

Untersuchungen zur enzymatischen Enantiomerentrennung
von Glykoethern und Etablierung neuer Methoden des
synthetischen Shufflings

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Monika Rusnak

aus Ludwigsburg

Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid

Mitberichter: Prof. Dr. Georg Sprenger

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Holger Jeske

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Dezember 2004

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2004

Apropos Gentechnik: Spätestens dann werden Sie merken, dass etwas nicht stimmt, wenn Sie morgens schlaftrunken in die Küche kommen und Ihnen von Ihren Tomaten ein fröhliches "Guten Morgen!" entgegenschallt...

Wolfgang J. Reus

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Möglichkeit, an diesem Institut unter hervorragenden Rahmenbedingungen selbständig an diesem sehr interessanten Thema zu arbeiten. Darüber hinaus danke ich ihm für sein Verständnis in allen Lebenslagen, auch über den Laboralltag hinaus.

Herrn Prof. Dr. Georg Sprenger danke ich für die freundliche Begutachtung dieser Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich DOW Chemical und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Prof. Dr. Wiltrud Treffenfeldt und Herrn Dr. Sol Resnick, die durch ihre Diskussionsbereitschaft dieses Projekt vorangebracht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Ralf Petri für die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit, für seine unschätzbare Hilfe im Laboralltag zu Anfang dieser Doktorarbeit und vor allem für seine stete Diskussionsbereitschaft in allen Fragen des Lebens.

Dr. Francois Villatte gilt ebenfalls mein Dank für die Betreuung dieser Arbeit und als Mitstreiter in diesem Projekt.

Für ihre unschätzbare Hilfe bei der Fermentation der *Candida antarctica* Lipase B, bei der Aufreinigung der *Archaeoglobus fulgidus* Lipase A und viele nette „Pläusche“ danke ich ganz besonders Dirk Michel, Dipl. Ing (FH) Sven Richter und Dipl. Ing. Jens Nieveler.

Bei Dipl. Ing. Wouter Berendsen möchte ich mich ganz besonders sowohl für seine Hilfe bei der gaschromatographischen Analytik, als auch für viele aufschlussreiche Diskussionen und amüsante Reisen nach Schwalbach bedanken.

Für eine unendliche Zahl an Tipps und Tricks, Aufmunterungen im manchmal tristen Wissenschaftleralltag und eine phantastische Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei den gesamten Arbeitsgruppen Biokatalyse und Molekularbiologie bedanken.

Bei Dipl. Biol. Peter Trodler, Dipl. Chem. Markus Fischer und Dr. Jürgen Pleiss möchte ich mich sowohl für die Zusammenarbeit bei der Mutagenese der *Candida antarctica* Lipase B wie auch für unzählige wertvolle Diskussionen auf dem geheimnisvollen Gebiet der Lipasen bedanken.

Meinen fleißigen „Hiwis“ Jan Toelkes, Gerhard Trunk und Florian Dismer danke ich für ihren tapferen Kampf mit den Tücken des Laboralltags.

Für die mehrmalige Rettung bei diversen Computerproblemen und Problemchen sowie für viel Spaß im Alltag danke ich Dipl. Biol. Daniel Appel.

Ich danke besonders Dr. Sandra Barth und Herrn Florian Barth für ihre nicht selbstverständliche Freundschaft, auch in schwierigen Lebenssituationen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern Elfriede und Otto Müller, die durch ihre umfassende Unterstützung mein Studium und somit auch diese Promotion erst möglich gemacht haben.

Meinem Ehemann Denis Rusnak danke ich für seine Liebe, sein unerschütterliches Vertrauen in meine Fähigkeiten, für die stete Versorgung mit kulinarischen Köstlichkeiten und vor allem für all die schöne Zeit, die wir bereits miteinander verbringen durften.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	7
2	Kurzzusammenfassung	8
3	Abstract	10
4	Einleitung	16
4.1	Die Enzymklasse der Hydrolasen: Lipasen und Carboxylesterasen	16
4.1.1	Vorkommen und Bedeutung von Lipasen und Carboxylesterasen	17
4.1.2	Molekulare Struktur und Mechanismus der Serin - Hydrolasen	17
4.1.3	Lipasen und Carboxylesterasen für biotechnologische Anwendungen	21
4.2	Enantioselektivität	22
4.3	Glykolether in der chemischen Industrie	25
4.3.1	Verwendung	25
4.3.2	Chirale Glykolether	26
4.4	Gewinnung neuer Enzyme für die Biotechnologie	27
4.4.1	Optimierung enzymkatalysierter Reaktionen	27
4.4.2	Neue Enzyme	29
4.4.3	Anpassung vorhandener Enzyme	31
4.4.3.1	Gerichtete Evolution	31
4.4.3.1.1	Klassische genetische Methoden	33
4.4.3.1.2	Synthetisches DNA-Shuffling	35
4.4.3.2	Rationales Proteindesign	36
4.5	Heterologe Proteinexpression	38
4.5.1	Entscheidende Faktoren	38
4.5.2	Expressionssysteme	40
4.6	Verwendete Lipasen	44
4.6.1	Lipase A aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	44
4.6.2	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>	46
4.6.3	Lipase B aus <i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	48
4.6.4	Lipase 1 aus <i>Moraxella</i> sp. TA144	49
4.7	Zielsetzung	50
5	Ergebnisse	51

5.1	Screening vorhandener Enzyme	51
5.2	Expression, Aufreinigung und Charakterisierung einer Lipase aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	53
5.2.1	Homologiesuche	53
5.2.2	Expression von LipA in <i>Escherichia coli</i>	55
5.2.3	Aufreinigung von LipA mittels Ammoniumsulfatfällung und Affinitätschromatographie	56
5.2.4	Charakterisierung von LipA	57
5.2.4.1	Identifizierung der katalytisch aktiven Aminosäurereste	57
5.2.4.2	Aktivität und Stabilität in Abhängigkeit von pH und Temperatur	58
5.2.4.3	Substratspektrum	60
5.2.4.4	Kinetik	61
5.3	Klonierung und Expression der Lipase B aus <i>Candida antarctica</i> und der Lipase B aus <i>Pseudozyma tsukubaensis</i>, Fermentation und Mutagenese der <i>Candida antarctica</i> Lipase B	62
5.3.1	Klonierung der Gene für <i>Candida antarctica</i> Lipase B und <i>Pseudozyma tsukubaensis</i> Lipase B in pPICZ α A	62
5.3.2	Expression der Lipasegene in <i>Pichia pastoris</i> im Schüttelkolbenmaßstab	66
5.3.3	Fermentation von <i>Candida antarctica</i> Lipase B in <i>Pichia pastoris</i>	69
5.3.4	Mutagenese der <i>Candida antarctica</i> Lipase B, Expression und Charakterisierung der korrespondierenden Genprodukte	71
5.3.4.1	Mutagenese zum Verständnis der hohen Enantioselektivität während der Hydrolyse	72
5.3.4.2	Mutagenese zur Steigerung der Enantioselektivität bei der Umesterung	75
5.4	Synthese eines Lipasegens aus <i>Moraxella</i> sp. TA144 und Charakterisierung des korrespondierenden Enzyms	79
5.4.1	Gen-synthese	79
5.4.2	Klonierung des Lipasegens und Expression in <i>E. coli</i>	81
5.4.3	Charakterisierung von Lip1	82
5.4.3.1	Temperaturprofil	82
5.4.3.2	Substratspektrum	83
5.5	Darstellung und Screening einer Genbank mit Hilfe von synthetischem Shuffling	84

5.5.1	Expression der <i>Candida antarctica</i> Lipase B in <i>E. coli</i> _____	84
5.5.2	Genbanksynthese _____	87
5.5.2.1	Planung der zugrundeliegenden Genbanksequenz _____	87
5.5.2.2	Primerdesign und Synthese _____	91
5.5.2.3	Optimierung der Genbanksequenz _____	93
5.5.3	Klonierung der Genbank und Transformation von <i>E. coli</i> _____	98
5.5.4	Screening der Genbank _____	100
6	<i>Diskussion</i> _____	101
6.1	Screening vorhandener Enzyme _____	101
6.2	Expression, Aufreinigung und Charakterisierung einer Lipase aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i> _____	102
6.2.1	Expression und Aufreinigung von LipA _____	102
6.2.2	Homologiesuche und Sequenzanalyse _____	103
6.2.3	Charakterisierung von LipA _____	105
6.3	Klonierung und Expression der Lipase B aus <i>Candida antarctica</i> und der Lipase B aus <i>Pseudozyma tsukubaensis</i>, Fermentation und Mutagenese der <i>Candida antarctica</i> Lipase B _____	108
6.3.1	Expression der Lipase B aus <i>Pseudozyma tsukubaensis</i> _____	108
6.3.2	Expression der Lipase B aus <i>Candida antarctica</i> _____	109
6.3.3	Fermentation der <i>Candida antarctica</i> Lipase B _____	111
6.3.4	Mutagenese der <i>Candida antarctica</i> Lipase B _____	112
6.3.5	Expression der <i>Candida antarctica</i> Lipase B in <i>E.coli</i> _____	115
6.4	Synthese eines Lipasegens aus <i>Moraxella</i> sp. TA144 und Charakterisierung des korrespondierenden Enzyms _____	116
6.4.1	Gensynthese _____	117
6.4.2	Expression und Charakterisierung von Lip1 _____	118
6.5	Darstellung und Screening einer Genbank mit Hilfe von synthetischem Shuffling _____	119
6.5.1	Genbanksynthese _____	120
6.5.2	Screening der Genbank _____	122
7	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i> _____	125
8	<i>Material und Methoden</i> _____	128

8.1	Materialien	128
8.1.1	Verbrauchsmaterialien	128
8.1.2	Laborchemikalien	128
8.1.3	Geräte	129
8.1.4	Datenbanken und <i>online</i> Programme	131
8.1.5	Enzyme	131
8.1.6	Oligonukleotide	132
8.1.7	Stämme	136
8.1.8	Plasmide	137
8.1.9	Verwendete “Kits”	137
8.1.10	Medien	137
8.1.11	Stammlösungen	139
8.2	Methoden	140
8.2.1	Molekularbiologische Methoden	140
8.2.1.1	Isolierung und Reinigung von DNA	140
8.2.1.1.1	Isolierung von Plasmid DNA im kleinem Maßstab	140
8.2.1.1.2	Isolierung von Plasmid DNA in größerem Maßstab	140
8.2.1.1.3	Isolierung von genomischer DNA aus Hefen	140
8.2.1.1.4	Ethanol-Präzipitation von DNA	141
8.2.1.1.5	Isopropanol-Präzipitation von DNA	141
8.2.1.1.6	Isolierung von DNA-Fragmenten mittels QIAquick® PCR Purification Kit	141
8.2.1.1.7	Elektrophoretische Trennung von DNA	142
8.2.1.1.8	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	142
8.2.1.2	<i>In vitro</i> Manipulation von DNA	143
8.2.1.2.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	143
8.2.1.2.2	Behandlung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase	143
8.2.1.2.3	Ligation von DNA Fragmenten	143
8.2.1.3	PCR (Polymerase Kettenreaktion)	143
8.2.1.3.1	Kolonie - PCR	145
8.2.1.3.2	PCR unter Verwendung von degenerierten Primern	146
8.2.1.3.3	Punktmutagenese innerhalb eines DNA Abschnitts (QuikChange®)	146
8.2.1.3.4	Gensynthese	147
8.2.1.3.5	DNA Sequenzierung	149

8.2.2	Arbeiten mit Mikroorganismen	151
8.2.2.1	Kultivierung von Mikroorganismen	151
8.2.2.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	151
8.2.2.1.2	Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i>	151
8.2.2.1.3	Kultivierung von <i>Candida antarctica</i> und <i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	151
8.2.2.2	Transformation von Mikroorganismen	152
8.2.2.2.1	Transformation von <i>E. coli</i>	152
8.2.2.2.2	Transformation von <i>P. pastoris</i>	153
8.2.2.3	Expression rekombinanter Proteine	153
8.2.2.3.1	Expression rekombinanter Hydrolasen in <i>E. coli</i>	153
8.2.2.3.2	Expression rekombinanter Lipasen in <i>P. pastoris</i> im Schüttelkolbenmaßstab	154
8.2.2.3.3	Expression rekombinanter CalB in <i>P.pastoris</i> im Fermentationsmaßstab	154
8.2.3	Proteinchemische Methoden	155
8.2.3.1	Aufreinigung rekombinanter Proteine	155
8.2.3.1.1	Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung	155
8.2.3.1.2	Affinitätschromatographie mittels His-Tag	155
8.2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	156
8.2.3.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	156
8.2.3.3.1	Coomassiefärbung	158
8.2.3.3.2	Silberfärbung	158
8.2.3.3.3	Aktivitätsfärbung (Zymogramm)	158
8.2.4	Assay-Systeme	159
8.2.4.1	Photometrische Aktivitätsbestimmung von Hydrolasen mittels <i>p</i> -Nitrophenylestern	159
8.2.4.2	Aktivitätsbestimmung von Hydrolasen mittels pH-Stat Titration	160
8.2.4.3	Aktivitäts- und Selektivitätsbestimmung von Hydrolasen mittels Gaschromatographie	161
8.2.4.3.1	Umsetzungen im 1,5 ml Maßstab	161
8.2.4.3.2	Gaschromatographische Analytik	161
8.2.4.4	Screening nach Lipaseaktivität mit dem Tributyrin Plattenassay	162
9	Literatur	163
10	Lebenslauf	177

11 Anhang _____ **178**

11.1 Sequenz der Lipase A aus *Archaeoglobus fulgidus* _____ **178**

11.2 Sequenz der Lipase B aus *Pseudozyma tsukubaensis* _____ **179**

11.3 Sequenz der Lipase B aus *Candida antarctica* _____ **180**

11.4 Sequenz der Lipase 1 aus *Moraxella* sp. TA144 _____ **181**

1 Abkürzungen

%(v/v)	Volumenprozent	kb	Kilobasen
%(w/v)	Gewichtsprozent	kDa	Kilodalton
ε	Extinktionskoeffizient	l	Liter
λ	Wellenlänge	LB	Luria-Bertani
μg	Mikrogramm	LED	<i>Lipase Engineering Database</i>
μl	Mikroliter	Lip	Lipase
Abb.	Abbildung	LipA	Lipase A aus <i>A. fulgidus</i>
<i>A. fulgidus</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Lip1	Lipase 1 aus <i>Moraxella</i> TA144
Amp	Ampizillin	LMW	<i>low molecular weight marker</i>
AOX	Alkoholoxygenase aus <i>P. pastoris</i>	M	Mol, molar
APS	Ammoniumpersulfat	MeOH	Methanol
AS	Aminosäure	MES	2[N-morpholino]- Ethansulfonsäurehydrat
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>	mg	Milligramm
bp	Basenpaare	min	Minute
BSA	Rinderserumalbumin	ml	Milliliter
CalB	Lipase B aus <i>C. antarctica</i>	mM	Millimol, millimolar
<i>C. antarctica</i>	<i>Candida antarctica</i>	mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>	nm	Nanometer
DBVPG	Industrial Yeasts Collection, Dipartimento di Biologia Vegetale e Biotechnologia Agroambientale	OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat	ORF	<i>open reading frame</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	P	Promotor
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
DNase	DNA-Endonuklease	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen	pNPA	<i>p</i> -Nitrophenylacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Ptsuk	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>
epPCR	<i>error-prone</i> PCR	rpm	<i>rounds per minute</i>
EtOH	Ethanol	RT	Raumtemperatur
GC	Gaschromatographie	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-2- ethansulfonsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
HisTag	Aminosäuresequenz mit 6 aufeinanderfolgenden Histidinen	Tab.	Tabelle
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits- Chromatographie	TAE	Tris-Essigsäure-EDTA Puffer
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatografie	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
		tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
		U	Units
		ÜN	über Nacht
		Wt	Wildtyp

2 Kurzzusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen geeigneten Biokatalysator für die Enantiomertrennung des Modellsubstrats 1-Methoxy-2-Propanol (MP) bzw. seines Esters 1-Methoxy-2-Propanolacetat (MPA) bereitzustellen. In den letzten Jahren stieg das Interesse an den enantiomerenreinen Formen dieser Glykolether enorm.

In dieser Arbeit richtete sich das Hauptaugenmerk auf die Evaluierung verschiedener Strategien zur Identifizierung bzw. Optimierung des Biokatalysators. Hierbei sollten sowohl Methoden der *de novo* Klonierung und der biochemischen Charakterisierung neuer Enzyme, wie auch der gerichteten Evolution und des rationalen Proteindesigns bereits bekannter Biokatalysatoren angewandt werden. Das so erhaltene Enzym sollte das Potenzial zum Einsatz in der chemischen Industrie haben, was hohe Anforderungen sowohl an Enantioselektivität wie auch an die Prozessstabilität eines Biokatalysators stellt.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte die Lipase A aus *Archaeoglobus fulgidus* kloniert und charakterisiert werden. Dieses Enzym, welches sehr geringe Homologie zu anderen bekannten Hydrolasen aufwies, zeigte ein interessantes Profil, speziell in Bezug auf sein pH-Optimum, jedoch keine Hydrolyse von MPA.

Es war bekannt, dass die Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) eine hohe Enantioselektivität vor allem bei der Hydrolyse von MPA zeigte. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war daher die Abschätzung der Nutzbarkeit und Verfügbarkeit von CalB für die Enantiomertrennung von MP / MPA. Die industrielle Anwendung von CalB ist durch die Patentierung dieses Enzyms durch Novozymes beschränkt. Die im zweiten Teil dieser Arbeit etablierte Expression von CalB in *Pichia pastoris* und die Übertragung des Expressionssystems auf den Fermentationsmaßstab schufen optimale Voraussetzungen für nachfolgende Experimente. Die bei dieser Expression erzielten Ausbeuten übertrafen die anderer Gruppen. Die erzeugten rationalen Mutanten zur Verbesserung der Selektivität in der Umesterung konnten keine Erhöhung der Enantioselektivität bewirken. Die hier erstmals gelungene funktionelle Expression von CalB in *E.coli* eröffnete jedoch die Möglichkeit zur gerichteten Evolution von CalB und dem Screening auch großer Mutantenbibliotheken, sowohl durch die Methode des Plattenscreenings wie auch durch FACS-Screening.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde eine neue, günstige und schnelle Methode der Gensynthese entwickelt, die zur Darstellung der im vierten Teil der Arbeit verwirklichten

Genbank verwendet wurde. Die so gewonnene Lipase 1 aus *Moraxella* sp. TA144 wurde funktionell in *E.coli* exprimiert und charakterisiert.

Basierend auf der in dieser Arbeit etablierten Methode der Gensynthese konnte eine Genbank der CalB erstellt werden, die durch eine neue Methode des synthetisches Shuffling dargestellt wurde. Durch mehrere Evaluierungsansätze konnte die Sequenz der Genbank den Anforderungen gemäß optimiert werden, so dass das Auftreten ungewollter Mutationen minimiert werden konnte. In dem folgenden Hochdurchsatzscreening von 19000 Klonen der Genbank im vorher etablierten *E.coli* Expressionssystem konnte kein Klon mit Lipaseaktivität isoliert werden. Nichtsdestotrotz handelte es sich hierbei um einen interessanten neuen Ansatz der gerichteten Evolution, der nach Optimierung der Lipaseexpression bzw. des Screeningsystems und möglicherweise nach Herabsetzung des Degenerationsgrades zu neuen Biokatalysatoren mit interessanten Eigenschaften führen sollte.

Insgesamt zeigte diese Arbeit, dass es zur enzymatischen Enantiomerentrennung von MPA im Moment keinen Ersatz zu CalB gibt. Durch die Etablierung der CalB-Expression in *E.coli* wurde die entscheidende Voraussetzung zur Optimierung der noch verbesserungswürdigen Enantioselektivität, vor allem in der Umesterungsreaktion, sowie der noch geringen Thermostabilität geschaffen. Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz der gerichteten Evolution zeigte auf, dass bei evolutiven Mutagenesestrategien stets mehrere Variablen existieren, deren Auswirkungen auf das Ergebnis gegeneinander gewichtet werden müssen. So sollte die Variabilität der Mutantenbibliotheken hoch sein, um Klone mit möglichst neuen Kombinationen von gewünschten Eigenschaften zu erhalten. Gleichzeitig sollte bedacht werden, dass die strukturelle Stabilität der Mutanten mit steigender Variabilität sinkt, so dass der verfügbare Sequenzraum stets begrenzt bleiben muss, um eine zufriedenstellende Ausbeute an funktionellen Klonen zu gewährleisten.

