**: 658-660.

- Peitsch, M. C. (1996). "ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling." Biochem Soc Trans **24**(1): 274-9.
- Peitsch, M. C. (1997). "Large scale protein modelling and model repository." Ismb **5**: 234-6.
- Peitsch, M. C., Herzyk, P., Wells, T. N. und Hubbard, R. E. (1996). "Automated modelling of the transmembrane region of G-protein coupled receptor by Swiss-model." Receptors Channels **4**(3): 161-4.
- Peitsch, M. C., Wilkins, M. R., Tonella, L., Sanchez, J. C., Appel, R. D. und Hochstrasser, D. F. (1997). "Large-scale protein modelling and integration with the SWISS-PROT and SWISS-2DPAGE databases: the example of *Escherichia coli*." Electrophoresis **18**(3-4): 498-501.
- Pretorius, I. S., Laing, E., Pretorius, G. H. und Marmur, J. (1988). "Expression of a *Bacillus* α -amylase gene in yeast." Curr Genet **14**(1): 1-8.
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A. und Baumeister, K. (1987). "A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides." Science **238**(4825): 336-41.
- Rai, S., Wolff, A. M., Speed, L. A., Ward, G. S. und Barnabas, M. V. (1999). "Dishwashing compositions comprising a phospholipase and an amylase" **EP0994936**(WO9901531)
- Rauscher, E. (1984). Colorimetric Method. Enzymes 2: Esterases, Glycosidases, Lyases, Ligases. Bergmeyer, H. U. Weinheim, VCH. **4**: 157-61.
- Rellos, P. und Scopes, R. K. (1994). "Polymerase chain reaction-based random mutagenesis: production and characterization of thermostable mutants of *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase-2." Protein Expr Purif **5**(3): 270-7.
- Ruohonen, L., Hackman, P., Lehtovaara, P., Knowles, J. K. und Keranen, S. (1987). "Efficient secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase by its own signal peptide from *Saccharomyces cerevisiae* host cells [published erratum appears in Gene 1988 Apr 29;64(2):327]." Gene **59**(2-3): 161-70.
- Sakano, Y., Sano, M. und Kobayashi, T. (1985). "Hydrolysis of α -1,6-glucosidic linkages by α -Amylase." Agric. Biol. Chem. **49**: 3041-3.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Scheib, H., Pleiss, J., Stadler, P., Kovac, A., Potthoff, A. P., Haalck, L., Spener, F., Paltauf, F. und Schmid, R. D. (1998). "Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triacylglycerols." Protein Eng **11**(8): 675-82.
- Schmidt-Dannert, C., Umeno, D. und Arnold, F. H. (2000). "Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways." Nat Biotechnol **18**(7): 750-3.

Shaw, A., Bott, R. und Day, A. G. (1999). "Protein engineering of α -amylase for low pH performance." Curr Opin Biotechnol **10**(4): 349-52.

Stemmer, W. P. (1994a). "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10747-51.

Stemmer, W. P. (1994b). "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling." Nature **370**(6488): 389-91.

Suominen, I., Meyer, P., Tilgmann, C., Glumoff, T., Glumoff, V., Kapyla, J. und Mantsala, P. (1995). "Effects of signal peptide mutations on processing of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase in *Escherichia coli*." Microbiology **141**(Pt 3): 649-54.

Takase, K. (1993). "Effect of mutation of an amino acid residue near the catalytic site on the activity of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase." Eur J Biochem **211**(3): 899-902.

Takkinen, K., Pettersson, R. F., Kalkkinen, N., Palva, I., Soderlund, H. und Kaariainen, L. (1983). "Amino acid sequence of α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* deduced from the nucleotide sequence of the cloned gene." J Biol Chem **258**(2): 1007-13.

Tsukamoto, A., Kimura, K., Ishii, Y., Takano, T. und Yamane, K. (1988). "Nucleotide sequence of the maltohexaose-producing amylase gene from an alkalophilic *Bacillus* sp. #707 and structural similarity to liquefying type α -amylases." Biochem Biophys Res Commun **151**(1): 25-31.

Uitdehaag, J. C., Mosi, R., Kalk, K. H., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., Withers, S. G. und Dijkstra, B. W. (1999). "X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family." Nat Struct Biol **6**(5): 432-6.

Upadek, H. und Kottwitz, B. (1997). Application of Amylases in Detergents. Enzymes in Detergency. van Ee, J. H., Misset, O. und Baas, E. J. New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker Inc. **69**: 203-10.