3 Abstract

The goal of this work was the production, design, or creation of potential biocatalysts for the resolution of the model substrate 1-methoxy-2-propanol (MP) or its corresponding ester 1-methoxy-2-propanol acetate (MPA), respectively, and its subsequent biochemical characterisation. The work focussed on the evaluation of different strategies for identification and optimization of these biocatalysts. Classical methods of cloning and biochemical characterization of novel enzymes should as well be used as approaches of directed evolution and rational protein design. The lipase B from *Candida antarctica* (CalB) was known to exhibit high enantioselectivity in hydrolysis reactions of MPA. Therefore, another aspect of this work was the evaluation of possible applications and the availability of CalB for the resolution of MP / MPA.

In the first part of this work 14 recombinant and commercial available hydrolases were tested for their activity and enantioselectivity during hydrolysis of MPA. CalB and the pNB esterase of *Bacillus subtilis* showed strong activity, while only CalB had enantioselectivity suitable for industrial needs ($E > 100$). All other enzymes exhibited no or no significant enantioselectivity. The E-value of the second best lipase from *Burkholderia cepacia* was $E = 6.6$. Considering these facts only CalB, a CalB derivate or a new, yet unknown enzyme seemed to be suitable for the resolution of MPA.

Manco *et al.* described an esterase of the hyperthermophilic Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* that showed interesting properties with regard to the thesis' main goal [1]. The second part of this work covers the heterologous overexpression, purification, and biochemical characterisation of a second hydrolase from the identical organism (LipA). A sequence analysis revealed only very little sequence homology to other lipases. The C-terminal part of LipA showed no similarity to any other protein included in the data bases. A mutant of LipA with deletion of the C-terminal protein half showed significant residual activity indicating a function of the C-terminus as a dimerization domain or DGP binding domain. Ser136 and His210 were identified as members of the catalytic triad. Four residues, two aspartate and two glutamate residues, could be inferred from the sequence as potential proton acceptors but further mutation experiments are needed to identify the responsible residue. Because of its sequential peculiarities LipA could not be included in any of the postulated hydrolase superfamilies [2]. After the functional expression of LipA in *E.coli* the

enzyme was purified to homogeneity using a two step strategy of ammonium sulfate precipitation and immobilized metal affinity chromatography. Since LipA showed strongest activity at 70°C but exhibited only low thermostability at elevated temperatures the enzyme seemed to need extrinsic cofactors like DGP for thermostability. The maximal activity was measured at pH 10, while significant activity was found in the range of pH 7 – 12. LipA showed one of the most alkaline pH activity spectra ever described for hydrolases. The kinetic constants k_M and k_{cat} were determined with 552 μM and 18,08 $\text{s}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Because of its substrate spectrum LipA is a carboxyl esterase rather than a lipase. This results confirms the results of a secondary structure analysis, which showed that LipA seems to lack a typical „lid“-structure. LipA did not hydrolyse MPA and was therefore not considered for *in vitro* evolution regarding the resolution of this substrate.

The enzyme screening demonstrated that only CalB met industrial needs in terms of sufficient enantioselectivity for the resolution of MPA. Therefore, CalB had to be overexpressed in a suitable host for subsequent large scale production as well as for mutagenesis experiments in order to optimize the biocatalyst. Another lipase, Lipase B from *Pseudozyma tsukubaensis* (LipB), revealed high sequence homology to CalB. Through overexpression and biochemical characterization the properties of LipB should be compared to that of CalB. However, after cloning of the gene from genomic DNA LipB was expressed in very low amounts in *P.pastoris*. The culture supernatant did not yield detectable lipase activity, probably due to the low expression level in combination with the use of suboptimal substrates, and prevented further enzyme characterization.

The gene of CalB was amplified from genomic DNA and cloned into pPICZ α A. The lipase was well overexpressed in *P.pastoris* yielding an activity against tributyrine of 595.9 U/mg. This yield surpasses the results from other groups. As expected the activity in hydrolysis of MPA was significantly lower (25 U/mg). By fermentation in a 5 l scale the yield in active enzyme could be significantly enhanced. Up-scaling from shaking flasks to fermenter scale increased the lipase production (ratio activity to biomass) 7-fold. The total enzyme yield of the fermentation was 0.45 g/l and even higher yields seem possible through medium optimization and enrichment with oxygen. Since no by-products were detected on a SDS-PAGE of the fermentation supernatant further purification was not necessary. After the CalB expression was established in *P.pastoris*, rational mutagenesis experiments were performed. CalB shows a C-terminal α -helical structural element, which is not known from any other lipase. Since this element strictly controls the space in the substrate binding pocket we

postulated a causal connection between the high enantioselectivity of CalB for secondary alcohols and this structural element. To verify this hypothesis C-terminal deletion mutants were generated and expressed in *P.pastoris*. No expression could be detected for any of the clones. These results indicated that the C-terminal helical structure may have important stabilizing function in CalB leading to protein misfolding and degradation or that misfolding of the mRNA prevents overexpression. Another approach of rational mutagenesis created mutants which were supposed to lead to a higher enantioselectivity in transesterification. The mutants A281L, A281V, A281F and G39A showed strongly decreased activity in comparison to the wt CalB. Moreover, the enantioselectivity of the mutants was decreased, so that none of them could be used for this work.

An alternative to the rational design of promising mutants is the directed evolution of a biocatalyst. Such methods require a suitable high throughput expression and screening system. The functional expression of CalB in *E.coli* was established in this work. The expression was performed successfully in *E.coli* Origami™ cells at 30°C. Under this conditions the cell colonies showed distinct „halos“, when grown on tributyrine agar plates. Most of the expressed lipase was found in the insoluble fractions of the cells and further optimization of lipase expression by temperature control or alternative vector systems seems possible. The availability of CalB in the *E.coli* expression system represents a milestone in CalB engineering since it paves the way to the directed evolution of this extraordinary biocatalyst.

For the directed evolution of CalB a new method of synthetic gene synthesis could be established. For evaluation of the underlying principle a model enzyme was synthesized and functionally expressed in *E.coli*. The method turned out to be a convenient and fast alternative to the established methods of gene synthesis. Within one week the whole gene *lip1* from the psychrophilic organism *Moraxella sp.* TA144 with a length of 960 bp was synthesized and cloned into the expression vector pJOE. The sequence of the gene was adapted to the *codon usage* of *E.coli* to ensure optimal lipase expression in this heterologous host. The gene was amplified by the *Taq* DNA polymerase and contained three point mutations including one silent mutation. Lip1 was functionally expressed in low amounts in *E.coli* XL-1 *blue* cells. The results indicate that in case of Lip1 the adaptation of the gene to the *E.coli codon usage* did not lead to an optimization of gene expression. The use of other expression vectors like pUC18 or pET22b did not enhance lipase production. Lip1 showed highest hydrolytic activity

but only low stability at 37°C. At 4°C Lip1 showed 43 % residual activity so that the lipase could be characterized as an enzyme tolerating rather than preferring low temperatures. Lip1 appeared as a true lipase with highest activity against tributyrine. Different patterns of substrate specificities were discriminated by this lipase. However, MPA was not hydrolysed by Lip1.

After evaluation of a new, fast and convenient method of gene synthesis a CalB mutant library was created based on this new approach. In this library the outer parts of the sequence were kept conserved while the inner core of 540 bp was highly variable. The conserved outer regions were synthesized using *Vent* DNA polymerase according to *lip1* from *Moraxella* sp. TA144 in consideration of the *codon usage* of *E.coli* and *P.pastoris* as artificial gene fragment. The variable part of the library was synthesized by five consecutive PCRs pursuing the same strategy. After sequencing of some of the PCR products from this first synthesis approach the sequence was optimized in three steps so that the final gene library sequence showed satisfactory quality. Synthesis errors through suboptimal PCR conditions, problems caused by high sequence diversity as well as errors based on inappropriate codons were minimized. In total, the gene library showed a diversity of $10^{63,9}$ leading to a theoretically possible gene library of $10^{63,9}$ different clones. The gene library was screened using the established *E.coli* Origami™ expression system on tributyrine agar plates. From 19000 screened colonies no clone with lipase activity was detected. However, a screening of the entire library was impossible due to its enormous dimensions. The diversity on DNA level achieved by other groups working with synthetic shuffling was significantly lower (7,8 %) [3] than the diversity reached in this work (18,5 %). The average activity decreases with increasing diversity. The missing of any detectable activity in the tested clones was probably due to a low average activity combined with a low expression rate. The optimization of expression in *E.coli* or another expression system like *P.pastoris* or *S.cerevisiae* could help as well as the use of another, more sensitive screening system.

By the continuously increasing amount of organisms with sequenced genomes a variety of putative lipases and esterases are discovered which often exhibit unique properties. An excellent example is the carboxylesterase LipA of *Archaeoglobus fulgidus* which was characterized in this work. The properties of this enzyme differs significantly from other lipases and carboxylesterases. Especially its unusual pH spectrum with significant activity up to pH 12 seems notable for these enzymes. However, the enzyme loses activity very fast

nearly unattached by the reaction temperature. These results contradict to the stability of the recently described carboxylesterase (AFEST) of this thermophilic organism and therefore stress the strong influence of extrinsic factors on the stability of enzymes. In this context also the C-terminal domain of LipA is interesting since there is no homology to any known sequences and therefore the function of this domain seems unclear. Based on literature datas of *Archaeoglobus fulgidus* a new mechanism of sequence specific stabilization by compatible solutes or evolutionary selection of chaperone domains in thermostable enzymes could be indicated.

A comparison of the two eucaryotic lipases of *Candida antarctica* and *Pseudozyma tsukubaensis* as well as the examined mutants indicated clearly the sensitivity of heterologous expression systems on structural or sequential modifications. The lack of functional expression of the mutants and LipB gives evidence on the difficulties in the establishment of effective expression systems. This is particularly true for industrial scale processes, were the costs for enzyme production could represent a major part of the total process costs. Therefore, the work on different biocatalysts made clear that the usage of characterized enzymes or the cloning of single unknown genes is a rather limited method for the discovery of suitable biocatalysts.

The new method of directed gene synthesis using highly degenerated oligonucleotides combines the knowledge of sequential and structural comparisons of characterized enzymes with methods of directed evolution, which base on the principle of random mutagenesis and screening of large enzyme libraries. There are many reasons which could have caused the lack of any mutant with detectable hydrolase activity within the screened part of the library. The mutagenesis experiments of CalB indicated that the expression of particularly this enzyme strongly depends on the sequence. Consequently, the amount of overexpressed variants within this newly established prokaryotic expression system for CalB is probably very low. Moreover, the activity of all characterized mutants was significantly decreased in comparison to the wildtype. The combination of these facts and the extremely wide sequential room leads inevitably to a dramatic decrease in the probability of finding functional clones. The approach of directed evolution pursued in this thesis therefore demonstrates also the coexistence of several variables the effects of which on the results have to be evaluated. So the variability of a mutant library should be high to obtain clones with new combinations of desired properties. At the same time, the structural stability of the mutants decreases with increasing variability, which requires a limitation of the sequential room in order to obtain a satisfactory yield of functional clones.

The creation of a library based on sequences of prokaryotic lipases or esterases seems to have more prospects of success since these enzymes show a better heterologous expression in bacterial hosts. Furthermore, the high amount of characterized prokaryotic lipases leads to a lot of structural informations which could be used for the design of the oligonucleotides. Nevertheless, this approach was limited by the restriction to one defined substrate which should be processed in this work and the low amount of bacterial enzymes with significant activity against MPA.

Despite of these results the new method exhibit an enormous potential in supplementation of the established methods of biocatalyst optimisation. The enormous sequential room which can be customized by this method to the industrial biotechnology queries the effort of environmental screening methods performed by Diversa (San Diego, USA) or BRAIN (Zwingenberg, Germany).

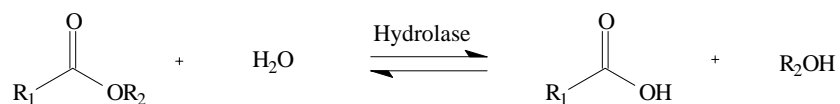
4 Einleitung

4.1 Die Enzymklasse der Hydrolasen: Lipasen und Carboxylesterasen

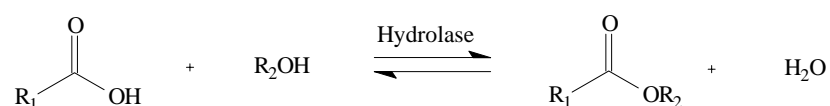
Die Enzymklasse der Hydrolasen (E.C. 3.X.X.X) umfasst eine große Zahl ubiquitärer Enzyme. Zu ihr gehören neben den Lipasen (E.C. 3.1.1.3) und Carboxylesterasen (E.C. 3.1.1.1) auch die Serin-Proteasen (E.C. 3.4.16 + 3.4.21), die Amidasen (E.C. 3.5.1.X), die Hydantoinasen (E.C. 3.5.2) und viele andere.

Hydrolasen katalysieren reversibel die hydrolytische Spaltung kovalenter Bindungen, Lipasen und Carboxylesterasen hydrolysieren hierbei Carboxylesterbindungen. Dabei werden ein Alkohol und eine Carbonsäure gebildet. Neben der Hydrolyse können weitere Reaktionen katalysiert werden: so kann im wasserfreien Medium die Veresterung einer Carbonsäure mit einem freien Alkohol (Veresterung) oder auch mit einem Alkoholrest eines zweiten Esters stattfinden (Umesterung). Bei der Interesterifikation wird ebenfalls in Abwesenheit von Wasser ein Acylrest von einem Ester auf einen anderen übertragen (Abb. 4.1).

1. Hydrolyse

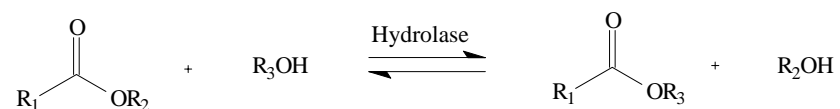


2. Veresterung

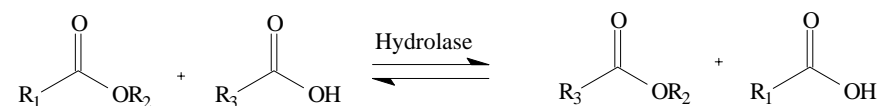


3. Umesterung

Alkoholyse



Acidolyse



4. Interesterifikation

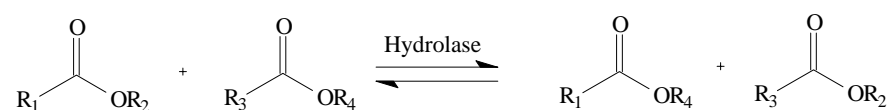


Abbildung 4.1: Von Lipasen und Carboxylesterasen katalysierte Reaktionen.

Lipasen und Carboxylesterasen unterscheiden sich anhand ihrer Substratspezifität. Lipasen setzen bevorzugt wasserunlösliche Substrate an einer Öl – Wasser - Grenzfläche, der sogenannten Interphase, um. Dabei kommt es zur charakteristischen Interphasenaktivierung (s. 4.1.2). Carboxylesterasen bevorzugen hydrophile Substrate; eine Interphasenaktivierung ist für die Funktion dieser Enzyme nicht notwendig.

4.1.1 Vorkommen und Bedeutung von Lipasen und Carboxylesterasen

Lipasen sind ubiquitäre Enzyme, die sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten eine Schlüsselrolle bei der Energiemobilisierung und – erschließung spielen. Beim Säuger findet man Lipasen im Verdauungstrakt, wobei ihre Funktion vor allem in der Hydrolyse der Nahrungstriglyceride liegt. Mehrere Erkrankungen beim Menschen sind auf eine gestörte Lipasefunktion zurückzuführen [4]. In höheren Pflanzen finden sich diese Enzyme meist im Samen, wo die Speicherlipide während der Keimung mobilisiert werden. Auch in einer Vielzahl von Pilzspezies wurden Lipasen nachgewiesen [5]. Bereits 1901 wurden bakterielle Lipasen entdeckt [6], die auch hier eine wichtige Rolle im Fettmetabolismus spielen. Die Lipasen werden dort oft ausgeschleust, um so die in der Umgebung befindlichen Triglyceride durch Hydrolyse der Zelle zugänglich zu machen. Diese extrazellulären Lipasen stellen gleichzeitig potentielle Virulenzfaktoren dar, welche die Lipidmembran von Wirtszellen angreifen und somit zu deren Lyse führen können [7]. So wird eine Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* direkt für eine häufige auftretende Komplikation im Krankheitsverlauf der Cystischen Fibrose verantwortlich gemacht, die oft zum Tode der Erkrankten führt [8].

Über die physiologische Rolle der Carboxylesterasen ist weniger bekannt. Sie lassen sich aus den gleichen Quellen isolieren wie Lipasen und tragen durch Esterhydrolyse ebenfalls zum Zugang zu Nährstoffen bei. Ein Beispiel ist die Öffnung von Lactonen, die als Metabolite durch Oxidation von Cycloalkanen und – alkanonen entstehen [9]. Einige Esterasen scheinen darüber hinaus zum Abbau von Toxinen beizutragen [10, 11].

4.1.2 Molekulare Struktur und Mechanismus der Serin - Hydrolasen

Lipasen und Carboxylesterasen gehören zu den Serin – Hydrolasen. Bei allen funktionellen Unterschieden zeichnen sich diese durch eine strukturelle Gemeinsamkeit aus: die zentrale katalytische Domäne weist eine charakteristische Topologie auf, die als α/β -Hydrolasefaltung (*α/β hydrolase fold*) bezeichnet wird [12]. Dieses Strukturelement besteht aus einem zentralen

β -Faltblatt, dessen β -Stränge in kanonischer Anordnung durch α -Helices verbunden sind (Abb. 4.2). Trotz Abweichungen in einigen Mitgliedern dieser Enzymfamilie bleibt doch die zentrale Topologie dieser Struktur stets erhalten.

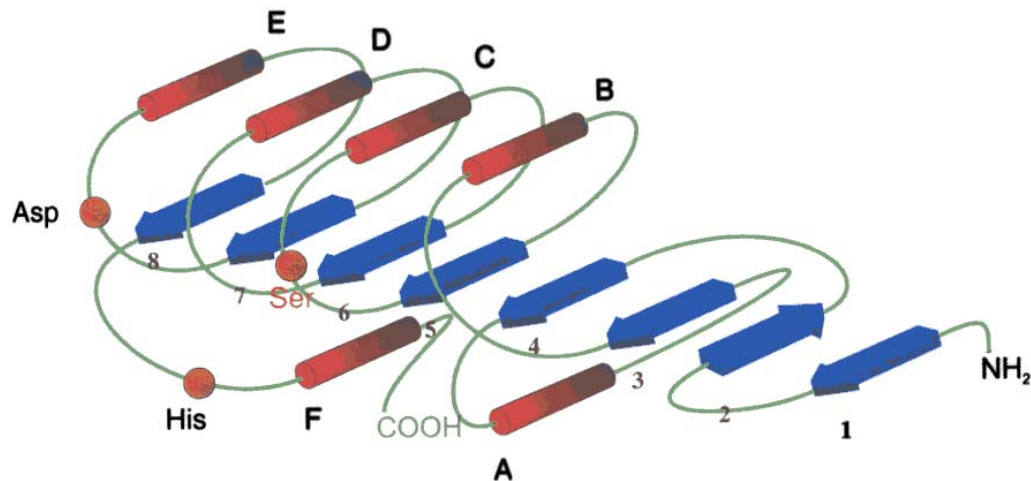


Abbildung 4.2: α/β Hydrolasefaltung der Serin-Hydrolasen.

Aus Henke [13]. Die β -Stränge 1-8 sind als blaue Pfeile, die α -Helices A-F als rote Kegel dargestellt.

Auch das aktive Zentrum der Lipasen und Carboxylesterasen ist konserviert; die sogenannte katalytische Triade besteht stets aus dem nukleophilen Serin, einem Histidin und einem als Protonenakzeptor dienenden Carboxylatrest eines Aspartats oder eines Glutamats. Dabei folgen fast alle bisher beschriebenen Enzyme dieser Klasse bestimmten Regeln [14]:

- Die Anordnung der Aminosäuren der katalytischen Triade in der Sequenz ist immer Ser - Asp/Glu - His
- Das konservierte Pentapeptid Gly/Ala – X – Ser – X - Gly (Ser = Nukleophil) bildet stets eine exponierte Schleife zwischen β -Strang 5 und α -Helix B, der sogenannte „*nucleophile elbow*“
- Die Enzymstruktur umfasst mindestens 5 β -Stränge
- Der Säurerest der katalytischen Triade liegt stets auf einer langen Schleife nach β -Strang 6 oder 7, das Histidin nach β -Strang 8

Neben der katalytischen Triade sind Wasserstoffbrückenbildner, die zusammen die Oxyanion-Bindetasche (*oxyanion hole*) bilden, wichtige Bestandteile des aktiven Zentrums. Durch deren

spezielle räumliche Anordnung stabilisieren sie den tetrahedralen Übergangszustand während der katalysierten Reaktion. Die stabilisierenden Wasserstoffbrücken werden von den Amidprotonen zweier Aminosäuren gebildet, von denen sich eine in direkter Nachbarschaft zum aktiven Serin und die andere auf einer der katalytischen Triade gegenüberliegenden Schleife des Enzyms befindet. Bei den Serinhydrolasen können anhand der Proteinsequenz um das „*oxyanion hole*“ zwei Klassen unterschieden werden. Zur GX - Klasse gehören neben Cutinasen, Phospholipasen und Non - Häm - Peroxidasen vor allem prokaryotische und eukaryotische Lipasen. Zu der GGGX - Klasse gehören bakterielle Esterasen, α - Esterase, eukaryotische Carboxylesterasen, Gallensalz - aktivierte Lipasen, Juvenilhormonesterasen, Hormon - sensitive Lipasen, Acetylcholinesterasen und Thioesterasen [15, 16].

Der von Carter und Mitarbeitern 1988 aufgeklärte Reaktionsmechanismus ist in Abb. 4.3 dargestellt [17]. Der Serinrest wird durch Übertragung eines Protons auf das Histidin der katalytischen Triade stark nukleophil, wodurch er im Folgenden den Carbonylkohlenstoff eines Substratesters angreifen kann, der bereits in der Bindungstasche des Enzyms über Van - der - Waals Kräfte gebunden ist. Der so entstandene tetrahedrale Übergangszustand wird durch die Wasserstoffbindungen in der Oxyanion - Bindetasche stabilisiert. Durch Austritt eines Alkoholats bildet sich im zweiten Schritt ein Acyl - Enzymkomplex, der im nachfolgenden Hydrolyseschritt wiederum über eine tetrahedrale Zwischenstufe in die Carbonsäure und den regenerierten Enzymkatalysator gespalten wird.

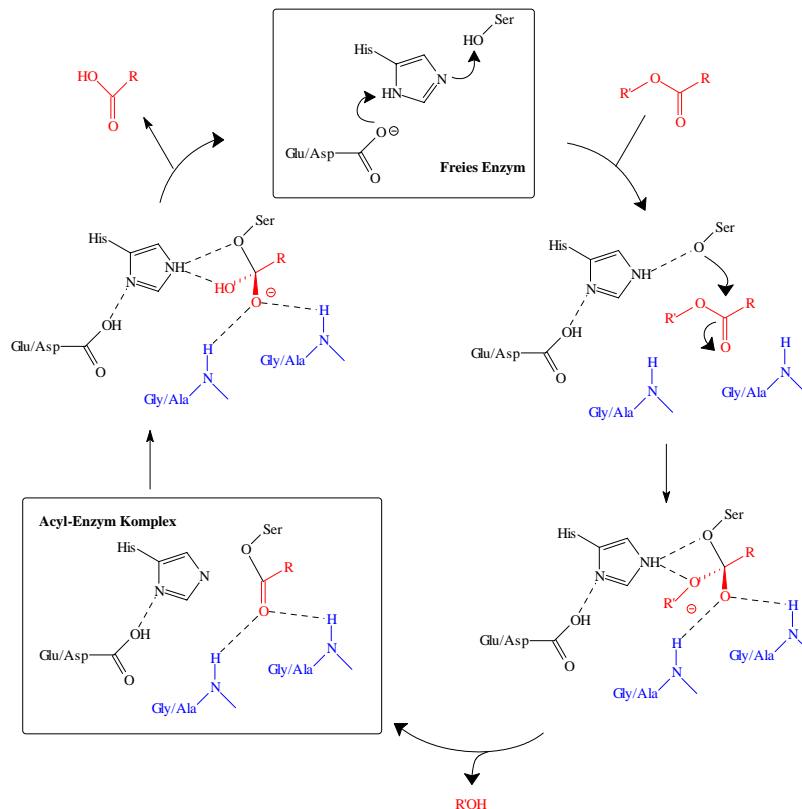


Abbildung 4.3: Reaktionsmechanismus der Esterhydrolyse einer Serin-Hydrolase.

Aminosäurereste der katalytischen Triade sind schwarz dargestellt, am „oxyanion hole“ beteiligte Reste sind blau hervorgehoben. Das Substrat ist rot dargestellt.

Schon 1958 wurde das Phänomen der Grenzflächenaktivierung von Triacylglycerollipasen beschrieben [18]. Diese Enzyme zeigen sehr geringe Aktivität gegenüber einem in Wasser gelöst vorliegenden Substrat; mit dem Anstieg der Substratkonzentration über dessen Löslichkeitsgrenze hinaus steigt die hydrolytische Aktivität jedoch sprunghaft an. Für diesen Effekt zeichnet sich ein aus α -Helices bestehendes Strukturelement verantwortlich, das in der freien inaktiven Form den Zugang zur Substratbindetasche verdeckt. Bei Kontakt zu einer hydrophoben Substratschicht wird dieser „lid“ oder „flap“ genannte Deckel durch eine Konformationsänderung der Lipase geöffnet und erlaubt dem Substrat den Zugang zum aktiven Zentrum. Aufgrund dieser Aktivierungsstrategie setzen Lipasen bevorzugt schlecht wasserlösliche, hydrophobe Substrate um.

Ein entscheidender Unterschied der Carboxylesterasen im Vergleich zu den Lipasen ist das Fehlen eines solchen Strukturelements. Diese Enzyme sind somit nicht auf die Aktivierung durch eine Substratgrenzfläche angewiesen und können so kleine hydrophile Substrate bevorzugt umsetzen. Die Substratspezifität von Lipasen und Carboxylesterasen ist jedoch

nicht nur auf das Vorhandensein oder Fehlen einer „lid“-Struktur zurückzuführen; auch die Konformation der Bindungstasche hat erheblichen Einfluss darauf, ob ein gegebenes Substrat umgesetzt wird.

Die Einteilung der Esterhydrolasen in die Klassen der Lipasen und Carboxylesterasen erfolgt weitgehend nach ihrem Substratspektrum und dem Auftreten einer Grenzflächenaktivierung. Dabei gibt es unter diesen Enzymen durchaus Grenzfälle, die nicht eindeutig einer der beiden Klassen zugeordnet werden können. So zeigen weder die Lipase B aus *Candida antarctica* noch eine Lipase aus *Chromobacter viscosum* eine Grenzflächenaktivierung [19-21].

4.1.3 Lipasen und Carboxylesterasen für biotechnologische Anwendungen

Seit alters her werden biokatalytische Prozesse zur Produktion fermentierter Nahrungs- und Genussmittel eingesetzt. Im Zuge der fortschreitenden Erforschung und Kommerzialisierung dieser Prozesse hat sich eine Vielzahl von neuen Anwendungsmöglichkeiten ergeben. Dabei wurde schon früh die Bedeutung der Lipasen in unterschiedlichen Industriesektoren erkannt. Heute finden Lipasen breite Verwendung als Zusatz in Waschmitteln, bei der Lipid-Modifikation oder auch bei der Käseherstellung [22].

Auch in der organischen Synthese spielen Biokatalysatoren eine immer größere Rolle. Während die klassische Synthesechemie oft hochreaktive Reagenzien oder energetisch aufwendige Rahmenbedingungen wie hohe Temperaturen oder Drücke erfordert, kann die Verwendung von Biokatalysatoren entscheidende Vorteile bieten. So arbeiten Enzyme meist unter milden Reaktionsbedingungen und sind ökologisch unbedenklich. Giftige Nebenprodukte fallen hierbei oft in deutlich geringeren Mengen an, und Enzyme sind als Biokatalysatoren oft mehrmals wiederverwendbar.

Einen großen Anteil der in der Synthese von Feinchemikalien verwendeten Enzyme machen Serin-Hydrolasen und hier insbesondere Lipasen aus [23-25]. Für die industrielle Nutzung eignen sich diese Enzyme durch mehrere Eigenschaften:

- Lipasen sind Cofaktor - unabhängig. Der Zusatz bzw. die Rückgewinnung teurer Cofaktoren wie z.B. NADPH entfällt, die Produktion wird einfacher und kostengünstiger.
- Lipasen zeigen oft eine hohe Lagerstabilität, was den Vertrieb dieser Enzyme entscheidend vereinfacht.
- Viele dieser Enzyme sind bei hohen Temperaturen stabil, wodurch das biokatalytische Verfahren oft vereinfacht oder beschleunigt werden kann.

- Einige Lipasen zeigen eine hohe Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln. Da viele Substrate in Wasser nicht oder nur schlecht löslich sind, macht erst der Einsatz organischer Solventien eine Umsetzung möglich. Eine Produktion in organischem Medium vereinfacht zudem oftmals die Aufarbeitung der Produkte.
- Viele Lipasen zeichnen sich durch eine hohe Chemo-, Regio- und Enantioselektivität gegenüber den unterschiedlichsten Substraten aus (siehe 4.2).

Die Entwicklungen auf pharmazeutischem und pflanzenschutztechnischem Gebiet haben in den letzten Jahrzehnten zu einer Fülle neuer Wirkstoffe auf dem Markt geführt. Einen immer größeren Anteil nehmen Präparationen von enantiomerenreinen, chiralen Wirkstoffen ein. So erreichten Medikamente in enantiomerenreiner Form 1999 einen Gesamtverkaufswert von 115 Milliarden \$ weltweit, was einem Anteil von 32 % der gesamten Arzneimittelverkäufe entspricht [26, 27]. Trotzdem werden viele der synthetisch produzierten biologisch aktiven chiralen Substanzen hauptsächlich als Racemate verkauft. So werden 75 % der chiralen Pestizide weiterhin racemisch verwendet [27]. In den letzten Jahren wurden immer stärker Bemühungen unternommen, einstmals in racemischer Form vertriebene Medikamente und Feinchemikalien dem Markt enantiomerenrein anzubieten, da in vielen Fällen lediglich eine der beiden Formen aktiv ist und die zweite zum Teil erhebliche Nebenwirkungen zeigen kann [28]. So beinhaltet die Synthese enantiomerenreiner Produkte ein enormes Wirtschaftspotential. Die Trennung von Racematen durch Destillationskolonnen oder chromatographische Methoden ist jedoch oft schwierig und kostenintensiv. Die Verwendung von hochselektiven Biokatalysatoren ist somit von hohem Interesse für die chemische Industrie.

4.2 Enantioselektivität

Bereits 1848 entdeckte Pasteur die optische Isomerie von Weinsäurekristallen und begründete so das Phänomen der Chiralität [29]. Seitdem haben das Wissen und das Interesse an chiralen Molekülen stetig zugenommen. Während die Synthese von enantiomerenreinen Produkten durch chemische Trennung der racemischen Ausgangssubstanzen oft schwierig ist, zeigen Enzyme häufig die Eigenschaft, zwischen den Enantiomeren einer chiralen Verbindung unterscheiden zu können. Da sämtliche Enzyme aus L-Aminosäuren aufgebaut sind, bieten Enzyme generell eine homochirale Umgebung. Betrachtet man nun die Stereoisomere eines chiralen Substrats getrennt voneinander, so können sich die energetischen Eigenschaften der entstehenden Substrat-Enzymkomplexe durch die unterschiedlichen Wechselwirkungen des

„enantiomerenreinen“ Enzyms mit den beiden enantiomerenreinen Substratisomeren unterscheiden. Schließlich bestimmt der Unterschied in der freien Aktivierungsenergie ($\Delta\Delta G^\ominus$), die zur Ausbildung der Enzym-Substrat Komplexe aufgebracht werden muss, den Grad der Enantioselektivität des Enzyms.

Die Stereopräferenz einer Enzymreaktion wird durch zwei Größen beschrieben. Zur Bestimmung der chiralen Reinheit eines Reaktionsprodukts wird der Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess*, *ee*) nach folgender Gleichung ermittelt:

$$ee_p = \frac{[P1] - [P2]}{[P1] + [P2]} \quad \text{Gleichung 1}$$

Dabei liegt P1 im Vergleich zu P2 anteilig in höherer Konzentration vor. Zur genauen Bestimmung der Stereopräferenz eines Enzyms bei der Umsetzung eines gegebenen Substrats ist dieser Wert nicht geeignet, da *ee* stark abhängig von der Substratkonzentration ist. Im Verlauf der Reaktion wird das von einem Enzym bevorzugte Substrat - Enantiomer bald in geringerer Konzentration vorliegen als das weniger geeignete Substrat; somit wird der relative Umsatz des schlechteren Substrats steigen und der *ee_p* - Wert mit zunehmendem Umsatz sinken.

Zur besseren Bestimmung der Stereoselektivität wurde daher der Begriff der Enantioselektivität *E* eingeführt, welche die Fähigkeit des Enzyms beschreibt, zwischen den beiden Enantiomeren zu unterscheiden. *E* ist definiert über die Umsetzungsgeschwindigkeiten v_1 und v_2 der beiden Enantiomere E_1 und E_2 [30, 31].

Die kinetischen Eigenschaften vieler Enzyme folgen dem einfachen, von Michaelis und Menten vorgeschlagenen Modell. Nach diesem Modell gilt für das Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten der beiden Enantiomere E_1 und E_2 :

$$\frac{v_1}{v_2} = \frac{\frac{V_{\max,1}}{K_{M,1}} [E_1]}{\frac{V_{\max,2}}{K_{M,2}} [E_2]} \quad \text{Gleichung 2}$$

Dabei ist V_{\max} die maximale Umsatzgeschwindigkeit und K_M die Michaelis-Menten Konstante. Durch Integration kann die Enantioselektivität *E* ermittelt werden:

$$E = \frac{\frac{V_{\max,1}}{K_{M,1}}}{\frac{V_{\max,2}}{K_{M,2}}} \quad \text{Gleichung 3}$$

In Gleichung 2 wird davon ausgegangen, dass die Stereoisomere in getrennten Reaktionen umgesetzt werden. In einer realen Reaktion liegen beide Isomere kompetitiv vor, so dass Näherungsformeln entwickelt werden mussten, um E zu bestimmen. Dabei berechnet sich E aus den Größen des Reaktionsumsatzes und der Enantiomerenüberschüsse der Reaktionssubstrate (ee_s) und – produkte (ee_p) [30].

$$E = \frac{\ln(1 - U(1 + ee_p))}{\ln(1 - U(1 - ee_p))} \quad \text{Gleichung 4}$$

$$E = \frac{\ln(1 - U(1 + ee_s))}{\ln(1 - U(1 - ee_s))} \quad \text{Gleichung 5}$$

Die Gleichungen 4 und 5 lassen sich zusammenfassen:

$$E = \frac{\ln \frac{(ee_p(1 - ee_s))}{(ee_p + ee_s)}}{\ln \frac{(ee_p(1 + ee_s))}{(ee_p + ee_s)}} \quad \text{Gleichung 6}$$

Diese Näherungsformel gilt nur für irreversible Reaktionen wie z.B. die Hydrolyse eines Esters in wässrigem Medium. Bei reversiblen Systemen müssen die Formeln unter Berücksichtigung der Gleichgewichtskonstante angepasst werden.

Bei der Berechnung ist auch zu beachten, dass der E-Wert nicht nur ein Produkt aus Enzym - Substrat Wechselwirkungen ist; auch äußere Faktoren wie Medienzusammensetzung oder Temperatur können erheblichen Einfluss auf die Enantioselektivität ausüben (siehe 4.4.1). Anhand des E - Wertes einer enzymatischen Reaktion kann der industrielle Nutzen einer Reaktion abgeschätzt werden. Normalerweise wird bei E - Werten > 20 von einer theoretischen Nutzbarkeit des Verfahrens zur Racematspaltung ausgegangen, industrielle Anwendung finden jedoch meist nur enzymatische Umsetzungen mit E - Werten > 100 .

Eine Vorhersage der Enantioselektivität ist stets schwierig zu treffen; trotzdem gilt für viele sekundäre Alkohole als Näherungsformel die sogenannte „Kazlauskas Regel“: so werden

hohe E - Werte dann erreicht, wenn sich am Stereozentrum ein kleiner (z.B. Methyl -) und ein großer (z.B. Phenyl -) Substituent befinden. Sekundäre Alkohole mit Substituenten von ähnlicher Größe sind demnach generell schwer zu racemisieren [32].

4.3 Glykolether in der chemischen Industrie

4.3.1 Verwendung

Glykolether und ihre Derivate sind eine bedeutende Klasse von Lösungsmitteln, die für unterschiedlichste Anwendungen genutzt werden. Die häufigste Verwendung finden Glykolether als Lösungsmittel für Farben, Lacke und Tinten, ebenso wie in Reinigungsmitteln. Des Weiteren sind sie ein wichtiger Grundstoff für die kosmetische und elektronische Industrie (Abb. 4.4). Allein DOW Chemical (San Diego, USA), ein Konzern der 40 % des globalen Glykolethermarkts bedient, verkauft pro Jahr ca. 450.000 Tonnen dieser Chemikalien [33].

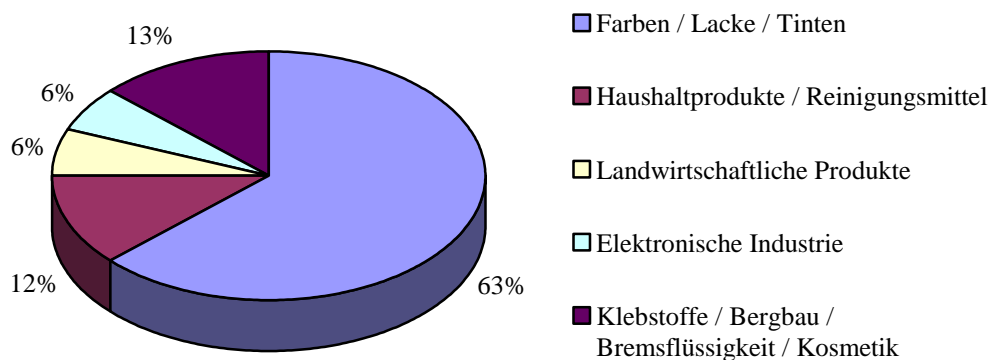


Abbildung 4.4: Industrielle Verwendung von Glykolethern.

Nach Donate, 2002 [33].

4.3.2 Chirale Glykolether

DOW Chemical verkauft zwei Produktlinien von Glykolethern. Die E - Serie wird durch Reaktion von Ethylenoxid mit verschiedenen Alkoholen dargestellt. Die entstehenden Produkte sind achiral und stellen 68 % des gesamten Glykoletherbedarfs. Durch Reaktion von Propylenoxid mit verschiedenen Alkoholen entstehen die chiralen Glykolether der P - Serie (Abb. 4.5) [34].