Vallee, B. L., Stein, E. A., Summerwell, W. N. und Fischer, E. H. (1959). "Metal content of α -amylases of various origins." J. Biol. Chem. **234**: 2901-5.

van der Wal, F. J., Luirink, J. und Oudega, B. (1995a). "Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application." FEMS Microbiol Rev **17**(4): 381-99.

van der Wal, F. J., ten Hagen, C. M., Oudega, B. und Luirink, J. (1995b). "The stable bacteriocin release protein signal peptide, expressed as a separate entity, functions in the release of cloacin DF13." FEMS Microbiol Lett **131**(2): 173-7.

van der Wal, F. J., ten Hagen-Jongman, C. M., Oudega, B. und Luirink, J. (1995c). "Optimization of bacteriocin-release-protein-induced protein release by *Escherichia coli*: extracellular production of the periplasmic molecular chaperone FaeE." Appl Microbiol Biotechnol **44**(3-4): 459-65.

Vihinen, M. und Mantsala, P. (1989). "Microbial amyolytic enzymes." Crit Rev Biochem Mol Biol **24**(4): 329-418.

Vihinen, M., Ollikka, P., Niskanen, J., Meyer, P., Suominen, I., Karp, M., Holm, L., Knowles, J. und Mantsala, P. (1990). "Site-directed mutagenesis of a thermostable α -amylase from

- Bacillus stearothermophilus*: putative role of three conserved residues.” J Biochem (Tokyo) **107**(2): 267-72.
- von Heijne, G. (1985). “Signal sequences. The limits of variation.” J Mol Biol **184**(1): 99-105.
- Wahlefeld, A. W. (1984). Determination with Coloured Insoluble Substrates. Enzymes 2: Esterases, Glycosidases, Lyases, Ligases. Bergmeyer, H. U. Weinheim, VCH. **4**: 161-67.
- Welker, N. E. und Campbell, L. L. (1967). “Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*.” J Bacteriol **94**(4): 1124-30.
- Yu, P. und San, K. Y. (1992). “Protein release in recombinant *Escherichia coli* using bacteriocin release protein.” Biotechnol Prog **8**(1): 25-9.
- Yuuki, T., Nomura, T., Tezuka, H., Tsuboi, A., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. und Udaka, S. (1985). “Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat- and pH-stable α -amylase of *Bacillus licheniformis*: comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying α -amylases deduced from the DNA sequences.” J Biochem (Tokyo) **98**(5): 1147-56.
- Zhao, H. und Arnold, F. H. (1997a). “Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes.” Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 7997-8000.
- Zhao, H. und Arnold, F. H. (1997b). “Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination.” Nucleic Acids Res **25**(6): 1307-8.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A. und Arnold, F. H. (1998). “Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination.” Nat Biotechnol **16**(3): 258-61.
- Zhao, H., Moore, J. o., Volkov, A. A. und Arnold, F. H. (1999). Methods for Optimizing Industrial Enzymes by Directed Evolution. Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain, A. L., Davies, J. E., Atlas, R. M., Cohen, G., Hershberger, C. L., Hu, W.-S., Sherman, D. H., Willson, R. C. und Wu, J. H. D. Washington D. C., ASM Press: 597-604.

8 LEBENS LAUF

ANGABEN ZUR PERSON

Cornelius Bessler

Geboren am 23.06.1974 in Stuttgart

Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG

August 1980 - Juli 1984

Grundschule: Fuchsrainschule in Stuttgart

August 1984 - Juni 1993

Besuch des Wagenburggymnasiums in Stuttgart

WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG

Oktober 1993 - Februar 1999

Studium der Chemie an der Universität Stuttgart

September 1996 – April 1997

Studium der Chemie und Biochemie an der University of Waterloo, Ontario, Kanada im Rahmen des Baden-Württemberg-Ontario-Austauschprogramms. Anfertigung einer Forschungsarbeit zu dem Thema: „Synthesis of chiral Ferrocenecarboxamides as precursors for assymmetric catalysts“ unter Anleitung durch Prof. Victor Snieckus

August 1998 - Februar 1999

Diplomarbeit am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart unter der Anleitung durch Prof. Rolf D. Schmid mit dem Titel: „Untersuchungen zur gentechnischen Optimierung einer *Bacillus*-Amylase - Verbesserung der Alkaliaktivität und Alkalistabilität der α -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* mit rationalen und evolutiven Methoden.“