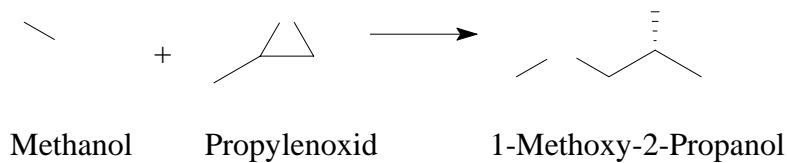


Abbildung 4.5: Chemische Synthese des chiralen 1-Methoxy-2-Propanols (P-Serie).

Nach DOW, Produktinformation [34].

Die in dieser Arbeit verwendeten 1-Methoxy-2-Propanol (MP) und das korrespondierende Acetat (MPA) zeichnen sich vor allem durch ihre im Vergleich zu den übrigen chiralen Glykolethern hohe Wasserlöslichkeit, geringe Viskosität und relativ hohe Verdunstungsrate aus. So findet das unbegrenzt mit Wasser mischbare MP weite Verwendung in Farben und Lacken, als Lösungsvermittler in industriellen Reinigungsmitteln, in Rostentfernern und in Reinigern für extrem harte Oberflächen. MPA eignet sich auch als aktives Lösungsmittel für Harze wie Acrylharze, Epoxidharze oder Polyester. Auch MPA zeigt eine gute Löslichkeit in Wasser (bis zu 20 % (v/v)).

Alle chiralen Glykolether werden als Racemat durch chemische Synthese produziert. In den letzten Jahren stieg das Interesse an enantiomerenreinen Glykolethern, da diese eine Vielzahl an möglichen Anwendungen bieten [33]. So finden sie Verwendung als:

- Reaktive Intermediate für landwirtschaftliche und pharmazeutische Chemikalien
- Lösungsmittel bei der Trennung von Enantiomeren und Diastereomeren durch Kristallisation
- Lösungsmittel bei der kristallisationsinduzierten dynamischen Trennung (CIDR)
- Reagenz bei der selektiven azeotropen Destillation chiraler Substanzen
- Reagenz chiraler Alkoxide und Lewissäuren

- Liganden in Festphasensystemen für die chromatographische Trennung chiraler Substanzen

Die chemische Trennung der Glykoether durch mehrere Destillationsschritte ist teuer und zeitaufwendig, weswegen die chemische Industrie stark an der enzymatischen Enantiomerentrennung (Resolution) interessiert ist. Theoretisch kann die Resolution sowohl durch enantioselektive Hydrolyse von MPA als auch durch Veresterung bzw. Umesterung von MP erreicht werden. Ein Vorteil der Hydrolyse ist die hierbei meist höhere Enantioselektivität; für eine Umesterung spräche die einfachere Aufarbeitung der enantiomerenreinen Produkte aus organischem Lösungsmittel bei der industriellen Anwendung [35, 36].

Ein Problem bei der Suche nach einem geeigneten Biokatalysator zur Resolution von MP bzw. MPA stellt die chemische Beschaffenheit dieser Substanzen dar. Die Enantioselektivität enzymatischer Reaktionen sinkt typischerweise mit zunehmender Hydrophilie und abnehmender Größe des Substrats. Baumann *et al.* zeigten 2000 jedoch eine hydrolytische Umsetzung von MPA durch *Candida antarctica* Lipase B (CalB, s. 4.6.2) mit einem E - Wert von > 100 [32, 37, 38]. Spätere Untersuchungen von DOW Chemical untermauerten diese Ergebnisse [39]. Die Enantioselektivität von CalB in der Umesterung ist mit einem E - Wert von 70 deutlich geringer [35].

4.4 Gewinnung neuer Enzyme für die Biotechnologie

4.4.1 Optimierung enzymkatalysierter Reaktionen

In den seltensten Fällen wird ein im Sinne der biotechnologischen Problemstellung geeignet erscheinendes Enzym auf Anhieb allen im Prozess gestellten Anforderungen genügen. So kann sowohl die Enantioselektivität, als auch die Aktivität und Stabilität des Enzyms unter den oft extremen Prozessbedingungen wie hohen Temperaturen oder organischen Lösungsmitteln leiden. Zur Optimierung von Biokatalysatoren und der entsprechenden Prozesse stehen verschiedene Techniken der organischen Chemie, der Bioverfahrenstechnik und der Biochemie zur Verfügung (Abb.4.6).

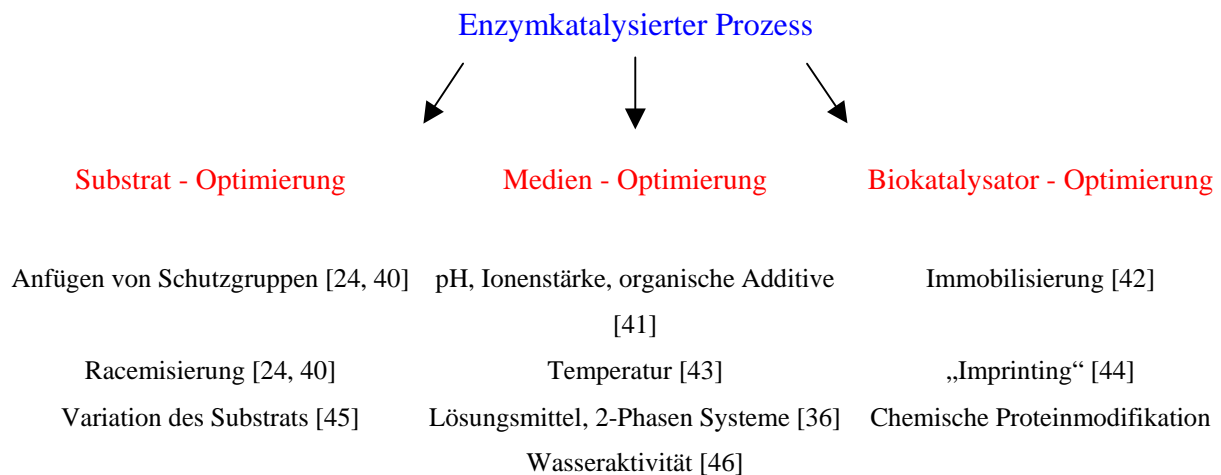


Abbildung 4.6: Möglichkeiten zur Optimierung eines enzymkatalysierten Prozesses.

Am Beispiel der Enantioselektivität kann der große Einfluss der Prozessoptimierung auf eine gewünschte Eigenschaft gezeigt werden:

Da die Fähigkeit eines Enzyms zur Diskriminierung von chiralen Substraten vor allem auf deren räumlicher Anordnung beruht, kann durch Addition bzw. Abspaltung einer chemischen Schutzgruppe die Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum dergestalt verändert werden, dass sich eine erhöhte Enantioselektivität ergibt. Die theoretisch erzielbare Ausbeute an enantiomerenreinem Produkt kann auch durch die Verwendung eines prochiralen oder meso - Substrats oder durch dynamische Racemisierung des verbleibenden, nicht bevorzugten Enantiomers erhöht werden [24, 40]. Da bei der Racematspaltung im Allgemeinen nur eines der entstehenden Produkte industriell interessant ist, können die eingesetzten Substrate variiert werden, wodurch oft eine bessere Ausbeute an enantiomerenreinem Produkt erzielt werden kann. Yang *et al.* beobachteten so bei der Umesterung von (*R/S*)-2-Phenylbuttersäureestern in 1-Hexanol durch *Candida antarctica* Lipase B deutlich bessere Ergebnisse mit Vinylestern als Acyldonor ($E > 100$) als mit Ethylestern ($E = 6,5$) [45].

Eine Vielzahl an Arbeiten demonstrierte den großen Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Enantioselektivität vieler Enzyme. Watanabe *et al.* beschrieben 2001 einen positiven Effekt erhöhter Temperaturen auf die Enantioselektivität Lipase - katalysierter Veresterungen von 2-(4-substituierter Phenoxy) Propionsäuren in organischen Medien [43]. Weitaus häufiger scheinen hohe Temperaturen jedoch durch die zunehmende Flexibilisierung und Destabilisierung der Enzyme einen negativen Einfluss auf die Enantioselektivität zu haben [47]. Durch Umkehrung der Reaktion in organischem Lösungsmittel kann dieser Effekt oft

abgemildert werden, da bei niedrigen Wassergehalten Konformationsänderungen des Enzyms erschwert sind. Die Verwendung organischer Lösungsmittel bietet weitere Vorteile der Prozessführung. Neben der verbesserten Löslichkeit von hydrophoben Substraten und der Verringerung der Gefahr einer mikrobiellen Kontamination können die Reaktionsprodukte leichter isoliert und das unlösliche Enzym aus dem Reaktionsansatz zurückgewonnen werden [36]. Die Wahl des organischen Lösungsmittels kann entscheidenden Einfluss auf die Enantioselektivität ausüben; so kann diese verändert [36, 46, 48, 49] oder sogar umgekehrt werden [50]. Auch die Zugabe gewisser Puffersubstanzen [51] oder organischer Additive wie Amine oder Ether [41] zu Reaktionen in organischen Medien konnte die Enantioselektivität von Lipasen erhöhen. Die Stärke der Wasseraktivität a_w während einer Lipase - katalysierten Reaktion kann ebenfalls starken Einfluss auf die Enantioselektivität nehmen [46].

Neben der Variation der Reaktionsbedingungen und des eingesetzten Substrats kann auch die Form des Biokatalysators selbst den Anforderungen des Prozesses gemäß variiert werden. Vor allem zwei Methoden, die Immobilisierung und das sogenannte *imprinting*, konnten in der Vergangenheit die Enantioselektivität verschiedener Enzyme verbessern. Die Immobilisierung von Biokatalysatoren wurde ursprünglich eingesetzt, um die Wiedergewinnung der Enzyme aus dem Reaktionsansatz zu vereinfachen; oft resultiert daraus auch eine gesteigerte Thermostabilität [52]. Fernandez - Lorente *et al.* zeigten eine elffache Steigerung der Enantioselektivität der *Pseudomonas fluorescens* Lipase bei der Hydrolyse von (*R,S*)-2-Hydroxy-4-Phenylbuttersäureethylester durch Adsorption auf unterschiedlichen Matrices, deren Oberflächenhydrophobizität gezielt modifiziert wurden [42]. Bei der *imprinting* - Technik wird das Enzym in Gegenwart eines Liganden lyophilisiert, wodurch sich die Proteinstruktur ändert. Dieser Konformationswechsel im aktiven Zentrum, der auch beim Einsatz in organischen Lösungsmitteln erhalten bleibt, kann zu einer veränderten Enantioselektivität führen [44]. Eine gute Übersicht über diese Thematik bietet ein Artikel von Berglund, 2001 [46].

4.4.2 Neue Enzyme

Lässt sich eine enzymkatalysierte Reaktion durch verfahrenstechnische Methoden nicht in gewünschten Maße verbessern, bleibt oft nur die Suche nach einem neuen, besser geeigneten Biokatalysator. Bis 1999 wurden nur etwa 15 Lipasen und Esterasen routinemäßig in der Industrie eingesetzt, so dass die Menge an Enzymen, deren Potential noch nicht ausgeschöpft

wurde, beträchtlich sein dürfte [23]. Neben der gezielten Durchmusterung bereits vorhandener Enzymlbibliotheken werden vor allem zwei unterschiedliche Strategien angewandt:

Durch Kultivierung von Organismen aus Umweltproben unter selektiven Bedingungen („Anreicherungskultivierung“) können Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur Verstoffwechslung bestimmter chemischer Substanzen angereichert werden. Durch gezielte Klonierung der Gene der für den Substratumsatz verantwortlichen Enzyme können so neue Biokatalysatoren gewonnen werden. Auf diese Weise isolierten Cardenas *et al.* 2001 2000 Mikroorganismen mit lipolytischer Aktivität aus Bodenproben und selektierten sie hinsichtlich ihrer Stereoselektivität gegenüber verschiedenen organischen Substraten [53]. Die Tatsache, dass nach vorsichtigen Schätzungen lediglich 0,1 – 1 % aller Bakterien und nur 5 % aller Pilz - Spezies bekannt bzw. kultiviert sind betont die Möglichkeiten eines solchen Mikroorganismenscreenings [54-57]. Die Limitierung dieser Methode liegt vor allem in der Kultivierbarkeit der Mikroorganismen unter Laborbedingungen. Tab. 4.1 gibt eine Übersicht über den Anteil kultivierter Mikroorganismen aus verschiedenen Habitaten.

Tabelle 4.1: Prozentualer Anteil kultivierter Mikroorganismen aus einzelnen Habitaten im Vergleich zu der darin enthaltenen Gesamtzahl an Zellen. Nach Amann *et al.*, 1995 [58].

Lebensraum	Anteil der kultivierten Mikroorganismen [%]
Meerwasser	0,001 – 0,1
Süßwasser	0,25
Seewasser (mesophil)	0,1 – 1
unbelastetes Mündungswasser	0,1 – 3
Belebtschlamm	1 – 15
Sediment	0,25
Boden	0,3

Aufgrund der beschriebenen Problematik der Kultivierbarkeit von Mikroorganismen hat in den letzten Jahren ein Paradigmenwechsel im Bereich des Enzymscreenings stattgefunden. Statt Mikroorganismen anzureichern und zu kultivieren wird heute meist ein sogenanntes Metagenom - Screening durchgeführt. Dabei wird angereicherte, aufgereinigte und normalisierte genomische DNA aus Bodenproben kloniert und dem biochemischen Screening zugänglich gemacht [59]. So erhaltene Genbanken können durch spezielles Expressionsscreening nach Enzymen mit bestimmten Eigenschaften durchsucht werden. Einige Firmen haben sich bereits auf die Erstellung und Durchmusterung solcher

Bibliotheken spezialisiert, wie etwa BRAIN (Zwingenberg, Deutschland), Diversa (San Diego, USA) oder ThermoGen (Chicago, USA). Trotz des enormen Potentials solcher Metagenombibliotheken sind auch von den genannten kommerziellen Anbietern bislang nur wenige wirkliche Erfolge bekannt. Die Ursachen hierfür sind wohl in der enormen Komplexität der Methodik, vor allem im Bereich der DNA - Aufarbeitung, zu suchen.

4.4.3 Anpassung vorhandener Enzyme

Neben dem Ansatz neue Enzyme für eine bestimmte biotechnologische Problemstellung zu gewinnen, nahm die Verbesserung vorhandener Enzyme durch molekularbiologische Methoden in den letzten Jahren einen immer größeren Stellenwert ein. Prinzipiell können zwei unterschiedliche Strategien zur Optimierung eines Biokatalysators unterschieden werden:

- Die gerichtete Evolution beruht auf der zufälligen Mutagenese eines Enzyms und dem anschließendem Screening großer Enzybibibliotheken. Genaue Kenntnisse über Struktur und Mechanismus sind dabei nicht notwendig. Voraussetzung ist jedoch ein an die Problemstellung angepasstes Screeningsystem, welches die Durchmusterung auch großer Expressionsbibliotheken erlaubt.
- Durch rationales Proteindesign können spezifische Mutationen in das Enzym eingebracht werden, die im Sinne der Problemstellung aussichtsreich erscheinen. Diese Vorhersagen aussichtsreicher Mutationen werden *in silico* durch Methoden der Proteinmodellierung („*molecular modeling*“) getroffen. Voraussetzung hierbei ist genaue Kenntnis über die Struktur und den Mechanismus des Zielenzyms, die resultierende Enzybibibliothek ist jedoch recht begrenzt und bedarf keines speziellen Hochdurchsatz - Screeningsystems.

4.4.3.1 Gerichtete Evolution

Die Anwendung evolutiver Methoden zur Anpassung ganzer Organismen an eine bestimmte Problemstellung wurde schon viele Jahrzehnte, zum Teil mit großem Erfolg, durchgeführt. Dabei wurden mutagene Umwelteinflüsse wie UV - Strahlung, chemische Agenzien, Transposone oder auch Kälte [60] zur Anpassung ganzer Stoffwechselwege in Richtung der gewünschten Eigenschaft eingesetzt. Erst nach der Erfindung der Polymerase - Kettenreaktion 1986 durch Mullis *et al.* [61] wurde Ende der achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts

versucht, die Eigenschaften isolierter Enzyme durch molekularbiologische Methoden zu verbessern. Sämtliche Methoden der gerichteten Evolution laufen nach dem in Abb. 4.7 dargestellten Schema ab. Auf eine zufällige Mutagenese des Enzyms folgt die Durchmusterung der entstehenden Genbibliothek durch funktionelle Screeningmethoden. Die in ihren Eigenschaften verbesserten Mutanten können dann einer weiteren Mutagenese - Runde zugeführt werden. Mittlerweile gibt eine Vielzahl an Übersichtsartikeln Überblick über die Entwicklungen im Bereich der gerichteten Evolution von Biokatalysatoren [62-76].

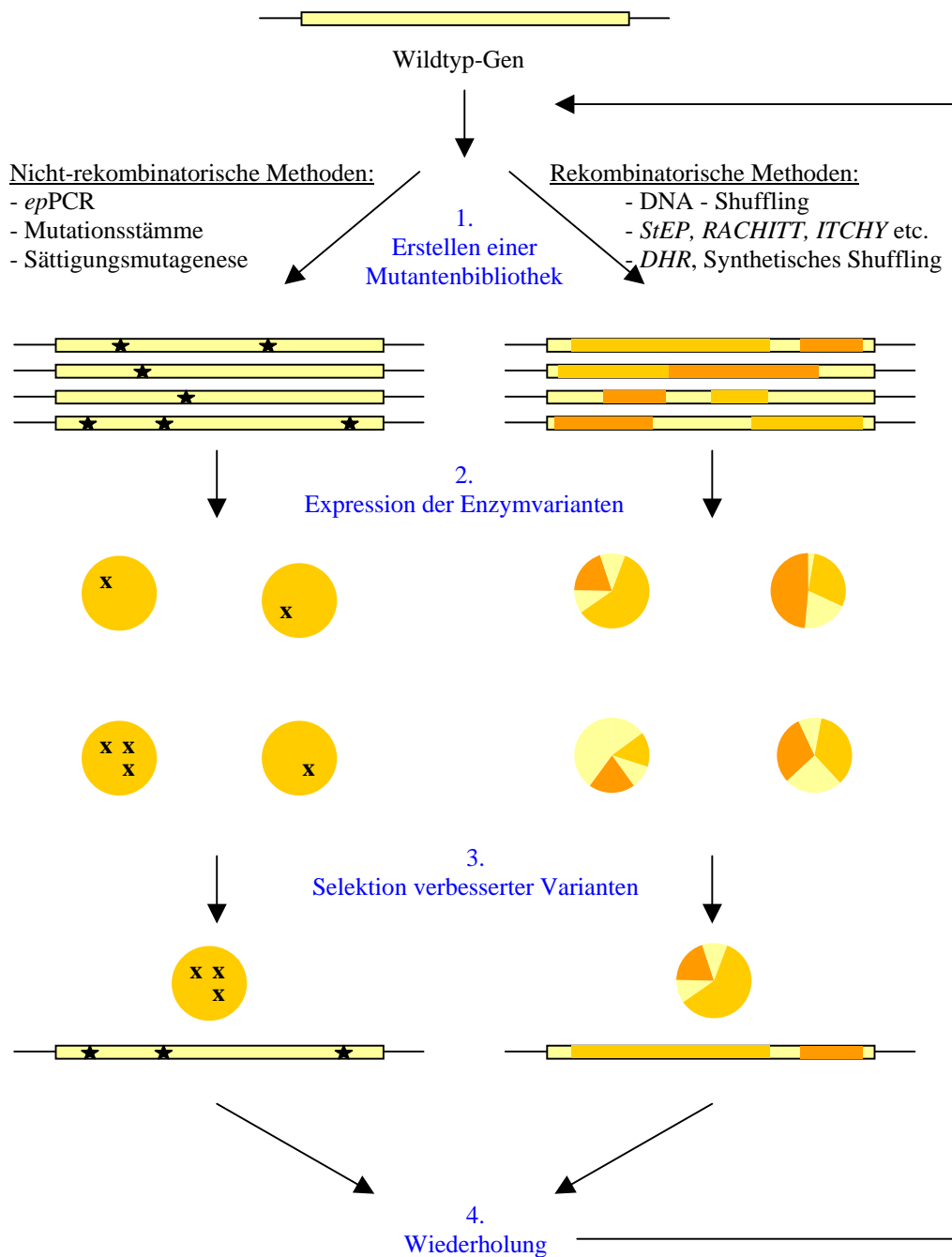


Abbildung 4.7: Allgemeine Prinzipien der gerichteten Evolution.

4.4.3.1.1 Klassische genetische Methoden

Bereits 1989 entwickelten Leung *et al.* eine Methode zur Mutagenese eines Gens durch Amplifikation unter suboptimalen Bedingungen [77]. Während dieser sogenannten *error-prone* PCR (*epPCR*) kommt es vermehrt zu Basenfehlpaarungen und somit zu Mutationen. Durch diese heute fest etablierte Methode konnten bereits eine große Zahl an Biokatalysatoren verbessert werden [78-84]. Nichtsdestotrotz erfährt diese Methodik ihre Limitation in der Mutationsfrequenz innerhalb des Gens. Tatsächlich wurde eine extreme Verbesserung einer Enzymeigenschaft oder gar die Kombination mehrerer verbesserter Eigenschaften nur selten beobachtet.

Eine in Bezug auf Frequenz und Verteilung der Mutationen mit der *epPCR* vergleichbare Methode beruht auf der Verwendung von Mutationsstämmen (z.B. *Epicurian coli* XL1-Red; Stratagene, La Jolla, USA). Diese Organismen enthalten Defekte in ihren DNA - Reparaturmechanismen [85-88].

Eine ebenfalls häufig verwendete Technik ist die Sättigungsmutagenese. Hierbei werden Aminosäuren an sogenannten „*Hot spots*“, d.h. Positionen, die sich als entscheidend zur Verbesserung eines Enzyms in eine gewisse Richtung hin herausgestellt haben, gegen alle weiteren möglichen Aminosäuren ausgetauscht. Da der Effekt eines einzelnen Aminosäureaustauschs jedoch oft begrenzt ist und erst in Kombination mit anderen, oft nicht vorhersehbaren Mutationen deutlich wird, wird diese Methode meist in Kombination mit z.B. der *epPCR* eingesetzt [75, 89, 90].

Neben den genannten Ansätzen wurde eine Vielzahl an rekombinatorischen Methoden entwickelt, die eine Form der sexuellen Evolution von Proteinen ermöglicht. Bei der klassischen Methodik des sogenannten DNA - Shufflings, welches 1994 von Stemmer *et al.* entwickelt wurde, wird das zu mutierende Gen („Parental - Gen“) durch partiellen DNase Verdau fragmentiert und die resultierenden Fragmente mittels spezieller PCR - Techniken reassoziert, wobei es zu einzelnen Punktmutationen kommt [91-93].

Eine Variation der klassischen Methode beruht auf dem Einsatz mehrerer Parental - Gene, z.B. verschiedener bereits verbesserter Klone aus einer *epPCR* Genbank. Die so erhaltenen Rekombinanten können Variabilitäten zeigen, die allein mit z.B. der *epPCR* nicht erreicht werden [94-96]. Schließlich ist es beim „*DNA family shuffling*“ möglich, statt Variationen eines Gens homologe Gene aus unterschiedlichen Quellen als Parental - Gene einzusetzen [94-99].

Ein häufiges Problem der nicht - rekombinatorischen Mutagenesestrategien ist der Verlust positiver Eigenschaften durch Erzeugung einer anderen [100, 101]. Ein Ausweg wäre die

„Züchtung“ aus mehreren Parental - Enzymen, welche eine positive Eigenschaft wie z.B. Stabilität teilen und die Suche nach „Nachkommen“ mit zusätzlichen günstigen Eigenschaften [98]. Der entscheidende Vorteil des DNA - Shufflings liegt somit in der echten Rekombination unterschiedlicher Parental - Gene, die, ähnlich der natürlichen Rekombination während der Meiose, zu einer Rekombination des Phänotyps führt. Die Methodik ist damit eine *in vitro* Adaptation der klassischen Tier - und Pflanzenzüchtung, bei der ebenfalls ausgewählte Parental - Individuen durch Rekombination Nachkommen mit neuen Kombinationen erwünschter Eigenschaften hervorbringen [102, 103].

Die größte Limitierung der DNA - Shufflingmethoden ist die Seltenheit von Einkreuzungsereignissen an benachbarten DNA - Bereichen („*high resolution crossover*“), sowie die Abhängigkeit der *crossing over* Ereignisse von der Sequenzsimilarität. Das führt dazu, dass das DNA - Shuffling kurzer Gene problematisch ist und benachbarte Polymorphismen gekoppelt in der resultierenden Genbank auftreten. Die Tatsache, dass *crossing over* Ereignisse bevorzugt an Bereichen hoher Sequenzsimilarität auftreten, führt zu einem Austausch ganzer Sequenzblöcke und zu unbefriedigender Rekombination von Genen geringer Homologie [104, 105].

Neuere rekombinatorische Methoden versuchen die oben genannten Limitierungen zu umgehen. Zhao *et al.* entwickelten 1998 den sogenannten *staggered extension process (StEP)* bei dem es zur Rekombination verschiedener Parental - Gene ohne partiellen DNase Verdau nur durch spezielle PCR - Techniken kommt [106]. Auch die Methode des *random priming* bedient sich spezieller PCR - Techniken [107]. Dieses Verfahren unterscheidet sich hauptsächlich in der Art und Weise der Gewinnung der DNA - Fragmente. Bei der von Coco *et al.* 2001 entwickelten Methode des „*random chimeragenesis on transient templates*“ (*RACHITT*) werden dagegen rekombinierte Gene an einem Gerüst einzelsträngiger DNA (ssDNA) mittels einer Reihe enzymatischer Reaktionen zusammengefügt [108, 109]. Durch *RACHITT* konnte eine höhere Frequenz und bessere Verteilung der *crossing over* Ereignisse erreicht werden; das Protokoll dieser Methode ist jedoch extrem kompliziert [105]. Die Abhängigkeit kombinatorischer Methoden von der Homologie der Parental - Gene wurde erstmals 1999 von Ostermeier *et al.* durch „*incremental truncation for the creation of hybrid enzymes*“ (*ITCHY*) überwunden. Die Methode beruht auf wiederholter schrittweiser Verkürzung der Parental - Gene durch Exonuklease III und anschließender Ligation des partiellen Verdau. Hierbei gelang es, Hybridenzyme aus Parental - Sequenzen von nur 50 % Sequenzidentität auf DNA - Ebene zu erzeugen. Viele der funktionellen Hybride zeigten *crossing over* Ereignisse an DNA - Loci ohne jede Sequenzhomologie [110-112]. Bei

SCRATCHY wird die *ITCHY* - Methode durch eine nachfolgende Runde des klassischen DNA - Shufflings ergänzt. Die Anzahl der *crossing over* Ereignisse konnte hierbei gesteigert werden [113].

4.4.3.1.2 Synthetisches DNA-Shuffling

2002 entwickelten Coco *et al.* die dem *RACHITT* ähnliche, vereinfachte Methode des *DHR* („*degenerate homoduplex recombination*“). Dabei dienen synthetische degenerierte Oligonukleotide als Gerüst, welches durch ebenfalls degenerierte „Brückenoligonukleotide“ zusammengefügt und ligiert wird. In einem abschließenden PCR - Schritt wird der komplementäre Strang synthetisiert [114, 115]. Durch *DHR* konnte eine Hybridbibliothek des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) von Maus und Mensch dargestellt werden, deren *crossing over* Rate und Verteilung statistisch nicht von einer rein zufälligen Verteilung aller parentalen Polymorphismen unterscheidbar war.

Während *DHR* auf einer einzelnen Hybridisierung und Ligation degenerierter, synthetischer Oligonukleotide beruht, spricht man bei Rekombination synthetischer degenerierter Oligonukleotide durch „*overlap extension*“ PCR von synthetischem DNA - Shuffling [105]. Ness und Mitarbeiter veröffentlichten 2002 das synthetische Shuffling von 15 Subtilisin - Genen, welche Sequenzidentitäten auf DNA - Ebene zwischen 71,4 und 99,5 % zeigten. Dabei wurden 16 Gerüst - Oligonukleotide und 14 Zusatz - Oligonukleotide verwendet, welche sämtliche Variationen der Parental - Gene enthielten. Ein Vergleich der so erhaltenen Genbank mit einer Genbank eines klassischen DNA - Shufflings der 15 Subtilisin - Gene ergab eine stark erhöhte Diversität der Mutanten aus synthetischem Shuffling, sowohl auf DNA - als auch auf Funktionsebene [3, 98]. 2003 veröffentlichten Zha *et al.* „*assembly of designed oligonucleotides*“ (*ADO*), eine weitere Form des synthetischen Shufflings. Hier wurden überlappende, degenerierte Oligonukleotide in einer primerfreien PCR zusammengefügt und die erhaltene Genbank im Anschluss durch Amplifikation mit endständigen Primern vervielfältigt. In dieser Arbeit wurden Hybridenzyme zweier Lipasen von *Bacillus subtilis* (LipA und LipB) dargestellt; die resultierende Genbank enthielt Klone hoher Diversität und teilweise deutlich gesteigerter Enantioselektivität gegen ein Meso-Diacetat [116].

Zusammenfassend bieten die synthetischen Methoden des DNA - Shufflings eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber den klassischen Vorgehensweisen:

- durch Verwendung rein synthetischer Oligonukleotide ist die Methode vollständig unabhängig von der Homologie der Parental - Gene

- *crossing over* Ereignisse sind auf ganzer Sequenzlänge mit hoher Frequenz möglich, auch an direkt benachbarten Bereichen, in Regionen geringer Homologie und in sehr kurzen Genen
- die Verwendung synthetischer Oligonukleotide erlaubt die Erzeugung „künstlicher“ Diversität durch Variationen von in den Parental - Genen konservierten Aminosäuren
- Diversität auf DNA - Ebene kann reduziert werden, wodurch die Methodik einerseits einfacher wird und die Codon - Präferenz des entsprechenden Expressionssystems berücksichtigt werden kann
- die zu rekombinierenden Gene müssen nicht kloniert im Labor zur Verfügung stehen, da kein DNA - Material der Parental - Gene benötigt wird
- bei genauer Kenntnis der Funktion eines zu rekombinierenden Gens wird kein zweites Parental - Gen zum Genbank - Design benötigt

Durch synthetisches Shuffling kann von einem Protein mit N Aminosäuren theoretisch eine Bibliothek mit 20^N Varianten gebildet werden. Die Limitierung einer solchen Genbank liegt daher vor allem in der Zahl der Mutanten, die mit dem zur Verfügung stehenden Screeningsystem getestet werden können.

4.4.3.2 Rationales Proteindesign

Beim rationalen Proteindesign wird mittels bioinformatischer *in silico* Methoden (*molecular modeling*) versucht, Vorhersagen darüber zu machen, welche Veränderungen der Primärstruktur eines Enzyms zu einer Verbesserung der katalytischen Eigenschaften führen. Neben der Kenntnis der Aminosäuresequenz sind hierfür auch die Struktur des Enzyms aus einer Röntgenstrukturanalyse oder durch NMR-Technik oder ein genaues Strukturmodell, sowie Kenntnisse der mechanistischen und dynamischen Vorgänge während der Katalysereaktion nötig. Ein Problem des rationalen Proteindesigns liegt in der Komplexität der intramolekularen Wechselwirkungen eines Proteins, wobei schon die Änderungen einzelner Wasserstoffbrücken zu Konformationsveränderungen und damit zum Aktivitätsverlust führen können. Somit ist auch die Auswirkung einer Merkmalsänderung (z.B. erhöhte Enantioselektivität) auf eine andere Eigenschaft (z.B. Stabilität) kaum vorhersagbar [38].

Da in den letzten Jahren eine immer größere Menge an Strukturen und Mechanismen einzelner Enzyme aufgeklärt wurde, befindet sich das rationale Proteindesign in einem rasanten Aufschwung. Gestützt wird dieser Trend durch die Postulierung eines modularen

Aufbaus vieler Biokatalysatoren, wodurch der Erfolg des rationalen Proteindesigns erheblich erhöht werden könnte [117]. In der Vergangenheit wurden die besten Ergebnisse des rationalen Designs in Kombination mit Methoden der Zufallsmutagenese erzielt [63].

Vor der Wahl der geeigneten Methodik zur Optimierung eines Biokatalysators müssen grundsätzliche Überlegungen ihrer Eignung zur Lösung des vorliegenden Problems getroffen werden. Tab. 4.2 gibt eine Übersicht über Vor- und Nachteile der einzelnen Strategien.

Tabelle 4.2: Vor- und Nachteile der gerichteten Evolution bzw. des rationalen Proteindesigns.

	Gerichtete Evolution	Rationales Design
Verfügbarkeit des Wildtyp-Gens	- Gen muss bei den klassischen Methoden kloniert vorliegen + Ausnahme: Synthetisches Shuffling	- Gen muss zur Mutagenese kloniert vorliegen
Expressionssystem	- Enzyme müssen funktionell in einem effektiv zu transformierenden und leicht zu kultivierenden Organismus exprimiert werden → Normalerweise <i>E.coli</i> Ausnahmen: <i>S.cerevisiae</i> [99, 118], <i>B.subtilis</i> [119-121]	+ Jeder Organismus, der transformierbar ist und in dem das Wildtyp-Enzym exprimiert wird, ist geeignet
Screeningsystem	- Es muss eine Screening-Methode zur Verfügung stehen, die eine Durchmusterung großer Enzymbibliotheken erlaubt; dabei muss die effektive Erkennung der gewünschten Eigenschaft gewährleistet sein	+ Die wenigen Mutanten eines rationalen Ansatzes können mit aufwändigen Methoden (GC, HPLC etc.) getestet werden
Vorkenntnisse	+ Strukturkenntnisse und genaues Verständnis der Mechanismen der Enzyme sind nicht notwendig	- Kenntnis der strukturellen und mechanistischen Eigenschaften des Enzyms sind absolute Voraussetzung
Arbeitsaufwand	- Sowohl Erstellen der Enzymbibliothek als auch Screening der Mutanten erfordert meist erheblichen Zeitaufwand	- Aufklärung von Enzymstrukturen und Mechanismen sowie Modellierung <i>in silico</i> bedeutet großen Zeitaufwand + Falls Kenntnisse vorliegen sind Erzeugung einzelner Mutationen und ihre Charakterisierung wenig aufwendig
Erfolgsbilanz	+ Durch gerichtete Evolution wurden bereits eine Vielzahl an Biokatalysatoren entscheidend verbessert	- Nur wenige Beispiele sind bekannt, in denen Enzyme durch rationales Design erheblich verbessert wurden [13] + Gute Ergebnisse wurden in Kombination mit Methoden der Gerichteten Evolution erzielt [63]

4.5 Heterologe Proteinexpression

Die Möglichkeit der heterologen Proteinexpression hatte einen enormen Einfluss auf die Nutzung von Proteinen in industriellen Anwendungen, der Medizin und der Forschung. Während Proteine bis in die 70er Jahre ausschließlich aus ihren natürlichen Quellen mit meist niederen Ausbeuten isoliert wurden, gelang es Itakura *et al.* 1977 erstmals, ein kleines Peptid heterolog in *Escherichia coli* zu exprimieren [122]. Die heterologe Expression von Proteinen in verschiedenen Wirten machte es einerseits möglich, Proteine aus schwer zugänglichen Quellen, z.B. aus *Archaea*, zu nutzen; andererseits vereinfachte sie die Erforschung und Manipulation verschiedenster biotechnologisch interessanter Enzyme.

4.5.1 Entscheidende Faktoren

Alle verfügbaren Expressionssysteme zeigen eine eigene Charakteristik, welche einen Einfluss auf das zu exprimierende Protein und seine Anwendbarkeit auf die jeweilige Fragestellung haben kann. So ist es beispielsweise bei therapeutisch eingesetzten Proteinen notwendig, die korrekten posttranslatorischen Modifikationen zu gewährleisten, um einen immunologischen Schock der Patienten zu verhindern [123, 124]. Proteine für industrielle Anwendungen wiederum müssen möglichst preiswert zu produzieren sein. Viele Proteine lassen sich generell nur in speziellen Wirten funktionell exprimieren. Die wichtigsten Faktoren für die Wahl eines geeigneten Expressionssystems sind im Folgenden aufgeführt:

Codonpräferenz

Entgegen dem biologischen Grundsatz der Universalität des genetischen Codes gibt es bei der Verwendung der Codons (*codon usage*) teilweise große Unterschiede zwischen den Organismen. Mit der Verwendung bevorzugter Codons in einem Gen kann der Expressionslevel korrelieren, wie beispielsweise für *E.coli* und *P.pastoris* gezeigt wurde [125-132]. Rotticci *et al.* generierten 2001 eine Mutante der *C.antarctica* Lipase B, bei der ein Serin - Codon durch ein Alanin - Codon ersetzt war; ein weiteres Serin - Codon war durch ein anderes Serin - Codon zur Generierung einer Restriktionsschnittstelle ersetzt. Im Gegensatz zum Wildtyp - Enzym konnte keinerlei Expression der Mutante im verwendeten *P.pastoris* - Expressionssystem nachgewiesen werden; nach Ersetzen der beiden Codons durch häufiger genutzte Codons für Alanin bzw. Serin konnte eine stabile Expression der Mutante etabliert werden [133]. Die Codonpräferenz beruht vermutlich auf unterschiedlichen Konzentrationen

der jeweiligen tRNAs in der Zelle [134, 135] und unterschiedlicher Translationsraten der Codons [136].

Ein seltenes Phänomen ist die Codierung verschiedener Aminosäuren durch bestimmte Codons in unterschiedlichen Spezies. Einige Mitglieder der Gattung *Candida* benutzen GUC, welches im universellen Code für Leucin codiert, als Codon für Serin [137, 138].

Posttranslatorische Modifikationen

Die Bedeutung und Form der posttranslatorischen Modifikationen von Proteinen unterscheiden sich grundlegend in Prokaryoten und Eukaryoten. Die in Prokaryoten nicht vorkommende Proteinglykosylierung spielt eine bedeutende Rolle in Eukaryoten. Bei der N - Glykosylierung werden im Lumen des Endoplasmatischen Retikulum (ER) Oligosaccharide an Asparaginreste innerhalb der Erkennungssequenz Asn – Xaa - Ser/Thr angefügt. Über den Golgiapparat werden die so gekennzeichneten Proteine an ihren Bestimmungsort geschleust [139]. Bei der O - Glykosylierung, die in Säugern im Golgiapparat und bei Hefen im ER stattfindet, werden Serin - und Threoninreste mit Zuckerresten verknüpft. Es wird angenommen, dass diese Form der Prozessierung eine wichtige Rolle bei der Sekretion und Verankerung der Proteine spielt [140]. Glykosylierungen haben einen tiefgreifenden Effekt auf die Eigenschaften und Funktionalität eines Proteins. So schützen sie die Proteine durch sterische Hinderung vor Proteaseverdau, erhöhen deren Löslichkeit und sind oft unerlässlich für die Aktivität von Enzymen [141, 142].

Ebenfalls zu den posttranslatorischen Modifikationen gehören die Proteinreifung durch proteolytische Spaltung [143], die Phosphorylierung zur Aktivierung oder Deaktivierung von Proteinen vor allem in Signaltransduktionswegen [144] oder die Acetylierung zur Verankerung von Proteinen in biologischen Membranen [145].

Zelluläres Targeting

Das Targeting eines rekombinanten Proteins, das heißt der zielgerichtete Transport von Proteinen in bestimmte intra - oder extrazelluläre Kompartimente anhand von Signalsequenzen, kann einen großen Einfluss auf dessen Funktionalität ausüben. Eine unphysiologisch hohe Konzentration eines überexprimierten Proteins im Zytoplasma der Zelle führt oft zur Bildung von Einschlusskörpern, sogenannter *inclusion bodies*. Diese entstehen, wenn falsch gefaltete Proteine über exponierte hydrophobe Bereiche aggregieren [146]. Auch freie Cysteine und Prolinreste tragen zur Bildung von *inclusion bodies* bei. Die *in vitro* Rückfaltung solcher *inclusion bodies* ist meist aufwändig und ineffektiv. Andererseits

sind rekombinante Proteine in *inclusion bodies* vor der Degradation durch Proteasen geschützt und lassen sich meist einfach durch Zentrifugation von der löslichen Fraktion der Zelle abtrennen, was die Aufreinigung des Proteins extrem vereinfachen kann [147]. Auch lassen sich so Proteine exprimieren, die in löslicher Form einen toxischen Effekt auf die Wirtszelle ausüben würden [148]. Die Bildung solcher Einschlusskörper ist vor allem in Bakterien oft beschriebenes Phänomen, jedoch wurden *inclusion bodies* auch in *S.cerevisiae*, Insektenzellen und Säugerzellen beobachtet [148-151].

In Gram - negativen Bakterien wie *E.coli* kann ein rekombinantes Protein mit einer entsprechenden Signalsequenz auch in den periplasmatischen Raum sekretiert werden. Die dort herrschenden nichtreduzierenden Bedingungen und die Anwesenheit von Disulfid - Isomerasen vereinfachen oft die Ausbildung von Disulfidbrücken und somit die korrekte Faltung eines Proteins [152].

In Gram - positiven Bakterien und Eukaryoten kann ein rekombinant exprimiertes Protein bei Fusionierung mit einer entsprechenden Signalsequenz in das Medium sekretiert werden. Die Sekretion begünstigt die korrekte Faltung und posttranslatorische Modifikationen eines Proteins, da es bei der Passage durch die einzelnen Organellen wie ER oder Golgiapparat ähnliche Qualitätskontrollen durchläuft wie in seinem natürlichen Wirt [139]. Auch die Aufreinigung der Proteine wird durch Sekretion ins Medium vereinfacht, da hier die Kontamination mit anderen Proteinen weitaus geringer ist. Ein Nachteil der extrazellulären Proteinproduktion kann die Degradation durch endogene, ins Medium sekretierte Proteasen sein. Das Problem wird meist durch Verwendung spezieller Protease - defizienter Wirtsstämme wie *P.pastoris* SMD1168 umgangen [153].

4.5.2 Expressionssysteme

Prokaryotische Systeme

Das Gram - negative Bakterium *E.coli* ist bis heute der am häufigsten genutzte Wirtsorganismus zur heterologen Proteinexpression. Eine Vielzahl von Expressionsvektoren und von an bestimmte Laboranforderungen angepassten Stämmen ist mittlerweile kommerziell erhältlich und erlaubt eine schnelle und einfache Expression rekombinanter Proteine. Die Vorteile von *E.coli* liegen vor allem in seiner hohen Transformationseffizienz, seinem schnellen Wachstum und seiner oft hohen Expressionsrate von rekombinantem Protein bei geringem finanziellem Aufwand. Probleme ergeben sich oft bei der Expression eukaryotischer Proteine in *E.coli*, was teilweise auf fehlende oder abweichende

posttranslatorische Modifikationen zurückzuführen ist. Einige Lipasen aus Pilzen wurden erfolgreich in *E.coli* exprimiert [154], die Ausbeute an aktivem Enzym ist bei Expression eukaryotischer Proteine in Hefen jedoch meist höher [155-159].

Auch Gram - positive Bakterien der Gattungen *Streptomyces* oder *Bacillus* können als Wirte zur heterologen Proteinexpression dienen. Ein Problem stellt hierbei oft der hohe GC - Gehalt vieler dieser Organismen dar, welcher sich in ihrer Codonpräferenz widerspiegelt [160].

Eukaryotische Systeme

Neben der Verwendung von Zelllinien aus höheren Organismen wie Pflanzen, Säugetieren oder Insekten eignen sich vor allem auch ganze Organismen zur Produktion von Fremdprotein. Dabei nimmt vor allem die Proteinexpression in einzelligen Hefen einen großen Stellenwert ein. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist die am weitesten verbreitete und am besten untersuchte Vertreterin. Verschiedene Plasmidsysteme wurden zur Proteinproduktion entwickelt, so das episomale Hefepiasmid, welches in bis zu 40 Kopien in der Zelle vorliegen kann und das zentromere Hefepiasmid, welches ein chromosomales Zentromer besitzt, und somit nur in ein bis zwei Kopien in der Zelle vorliegt [161]. Andere Vektoren besitzen Regionen mit hoher Homologie zu Regionen des Hefegenoms, so dass sich die Vektoren durch *crossing over* Ereignisse ins Genom integrieren.

Die Fermentationsbedingungen von *S.cerevisiae* sind gut bekannt, sie bedarf keines Komplexmediums zum Wachstum und erlaubt posttranslatorische Modifikationen. Die erzielten Expressionsausbeuten sind jedoch meist eher niedrig.

In den letzten Jahren gewannen auch andere Hefespezies wie *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica* und *Pichia pastoris* an Bedeutung.

Die methylo troph e Hefe *Pichia pastoris* wurde erstmals als Produzent für Einzelzellprotein (*single cell protein*, SCP) in kontinuierlicher Hochzell dichtefermentation mit Methanol als C - Quelle eingesetzt. Die Philipps Petroleum Company (Bartlesville, Oklahoma, USA) erreichte so in den siebziger Jahren eine Ausbeute an Biotrockenmasse von > 130 g/l, die im Folgenden als billiges und proteinreiches Futtermittel eingesetzt werden sollte [162]. Während sich der SCP - Prozess nicht durchsetzen konnte, gehört *P.pastoris* heute zu den erfolgreichen biologischen Standardsystemen zur heterologen Expression rekombinanter Proteine. Die Beliebtheit dieser Hefe basiert auf mehreren Faktoren. Zum einen ist *P.pastoris* als einzelliger Organismus leicht zu manipulieren und auch in großem Maßstab zu produzieren, was einen entscheidenden Vorteil zum Einsatz von Insekten - oder Säugetierzellen als

Expressionssystem bedeutet. Andererseits verfügt *P.pastoris* als Eukaryot über die Fähigkeit zu posttranslatorischen Modifikationen. Viele Proteine, die in bakteriellen Systemen als inaktive *inclusion bodies* produziert wurden, konnten hier funktionell exprimiert werden. Auch im Vergleich zu anderen Hefen bietet *P.pastoris* Vorteile; so ist die Expressionsrate 10 - 100 fach höher als in *S.cerevisiae*, während die O - Glykosylierung weniger stark ausfällt [163]. Bis heute wurden über 200 Proteine heterolog in *P.pastoris* exprimiert [164, 165], so auch einige Lipasen wie die *Rhizopus oryzae* Lipase [156], *Geotrichum candidum* Lipase [155], *Candida rugosa* Lipase [157] und *Candida antarctica* Lipase B [159].

Als methylotrophe Hefe besitzt *P.pastoris* die Fähigkeit, Methanol als alleinige C - Quelle zu nutzen. Die Metabolisierung des Methanols beginnt mit dessen Oxidation zu Formaldehyd durch das Enzym Alkoholoxidase (AOX) in den Peroxisomen. Das dabei als Nebenprodukt entstehende Wasserstoffperoxid ist für den Organismus toxisch und wird daher direkt in Wasser und Sauerstoff umgesetzt. AOX besitzt nur eine sehr geringe Affinität zu Sauerstoff, was durch die Produktion des Enzyms in großen Mengen kompensiert wird. So kann der Anteil der AOX am gesamten in der Zelle vorhandenen löslichen Protein bis zu 30 % betragen [166]. In *P.pastoris* existieren zwei für AOX codierende Gene, AOX1 und AOX2. Der Großteil an produzierter Alkoholoxidase wird durch Transkription von AOX1 induziert, das unter Kontrolle des starken, stringent regulierten Methanol - induzierbaren AOX1-Promotors steht [167]. Auch für die heterologe Expression von Proteinen der AOX1 - Promotor verwendet. Durch Anwesenheit von Glycerin oder Glucose im Nährmedium wird der AOX1 - Promotor gehemmt (Katabolitrepression).

P.pastoris erlaubt sowohl eine intrazelluläre als auch eine sekretorische heterologe Expression. Da die Hefe selbst nur sehr geringe Mengen an eigenen Proteinen sekretiert und auch im Kultivierungsmedium nur geringe Proteinmengen vorhanden sind, stellt das sekretierte heterologe Protein die überwiegende Menge der Proteine im Medium dar, was die Proteinaufreinigung stark vereinfacht [168]. Die Sekretion erfolgt meist durch Fusionierung des Zielproteins mit dem α - Faktor aus *S.cerevisiae*. Während der Ausschleusung des Proteins wird diese Sekretionssignalsequenz an spezifischen Proteaseerkennungssequenzen abgespalten.

Tabelle 4.3 gibt eine Übersicht über die Vor - und Nachteile von einigen der heute verwendeten Expressionssysteme.

Tabelle 4.3: Eigenschaften verschiedener Expressionssysteme. Nach Minning, 1999 [169].

Eigenschaft	Gram-positive Bakterien	Gram-negative Bakterien (z.B. E.coli)	Hefe Saccharomyces cerevisiae	Hefe Pichia pastoris	Zellkulturen (Insekten + Säugerzellen)
Zellwachstum	schnell	schnell	mittel	mittel	langsam
Molekularbiologische Manipulation	teilweise problematisch (GC-Gehalt)	einfach + schnell	relativ langwierig	relativ langwierig	langwierig
Hochdurchsatz-Screening	möglich	möglich	schwierig	schwierig	sehr schwierig
Kultivierung im Schüttelkolben / Bioreaktor	möglich	möglich	möglich	möglich	teilweise
Minimalmedien	möglich	möglich	möglich	möglich	nicht möglich
Kosten der Medien	gering	gering	gering	gering	hoch
Expressionslevel	hoch	hoch	niedrig	hoch	niedrig
Sekretion ins Medium	möglich	Sekretion ins Periplasma	möglich	möglich	möglich
Proteinfaltung	Probleme bei eukaryotischen Proteinen	Probleme bei eukaryotischen Proteinen	in der Regel richtige Faltung	in der Regel richtige Faltung	richtige Faltung
korrekte Schwefelbrückenbildung	schwierig	schwierig, Verbesserung bei Periplasma- Sekretion	ja	ja	ja
N-Glycosylierung	nein	nein	ja	ja	ja
O-Glycosylierung	nein	nein	ja	ja, weniger komplex	ja
Phosphorylierung, Acetylierung	nein	nein	nein	nein	ja

4.6 Verwendete Lipasen

4.6.1 Lipase A aus *Archaeoglobus fulgidus*

Verschiedene Organismen haben sich auch an extremste Standorte der Erde angepasst. Diese extremophilen Organismen können aufgrund speziellen Zellaufbaus und Stoffwechsels an Standorten überleben, die für andere, mesophile Organismen absolut letal sind (hohe/tiefe Temperaturen, hoher Druck/Salzgehalt, extreme pH - Werte etc.). Aufgrund der Toleranz dieser Organismen bzw. ihrer Enzyme gegen extreme Umweltbedingungen besitzen diese ein großes Potential für biotechnologische Anwendungen. Tab. 4.4 gibt eine Übersicht über verschiedene Formen extremophilen Lebens und seine Anwendung in der Biotechnologie.

Tabelle 4.4: Industrielle Anwendung extremophiler Mikroorganismen und ihrer Enzyme. Nach Antranikian und Grote, 1997; Demirjian *et al.*, 2001; Hough und Danson, 1999; Schumacher *et al.*, 2001; Baumann, 2002 [38, 170-173].

Phänotyp	Lebensraum	Enzym	Anwendung (teilweise noch in Diskussion)
Thermophil	50 – 80°C	Xylanasen	Papierindustrie
		DNA - Polymerasen	PCR
		Proteasen	Waschmittel, Brauerei, Wolle
Hyperthermophil	85 – 113°C	Amylase + Pullulanase	Glucose/Fructose als Süßstoffe
Psychrophil	-2 – 20°C	Proteasen	Molkereiprodukte, Käsereifung
		Dehydrogenasen	Biosensoren
Acidophil	pH < 4	Schwefeloxidation	Kohle - Entschwefelung
Alkalophil	pH > 9	Cellulasen	Reinigungsmittel
Halophil	3 – 20 % Salz		Regenerierung von Ionenaustauschern
Piezophil	hoher Druck	ganze Zellen	Stärkegranulat
Metallophil	hoher Metallgehalt	ganze Zellen	Biomineralisation, Erzlaugung
Radiophil	hohe Strahlendosis	ganze Zellen	biologische Sanierung
Microaerophil	< 21 % O ₂		

Aufgrund ihrer oft hohen Stabilität und Aktivität auch bei stark erhöhten Temperaturen sind vor allem Lipasen aus thermophilen und hyperthermophilen Organismen von höchstem Interesse sowohl für die Erforschung der strukturellen Ursache dieser Stabilität als auch für

biotechnologische Anwendungen [174-176]. Eine Vielzahl von Lipasen und Carboxylesterasen aus thermophilen Organismen wurde bereits beschrieben und erfolgreich heterolog exprimiert, so die Lipasen 1 und 2 aus *Bacillus thermocatenulatus* [177-181], eine Lipase aus *Bacillus stearothermophilus* P1 [182-184], eine Lipase aus *Bacillus stearothermophilus* L1 [185, 186], eine Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* [187, 188], eine Esterase aus *Bacillus acidocaldarius* [189], die Lipase aus *Burkholderia cepacia* [190] und viele mehr. Einige dieser Enzyme zeigen gleichzeitig eine hohe Toleranz gegen azidische oder basische pH - Werte, gegen osmotischen Stress, organische Lösungsmittel oder Detergenzien [176]. So zeigt die thermostabile Lipase 2 aus *Bacillus thermocatenulatus* ein pH - Optimum bei pH 8 - 9; die Lipase ist jedoch auch bei höheren Werten bis pH 11 stabil [177]. Die Ursache der hohen Stabilität dieser Enzyme ist noch nicht vollständig geklärt. Durch einen erhöhten Schwefelbrücken - und Prolingehalt wird in vielen thermostabilen Enzymen eine reduzierte Flexibilität erreicht. Die Minimierung der Oberflächenenergie, erreicht durch Hydrierung apolarer Oberflächenreste und Einbettung hydrophober Reste, sowie eine kompakte Kernstruktur spielen ebenfalls in vielen dieser Enzyme eine wichtige Rolle [191]. Insgesamt besitzen thermostabile Enzyme meist eine größere Anzahl an Ionenbindungen als die entsprechenden mesostabilen Enzyme [189]. Neben diesen intrinsischen Faktoren spielen extrinsische Faktoren eine bedeutende Rolle. Dazu gehören die Stabilisierung durch Metabolite und Cofaktoren, aber auch die Anwesenheit spezifischer Chaperone [191]. Eine große Bedeutung kommt daneben auch den sogenannten kompatiblen Soluten zu, vielfältigen osmolytisch wirkenden Reagenzien. Diese Verbindungen sind im höchsten Maße organismenabhängig; bekannt sind unter anderem Trehalose, Prolin, Glycin - Betain und Hydroxyectoin [192-194]. Lamosa *et al.* beschrieben das kompatible Solut Diglycerolphosphat (DGP) in *Archaeoglobus fulgidus* [195].

Das sulfatreduzierende Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* zeigt Wachstum bei Temperaturen von 60 bis 95°C, seine optimale Wachstumstemperatur liegt bei 83°C [196]. Mehrere Enzyme wurden bereits aus *A. fulgidus* kloniert, heterolog exprimiert und charakterisiert. Dazu gehören zwei N5,N10-Methenyltetrahydromethanopterin Dehydrolasen [196, 197], eine 8-Oxyguanine DNA Glycosylase [198], das RadA Protein [199] und eine Carboxylesterase [1, 189, 200-203]. Alle diese Enzyme zeigen ein Aktivitätsoptimum bei Temperaturen zwischen 60 und 80°C.

1997 wurde das komplette Genom von *A. fulgidus* veröffentlicht; darunter befand sich auch ein offenes Leseraster von 1422 Nukleotiden, welches für eine putative Lipase (AF1763) von 474 Aminosäuren codiert ([204]; NCBI Zugangsnummer NP_070591).

4.6.2 Lipase B aus *Candida antarctica*

Die zu den *Ascomycota* zählende Hefe *Candida antarctica* besitzt 2 Lipasegene, die von Hoegh *et al.* kloniert und in *Aspergillus oryzae* exprimiert wurden [205]. Die entsprechenden Lipasen A und B wurden charakterisiert und von Novo Nordisk (jetzt Novozymes) patentiert. Obwohl Lipase A stabiler war als Lipase B, hat die letztere durch ihr spezifischeres Substratspektrum ein größeres Interesse für industrielle Anwendungen geweckt.

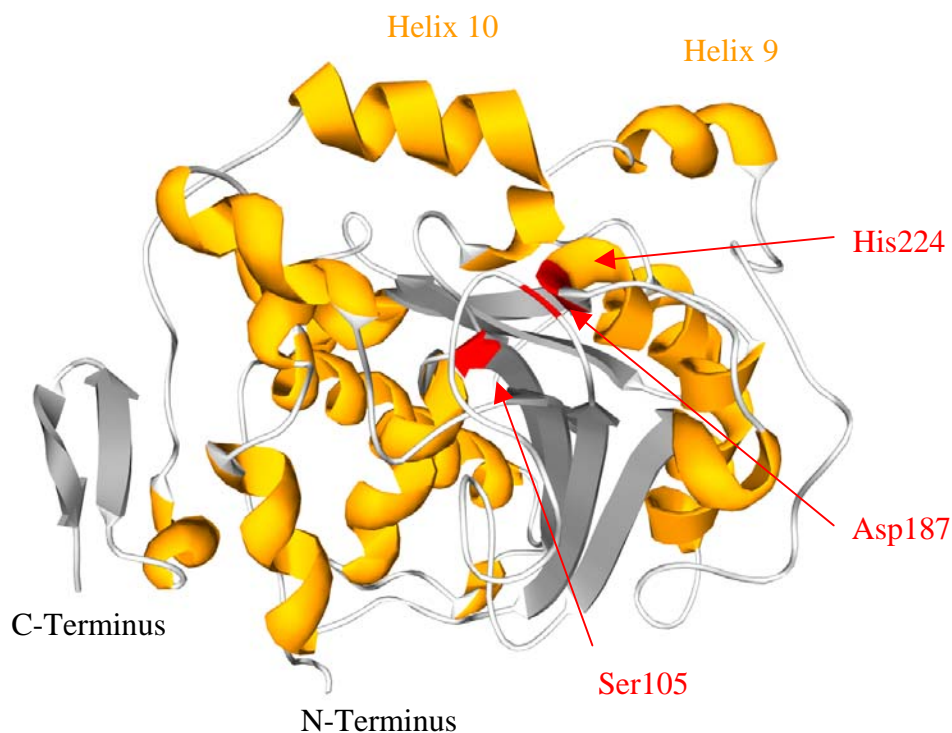


Abbildung 4.8: Struktur der *Candida antarctica* Lipase B.

Darstellung durch Swiss PDB-Viewer. α - helicale Strukturen sind orange, β - Stränge sind grau dargestellt. Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot hervorgehoben.

Candida antarctica Lipase B (CalB) besteht aus 317 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 33 kDa. Die kristallographische Strukturaufklärung von CalB offenbarte einige ungewöhnliche Charakteristika dieses Enzyms [206, 207]. CalB gehört wie alle Lipasen zu den Enzymen mit α/β - Hydrolasefaltung (s. 4.1.2). Der Enzymkern wird aus sieben parallelen β - Strängen gebildet, die von zehn α - Helices und zwei kleinen β -Strängen umgeben sind. Die katalytische Triade des aktiven Zentrums besteht aus den Aminosäuren Ser105, Asp187 und His224. Das *oxyanion hole* wird in CalB durch drei Wasserstoffbrücken

gebildet, einer von Gly106 und zweien von Thr40. CalB zeigt eine deutliche Abweichung von dem in anderen Lipasen konservierten Pentapeptid Gly/Ala – X – Ser – X - Gly. Durch die in CalB vorhandene Sequenz Thr – Trp – Ser – Gln - Gly ist die Schleife des *nucleophile elbow* weniger stark gebogen als bei anderen Lipasen [133]. Helices neun und zehn bilden in CalB ein großes Strukturelement, das direkt über der Substratbindetasche positioniert ist und den Raum zur Bindung des Substrats erheblich einengt. Auffällig ist, dass keine andere der bis heute aufgeklärten Lipasestrukturen ein vergleichbares Strukturelement aufweist [208]. Im Gegenzug fehlt CalB eine α - helicale „lid“ - Struktur, so dass hier keine Grenzflächenaktivierung stattfindet [21]. Abb. 4.8 zeigt eine Darstellung der 3 - dimensionalen Struktur der CalB.

CalB zeichnet sich durch eine hohe Enantioselektivität gegenüber sekundären Alkoholen aus und ist daher mittlerweile einer der industriell meistgenutzten Biokatalysatoren. Der Übersichtsartikel von Anderson *et al.* über die Anwendung von CalB in Biotransformationen gibt einen guten Überblick über dieses Themenfeld [209].

Die Enantioselektivität von CalB bei sekundären Alkoholen folgt weitgehend der von Kazlauskas aufgestellten Regel [32]. Für CalB konnte gezeigt werden, dass hohe Enantioselektivitäten ($E > 100$) und hohe Umsatzraten dann erreicht wurden, wenn ein Substituent am Stereozentrum eine Kettenlänge $< C_3H_7$ zeigte und nicht halogeniert war. Der zweite Substituent musste größer als C_2H_5 sein oder halogeniert [47]. So zeigte CalB gegenüber 2-Butanol einen E - Wert von 8 [210], für das halogenierte 1-Bromo-2-propanol wurden E - Werte von 370 erreicht [211].

Wie andere Lipasen zeigt auch CalB eine stark von den Reaktionsbedingungen abhängige Enantioselektivität. So kommt bei einer Umesterungsreaktion der Wahl des Acyldonors eine entscheidende Bedeutung zu. Bei der Umesterung von (*R/S*)-2-Phenylbuttersäureestern in 1-Hexanol durch CalB wurden deutlich bessere Ergebnisse mit Vinylestern ($E > 100$) als mit Ethylestern ($E = 6,5$) erreicht [45]. Auch hohe Temperaturen scheinen die Enantioselektivität von CalB negativ zu beeinflussen. So wurden für das Substrat Seudenol bei $4^\circ C$ E - Werte von 84 ± 4 gemessen; bei $23^\circ C$ wurden nur E - Werte von 67 ± 3 gemessen [47]. Auch die Enzympräparation, mögliche Immobilisierung und die Konzentration an eingesetztem Substrat hat einen teilweise hohen Einfluss auf die Enantioselektivität von CalB [47].

Die Erklärung der außergewöhnlichen Stereoselektivität von CalB gegenüber sekundären Alkoholen steht schon lange im Brennpunkt des Interesses verschiedener Forschungsgruppen. Vor allem die Gruppe um Karl Hult in Stockholm konnte mit mehreren Arbeiten zur *in silico*

Modellierung von CalB zum Verständnis dieser ungewöhnlichen Lipase beitragen [47, 133, 153, 211-215]. Durch die detaillierte Aufklärung der Vorgänge während einer enantiospezifischen Umsetzung durch CalB konnten Mutanten generiert werden, die einerseits die *in silico* Erkenntnisse verifizieren und andererseits die Resolution bisher schlecht trennbarer Enantiomere verbessern sollten. Die Aminosäurereste Thr40, Thr42, Ser47 und Trp104 definieren demnach die Stereoselektivitätstasche von CalB. Durch Mutation von Ser47 konnte bei der Umsetzung von 1-Bromo-2-octanol bzw. 1-Chloro-2-octanol die Enantioselektivität verdoppelt werden. Während die Kombination von Ser47Ala mit Thr42Val noch eine erhöhte Selektivität gegen 1-Chloro-2-octanol zeigte ($E = 20$ statt $E = 14$ beim Wildtyp) brachten die Mutanten Thr42Val und Trp104His eine Verschlechterung der Stereoselektivität. Auch die von Patkar *et al.* generierten Mutanten Thr103Gly und Met72Leu konnten die Selektivität der Lipase nicht verbessern [100]. Zusätzlich zeigten sämtliche Mutanten erhebliche Einbußen des Umsatzes [47, 153]. Andere Gruppen generierten CalB - Mutanten durch Methoden der gerichteten Evolution. Die Mutanten, die teilweise stark erhöhte Aktivität und Thermostabilität zeigten, wurden dabei jedoch nicht auf ihre Enantioselektivität gegenüber den verwendeten Substraten untersucht [84, 99].

CalB wurde erstmals aktiv in *Aspergillus oryzae* heterolog exprimiert. [205]. Rotticci-Mulder *et al.* etablierten die Expression von CalB in *Pichia pastoris* [159]. Suen *et al.* verglichen darauf die Expressionsraten von CalB in *Aspergillus niger*, *S.cerevisiae*, *Pichia methanolica* und *P.pastoris*. Dabei stellte sich heraus, dass das verwendete *P.pastoris* Expressionssystem etwa viermal so effektiv war wie die anderen Systeme [216]. Eine funktionelle Expression von CalB in *E.coli* konnte bis heute nicht etabliert werden, so dass von CalB abgeleitete Genbanken in *S.cerevisiae* gescreent wurden [84, 99, 153].

4.6.3 Lipase B aus *Pseudozyma tsukubaensis*

Pseudozyma tsukubaensis (Taxonomische Identifikationsnummer 5483), der auch unter den Synonymen *Cryptococcus tsukubaensis*, *Vanrija tsukubaensis* oder *Candida tsukubaensis* bekannt ist, gehört zur Gattung der *Basidiomycota* und ist somit nur weitläufig mit *Candida antarctica* verwandt. Ishii *et al.* patentierten 1993 die Isolation der thermostabilen Lipase B aus *P.tsukubaensis* ATCC 24555, welche mit dem gleichen monospezifischen Kaninchenantiserum präzipitiert werden konnte wie CalB aus *Candida antarctica* ATCC 32657 [217]. Suen *et al.* gelang es 2004, die Lipase B aus *P.tsukubaensis* zu klonieren und in *S.cerivisiae* heterolog zu exprimieren [99]. Die Lipase zeigte eine Sequenzidentität zu CalB

von 68,9 % auf DNA - und 77,7 % auf Proteinebene. Während die Aktivität der Lipase gegen Tributyrin nur 13 % der Aktivität von CalB entsprach, zeigte *P.tsukubaensis* Lipase B eine deutlich erhöhte Thermostabilität.

4.6.4 Lipase 1 aus *Moraxella* sp. TA144

Der Stamm *Moraxella* sp. TA144 wurde aus antarktischem Meerwasser isoliert und zeigte lipolytische Aktivität auch bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt [218]. Feller *et al.* klonierten 1991 drei Fragmente aus einem *Sau3AI*-Verdau genomischer DNA dieses Organismus, alle Konstrukte zeigten lipolytische Aktivität [219]. Die drei Lipasegene wurden kloniert und sequenziert. Die in *E.coli* exprimierten Lipasen zeigten wie die nativen Enzyme lipolytische Aktivität bei niederen Temperaturen [220-222]. Lipase 1 aus *Moraxella* sp. TA144 (NCBI Zugangsnummer X53053) bildet mit drei *Streptomyces* Lipasen [223] und einer PBS(A)-Depolymerase aus *Acidovorax delafieldii* eine eigene Superfamilie innerhalb der GX-Klasse der Lipasen (LED, [16]).

Es wurden bereits mehrere Lipasen aus psychrotrophen Stämmen isoliert, so eine Lipase aus *Acinetobacter* 016 [224], aus *Psychrobacter immobilis* B10 [225, 226], aus *Pseudomonas* sp. B11-1 [227] sowie aus *Pseudomonas* sp. KB700A [228]. Alle beschriebenen Lipasen zeigen maximale Aktivitäten bei Temperaturen zwischen 30 und 45°C, bei höheren Temperaturen setzt eine irreversible Denaturierung ein. Alle diese Lipasen zeigen zudem Aktivität nahe dem Gefrierpunkt. Mayordomo *et al.* beschrieben eine Kälte - adaptierte Lipase aus dem mesophilen Pilz *Aspergillus nidulans* [229].

Der Mechanismus der Adaptation an niedere Temperaturen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es scheint, dass vor allem eine Abschwächung der intramolekularen Interaktionen und verstärkte Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel zu einer flexibleren Struktur führen, die die enzymatische Katalyse bei sehr niedrigen Temperaturen erlaubt [230].

4.7 Zielsetzung

Glykolether und ihre Derivate sind eine bedeutende Klasse von Lösungsmitteln, die in unterschiedlichsten Bereichen Verwendung finden. In den letzten Jahren stieg das Interesse an enantiomerenreinen Glykolethern erheblich. Da die chemische Trennung dieser Enantiomere teuer und zeitaufwendig ist, richtet sich das Interesse zunehmend auf die enzymatische Enantiomerentrennung.

Diese Arbeit entstand als Kooperation mit DOW Chemical, einer Firma, die marktführend auf dem Gebiet der Glykolether ist. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen geeigneten Biokatalysator für die Enantiomerentrennung des Modellsubstrats 1-Methoxy-2-Propanol (MP) bzw. seines Esters 1-Methoxy-2-Propanolacetat (MPA) bereitzustellen. Dabei richtete sich das Hauptaugenmerk auf die Evaluierung verschiedener Strategien zur Identifizierung bzw. Optimierung des Biokatalysators. Hierbei sollten sowohl Methoden der *de novo* Klonierung und der biochemischen Charakterisierung neuer Enzyme, als auch der gerichteten Evolution und des rationalen Proteindesigns bereits bekannter Biokatalysatoren angewandt werden. Das so erhaltene Enzym sollte das Potenzial zum Einsatz in der chemischen Industrie haben, was hohe Anforderungen sowohl an Enantioselektivität wie auch an die Prozessstabilität eines Biokatalysators stellt.

Es war bekannt, dass die Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) eine hohe Enantioselektivität vor allem bei der Hydrolyse von MPA zeigte. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war daher die Abschätzung der Nutzbarkeit und Verfügbarkeit von CalB für die Enantiomerentrennung von MP / MPA. Die industrielle Anwendung von CalB ist durch die Patentierung dieses Enzyms durch Novozymes beschränkt. In dieser Arbeit sollte daher zusätzlich eine Evaluierung der Möglichkeit zum Ersatz dieses Biokatalysators durch ein anderes Enzym mit vergleichbaren Eigenschaften erfolgen.

5 Ergebnisse

5.1 Screening vorhandener Enzyme

Ziel dieser Arbeit war die Detektion, Expression, Charakterisierung, Aufreinigung und prozesstechnische Evaluierung eines Biokatalysators mit Hilfe biochemischer und molekularbiologischer Methoden, welcher eine hohe Aktivität und vor allem Enantioselektivität bei der Enantiomertrennung von 1-Methoxy-2-Propanolacetat (MPA) aufweist. Da beide Enantiomere industriell bedeutsam und kommerzialisierbar sind, war es unerheblich, welches Enantiomer von einem solchen Enzym bevorzugt werden würde. Dafür wurden zunächst einige rekombinant und kommerziell zugängliche Lipasen und Esterasen auf ihre Hydrolyseeigenschaften von MPA mit Hilfe der pH - Stat Methode untersucht (Tab. 5.1).

Tabelle 5.1: Aktivität rekombinanter Lipasen und Esterasen gegenüber Tributyrin und MPA. Die Messungen erfolgten am pH - Stat. 1 U ist definiert als Umsatz von 1 μ Mol Substrat pro Minute.

Enzym	Quelle	Aktivität Tributyrin [U/mg]	Aktivität MPA [U/mg]
<i>Bacillus subtilis</i> pNB Esterase Wt	rekombinant, gereinigt	44,7	14,0
<i>Bacillus subtilis</i> pNB Esterase G105A	rekombinant, gereinigt	7,4	1,4
<i>Bacillus subtilis</i> Esterase	rekombinant, gereinigt	1,0	0,2
<i>Bacillus stearothermophilus</i> Esterase	rekombinant, gereinigt	3,6	1,1
<i>Bacillus thermocatenulatus</i> Lipase	rekombinant, gereinigt	0	0
<i>Burkholderia cepacia</i> Lipase	Chirazyme L1-lyo, Roche	467,5	1,7
<i>Candida antarctica</i> Lipase A	Chirazyme L5-lyo, Roche	75,4	0,2
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	Chirazyme L2-lyo, Roche	261,2	19,8
<i>Candida rugosa</i> Lipase	rekombinant, gereinigt	2,4	0,4
<i>Candida rugosa</i> Lipase	Chirazyme L3-lyo, Roche	11,5	0,3
<i>Geotrichum candidum</i> Lipase	rekombinant, Zellrohextrakt	0,7	2,2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase	rekombinant, gereinigt	4,5	0,4
<i>Rhizopus javanicus</i> Lipase	Lipase F-AP15, Amano	37,6	0
Schweineleberesterase	Chirazyme E1-lyo, Roche	6,5	6,9

Enzyme mit Aktivität gegen MPA wurden im Folgenden auf ihre Enantioselektivität bei der Hydrolyse von MPA untersucht. Dabei wurde sowohl die Enantioselektivität (E - Wert), als auch der Enantiomerenüberschuss (*ee*) von *R*-MP bestimmt. Nur fünf der Enzyme zeigten eine Enantioselektivität bei der Hydrolyse von MPA. Die Ergebnisse sind in Tab. 5.2 aufgeführt.

Tabelle 5.2: Enantioselektivität verschiedener rekombinanter Lipasen und Esterasen gegenüber MPA in der Hydrolyse. Die Messungen erfolgten am GC, wie im Methodenteil beschrieben.

Enzym	<i>ee</i> (<i>R</i> -MP)	E- Wert
<i>Bacillus subtilis</i> Esterase (rekombinant)	25%	1,7
<i>Bacillus subtilis</i> pnb Esterase (rekombinant)	36%	2,1
<i>Bacillus stearothermophilus</i> Esterase (rekombinant)	24%	1,6
<i>Burkholderia cepacia</i> Lipase (Chirazyme L1-lyo, Roche)	80%	6,6
<i>Candida antarctica</i> Lipase B (Chirazyme L2-lyo, Roche)	99%	>100

CalB zeigte eine sehr hohe Enantioselektivität in der Hydrolysereaktion mit $E > 100$. Keines der getesteten Enzyme erreicht die Spezifität von CalB; selbst die Lipase aus *Burkholderia cepacia*, das Enzym mit dem nach CalB höchsten gemessenen E - Wert ($E = 6,6$) ist im Vergleich zu CalB nur schwach aktiv und selektiv. Aufgrund der geringen E - Werte erschien es nicht sinnvoll, mit den oben genannten Enzymen, mit Ausnahme von CalB, weiterzuarbeiten.

5.2 Expression, Aufreinigung und Charakterisierung einer

Lipase aus *Archaeoglobus fulgidus*

Aufgrund ihrer oft hohen Prozessstabilität sind Hydrolasen aus thermophilen Organismen interessant für biotechnologische Anwendungen [174-176].

Manco *et al.* klonierten und charakterisierten eine Esterase des hyperthermophilen sulfatreduzierenden Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* [1]. Aufgrund der im Sinne der Fragestellung interessanten Eigenschaften dieses Enzyms sollte ein weiteres Enzym aus diesem Organismus charakterisiert werden.

Das Gen der Lipase A aus *Archaeoglobus fulgidus* war bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit kloniert worden und lag in dem Expressionsvektor pCYTEX-P1 vor [178, 231, 232]. Das Lipasegen, welches C - terminal mit einem His - Tag fusioniert war, befand sich hier unter Kontrolle des hitzeinduzierbaren λ P_{RL} Promotors. Zusätzlich enthielt der Vektor das Ampizillinresistenz vermittelnde *bla* - Gen zur Selektion.

5.2.1 Homologiesuche

Der offene Leserahmen AF1763 im Genom von *A. fulgidus*, der als putative Lipase (*lipA*) annotiert wurde [204], hat eine Länge von 1425 bp (NCBI Zugangsnummer NP_070591). Ein Datenbankvergleich mit der EMBL - Sequenzdatenbank ergab, dass LipA nur sehr geringe Sequenzsimilarität auf Aminosäureebene zu anderen bekannten Lipasen aufweist. Das Enzym, welches nach einer Blast - Suche die höchste Ähnlichkeit zu LipA aufwies, war eine Lipase von *Bacillus* sp. B26 (EMBL Zugangsnummer AAL36938). Beide Enzyme zeigten jedoch nicht mehr als 28 % Sequenzidentität innerhalb der überlappenden Region von 215 Aminosäuren. Eine Blast - Suche innerhalb der *Lipase engineering database* (LED) [2, 16, 233] bestätigte diese Ergebnisse, in der die Mitglieder der Superfamilie der *Bacillus* - Lipasen die größte Similarität zu LipA aufwiesen. Auch hier zeigte die Lipase aus *Bacillus* sp. B26 die höchste Sequenzidentität zu LipA. Abb. 5.1 zeigt ein multiples Sequenzalignment von LipA und mehreren *Bacillus* - Lipasen mit Sequenzidentitäten zu LipA. Bei einer Blast - Suche innerhalb der TIGR - Genomsequenzdatenbank konnte keinerlei Ähnlichkeit zu bekannten Lipasen oder Esterasen aus anderen thermophilen Organismen detektiert werden.

Im Vergleich zu anderen bekannten Lipasen zeigte LipA mit 474 Aminosäuren eine ungewöhnliche Größe. Lipasen bestehen typischerweise aus 200 - 350 oder mehr als 550 Aminosäuren. Zu den wenigen Beispielen für Lipasen einer ähnlichen Größe gehören die putativen Lipasen aus *Deinococcus radiodurans*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Arabidopsis thaliana* [16]. In Abb 5.1 fällt auf, dass LipA im C - terminalen Proteinabschnitt (AS 300 – AS 474) keine Übereinstimmung mit den *Bacillus* - Lipasen aufweist. Eine BLAST - Suche des C - terminalen Abschnitts ergab keine signifikante Ähnlichkeit zu einem in den Datenbanken erfassten Protein. Eine Analyse der Sekundärstruktur zeigte, dass je nach verwendetem Programm zur Vorhersage der Sekundärstruktur 20 - 33 % aller Reste in α - Helices und 22 - 31 % in β - Strängen organisiert waren (Abb. 5.1). Die Aminosäurezusammensetzung zeigte einen geringen Prozentsatz an geladenen Resten (~ 2 %) und einen hohen Anteil an hydrophilen Resten (~ 2 %) im Verhältnis zu der ebenfalls aus *A.fulgidus* isolierten Carboxylesterase AF1716 [1].

5.2.2 Expression von LipA in *Escherichia coli*

Die Expression von LipA im Schüttelkolbenmaßstab während der 4 Stunden dauernden Induktion wurde mittels Coomassie - gefärbter SDS-PAGE verfolgt (Abb. 5.2). Bereits 70 Minuten nach Induktion durch Temperaturerhöhung auf 42°C war eine deutliche Expression der Lipase im erwarteten Bereich von 52,8 kD sichtbar.

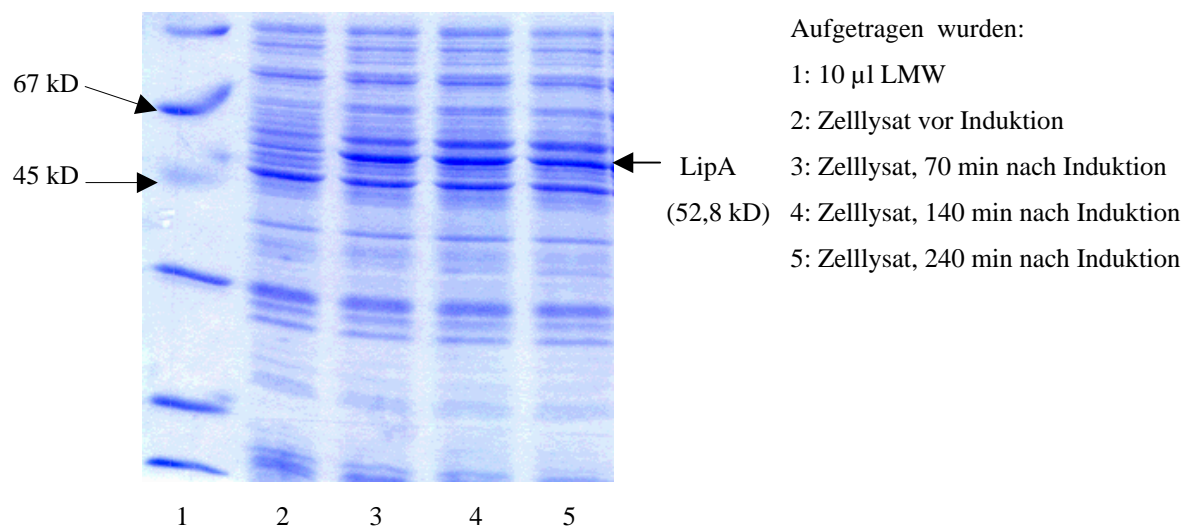


Abbildung 5.2: Coomassie - gefärbte SDS-PAGE der Expression von LipA.

5.2.3 Aufreinigung von LipA mittels Ammoniumsulfatfällung und Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung von LipA wurde eine zweistufige Strategie verfolgt. In einem ersten Schritt wurde eine stufenweise Ammoniumsulfatfällung mit dem durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossenen Zellrohextrakt durchgeführt. LipA fiel bei einem Sättigungsgrad von 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aus. Die Lipase wurde mit Hilfe ihres C - terminalen His-Tags durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) zur Homogenität aufgereinigt (Abb. 5.3). Als Matrix diente hierbei Ni-NTA (QIAGEN, Hilden), welches mit NiCl_2 abgesättigt war. Die Elution der an die Matrix gebundenen Lipase erfolgte mit 100 mM Imidazol. Die Ausbeute und Effizienz der Aufreinigung ist in Tab. 5.3 dargestellt.

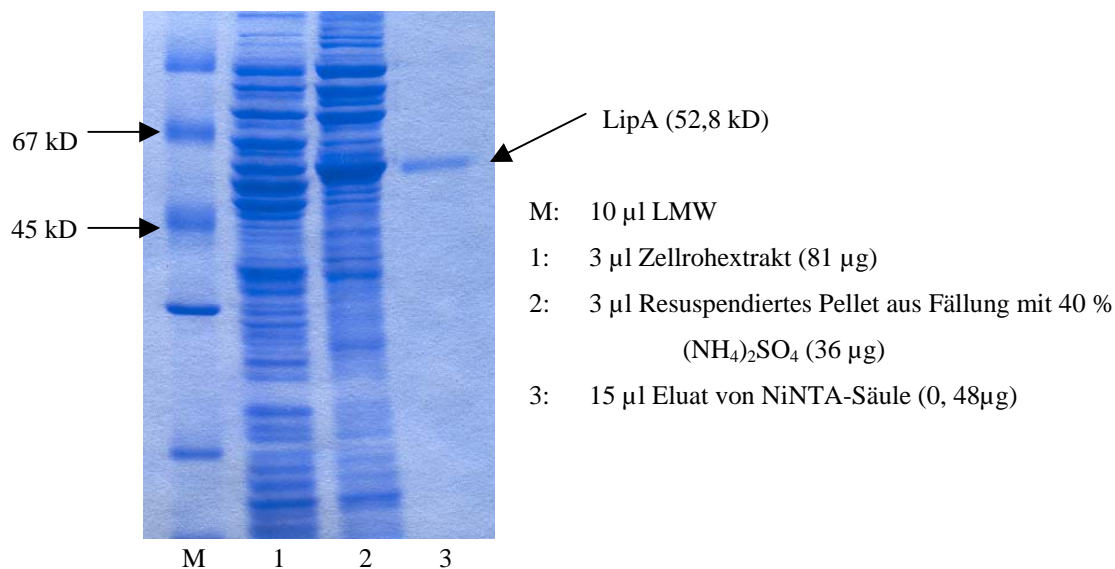


Abbildung 5.3: Coomassie - gefärbte SDS-PAGE der 2-stufigen Aufreinigung von LipA.

Tabelle 5.3: Ausbeute der 2-stufigen Aufreinigung von LipA. 1 U ist definiert als Umsatz von 1 μMol Substrat pro Minute.

	Gesamtprotein- ausbeute [mg]	Spezifische Aktivität [U / mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Zellrohextrakt	270	32	100	1
Pellet 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12	95	13,1	3
Eluat von NiNTA-Säule	0,192	10156	22,3	317

Die spezifische Aktivität betrug nach Aufreinigung 10156 U/mg (gegen 32 U/mg im Zellrohextrakt) bei der Hydrolyse von Tributyrin, was einem Reinigungsfaktor von 317 entsprach. Die Ausbeute an aktivem Protein betrug 22,3 %. Die Gesamtproteinausbeute nach der Aufreinigung betrug 192 µg.

5.2.4 Charakterisierung von LipA

5.2.4.1 Identifizierung der katalytisch aktiven Aminosäurereste

Durch den Sequenzvergleich von LipA und den *Bacillus* - Lipasen (Abb. 5.1) konnten möglicherweise an der katalytischen Triade von LipA beteiligte Aminosäurereste identifiziert werden. Hierbei stellten sich die Aminosäurereste Ser136 und His210 durch ihre direkte Überlagerung mit den korrespondierenden Resten der *Bacillus* - Lipasen als wahrscheinliche Mitglieder der katalytischen Triade von LipA heraus. Die möglichen Protonenakzeptoren D163 und D169 konnten nicht mit den korrespondierenden Resten der *Bacillus* - Lipasen überlagert werden. Mittels Punktmutagenese wurden die genannten Positionen verändert (S136C, D163N, D169N und H210N), um anhand der Funktionalität der resultierenden Mutanten auf die Funktion der Reste im Wt - Enzym zu schließen. Zusätzlich wurde eine durch Einfügen eines Stopcodons verkürzte Mutante Y244stop generiert. Zellrohextrakte der Mutanten S136C, D163N und H210N zeigten einen fast vollständigen Aktivitätsverlust, während D169N eine Restaktivität von 55 % aufwies (Abb. 5.4). Mutante Y244stop zeigte eine Restaktivität von 12,2 %.

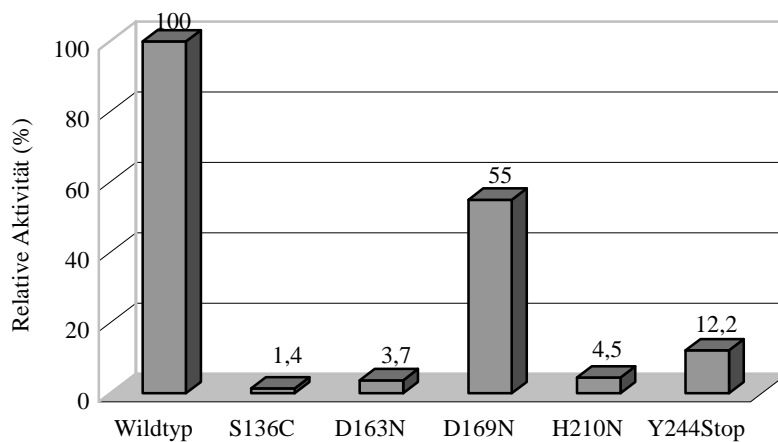


Abbildung 5.4: Relative Aktivitäten der LipA Mutanten.

Die Messungen erfolgten mit dem Substrat Tributyrin am pH-stat.

5.2.4.2 Aktivität und Stabilität in Abhängigkeit von pH und Temperatur

Das Temperaturprofil der aufgereinigten LipA ist in Abb. 5.5 dargestellt. Sämtliche temperaturabhängigen Messungen wurden bei pH 10 durchgeführt. Die höchste Aktivität wurde bei 70°C gemessen. Sowohl bei geringeren (40°C) als auch bei höheren Temperaturen (95°C) konnte noch über 40 % der Aktivität detektiert werden.

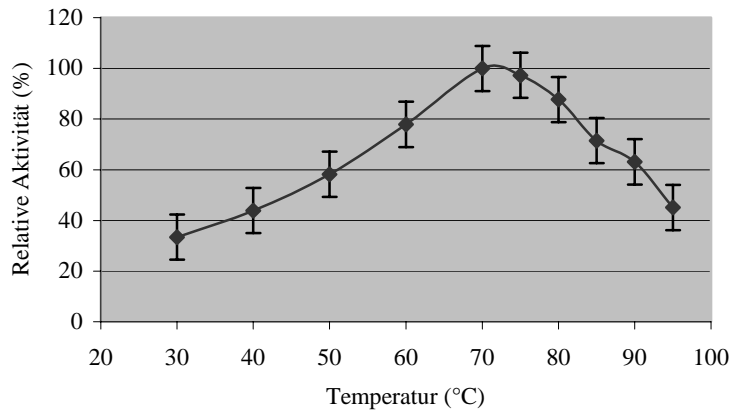


Abbildung 5.5: Relative Aktivität von LipA bei verschiedenen Temperaturen.

Die Messungen erfolgten bei pH 10.0 am Spektrophotometer mit pNPP als Substrat.

Die Messungen der Langzeitstabilität ergaben, dass LipA nach 30 Minuten Inkubation bei 80°C fast alle Aktivität verloren hatte (Abb. 5.6). Auch bei tieferen Temperaturen (60 bzw. 40°C) ging innerhalb der ersten 30 Minuten 60 % der Aktivität verloren. Nach 3 Stunden konnte bei keinem der Ansätze mehr Aktivität nachgewiesen werden.

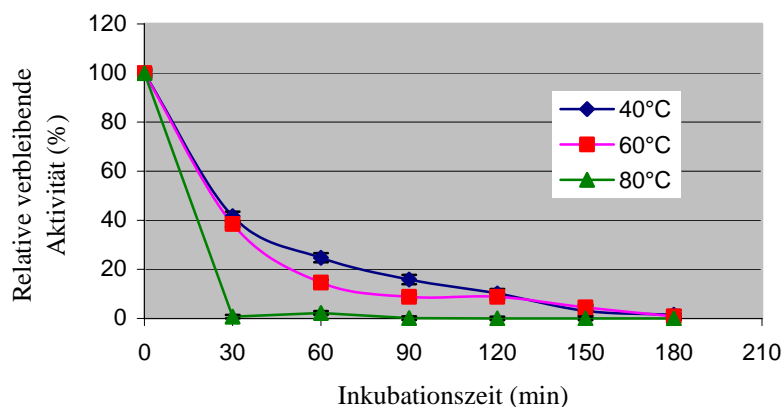


Abbildung 5.6: Relative verbleibende Aktivität der LipA nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen.

Die Messungen erfolgten bei pH 10.0 am Spektrophotometer mit pNPP als Substrat.

Da das Enzym bei hohen Temperaturen zu schnell an Aktivität verlor, wurden die Messungen zur Identifizierung des pH - Optimums und der pH - abhängigen Aktivität nicht im Bereich des Temperaturoptimums (70°C) sondern bei Raumtemperatur und bei 50°C gemessen.

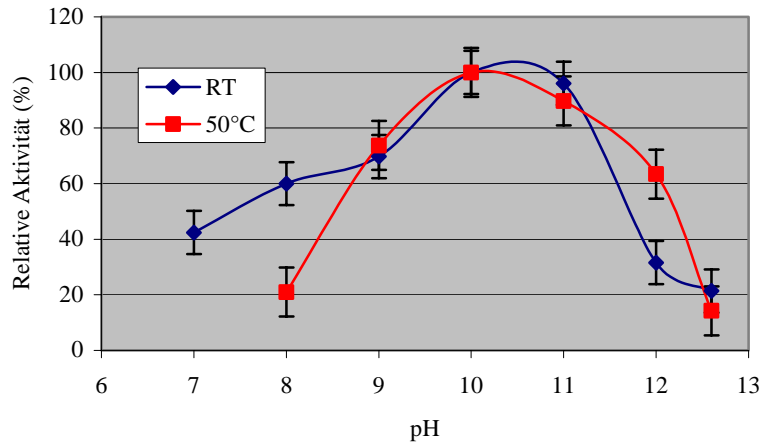


Abbildung 5.7: Relative Aktivität von LipA bei unterschiedlichem pH.

Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (RT) bzw bei 50°C am Spektrophotometer mit pNPP als Substrat.

LipA zeigte hohe Aktivität im alkalischen Bereich. Die maximale Aktivität wurde bei pH 10 beobachtet (Abb. 5.7). Bei Inkubation von LipA bei neutralem und leicht alkalischem pH verlor LipA sehr schnell an Aktivität, so dass nach 4 Stunden nur noch 7 % der Anfangsaktivität nachweisbar war (Abb. 5.8). Nach 8 Stunden Inkubation bei pH 8 war keine hydrolytische Aktivität mehr messbar. Auch durch Inkubation bei pH 12 verlor LipA zunächst stark an Aktivität. Bei weiterer Inkubation fiel die Funktionalität jedoch nicht weiter ab, so dass nach 8 Stunden Inkubation etwa 20 % Restaktivität detektierbar waren. Der Aktivitätsanstieg nach 16 Stunden Inkubation war wohl auf Messfehler zurückzuführen.

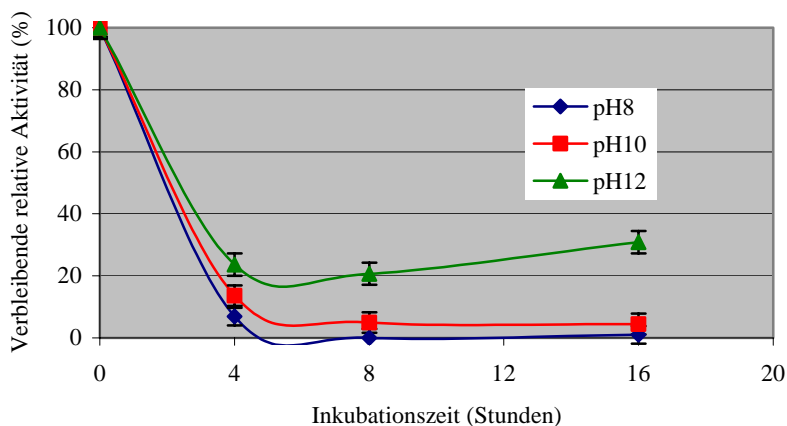


Abbildung 5.8: Relative verbleibende Aktivität von LipA nach Inkubation bei unterschiedlichem pH.

Die Inkubation erfolgte bei RT, die Messungen bei 50°C am Spektrophotometer mit pNPP als Substrat.

5.2.4.3 Substratspektrum

Die Ergebnisse der Substrat-abhängigen Aktivitätsmessungen sind in Tab. 5.4 dargestellt.

Tabelle 5.4: Substratspektrum von LipA. Für die Messungen am pH-Stat wurden jeweils 100 µl Zellrohextrakt bzw. 5 µl aufgereinigtes Enzym eingesetzt; n.e.: nicht ermittelt; *der Umsatz der Substrate pNPA und pNPP wurde photometrisch ermittelt und aufgrund der abweichenden Messmethode bei Berechnung der relativen Aktivitäten nicht berücksichtigt. 1 U ist definiert als Umsatz von 1 µMol Substrat pro Minute.

Substrat	Aufgereinigtes Enzym [U]	Aufgereinigtes Enzym, Relative Aktivität [%]	Zellrohextrakt [U]	Zellrohextrakt, Relative Aktivität [%]
Tributyrin	0,031	33,0	0,050	26,0
Tricaprylin	n.e.	n.e.	0,000	0
Olivenöl	n.e.	n.e.	0,042	21,9
Methylacetat	0,015	16,0	0,055	28,6
Methylpropionat	0,082	87,2	0,127	66,1
Methylbutyrat	0,094	100	0,192	100
Methylcaproat	0,056	59,6	0,080	41,7
Methylmyristat	0,000	0	0,070	36,5
Methyloleat	n.e.	n.e.	0,000	0
Ethylpropionat	0,034	36,2	0,069	35,9
Ethylbutyrat	0,042	44,7	0,030	15,6
Ethyldecanoat	0,000	0	0,025	13,0
Propylbutyrat	n.e.	n.e.	0,000	0
Butylacetat	0,058	61,7	0,075	39,1
Phenylacetat	0,014	14,9	0,033	17,2
Essigsäure –2-phenylethylacetat	n.e.	n.e.	0,000	0
Methyl-(R)-3-hydroxybutyrat	n.e.	n.e.	0,000	0
Ethyl-3-hydroxybutyrat	n.e.	n.e.	0,000	0
MPA	n.e.	n.e.	0,000	0
pNPA *	2,441	n.e.	n.e.	n.e.
pNPP*	0,943	n.e.	n.e.	n.e.

LipA setzte bevorzugt Ester kurzkettiger Fettsäuren (C2 - C4) und vor allem Fettsäuren mittlerer Kettenlänge (C5 - C8) mit kurzkettigen Alkoholen um. Methylester wurden schneller als die korrespondierenden Ethylester hydrolysiert, wobei C₄H₉ die bevorzugte Kettenlänge darstellte. Ester hydroxylierter Fettsäuren wie 3-Hydroxybutyrat wurden nicht umgesetzt. Methylmyristat und Ethyldecanoat wurden von Zellrohextrakt hydrolysiert, während die gleiche Reaktion von aufgereinigter LipA nicht katalysiert wurde. Tributyrin wurde im Gegensatz zu Glycerinestern mit längerkettigen Fettsäureresten als Substrat akzeptiert. Darüber hinaus wurde p-Nitrophenylacetat doppelt so schnell umgesetzt wie das korrespondierende Palmitat, was ebenfalls auf die Präferenz des Enzyms für kurzkettige Ester hinweist.

5.2.4.4 Kinetik

Die kinetischen Konstanten k_M , V_{Max} und k_{kat} wurden durch Messung der spezifischen Aktivitäten von LipA bei verschiedenen Substratkonzentrationen und deren Darstellung auf einem Lineweaver - Burk Diagramm ermittelt. Es wurde wiederum pNPP bei einer Assaytemperatur von 50°C und einem pH von 10,0 eingesetzt.

Tabelle 5.5: Kinetische Konstanten von LipA.

k_M	552 μM
V_{Max}	78,125 U/mg
k_{cat}	18,08 $\text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
k_{cat}/k_M	0,033 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

5.3 Klonierung und Expression der Lipase B aus *Candida antarctica* und der Lipase B aus *Pseudozyma tsukubaensis*, Fermentation und Mutagenese der *Candida antarctica* Lipase B

Die Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) zeigte die mit Abstand höchste Enantioselektivität gegenüber dem Modellsubstrat 1-Methoxy-2-Propanolacetat (MPA). Um CalB für Mutageneseexperimente nutzen zu können, sollte zunächst das codierende Gen durch Klonierung zugänglich gemacht werden. Als geeignetes Expressionssystem wurde *P.pastoris* gewählt. Die funktionelle Expression von CalB sollte sowohl im Schüttelkolbenmaßstab als auch im Fermentationsmaßstab etabliert werden.

Die Lipase B aus *Pseudozyma tsukubaensis* weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu CalB auf [99]. Nach Klonierung des korrespondierenden Gens und Expression der Lipase in *P.pastoris* sollte untersucht werden, ob auch die katalytischen Eigenschaften beider Enzyme Ähnlichkeiten aufweisen.

5.3.1 Klonierung der Gene für *Candida antarctica* Lipase B und *Pseudozyma tsukubaensis* Lipase B in pPICZ α A

Genomische DNA aus *Candida antarctica* und *Pseudozyma tsukubaensis* wurde nach der Standardmethode isoliert und aufgereinigt. Die DNA - Sequenz des Lipasegens aus *C.antarctica* war bekannt [207]. *CalB* konnte mit den spezifischen Primern CalB_*EcoRI_fw* und CalB_*NotI_rev* aus der genomischen DNA amplifiziert werden. Abb. 5.9 zeigt ein Agarosegel mit den amplifizierten PCR - Produkten aus Ansätzen mit DyNAzyme EXT™ DNA-Polymerase bzw. *Taq* DNA-Polymerase. Zur Klonierung wurde das Produkt der DyNAzyme EXT™ DNA-Polymerase verwendet, welche Korrekturlesefunktion besitzt.

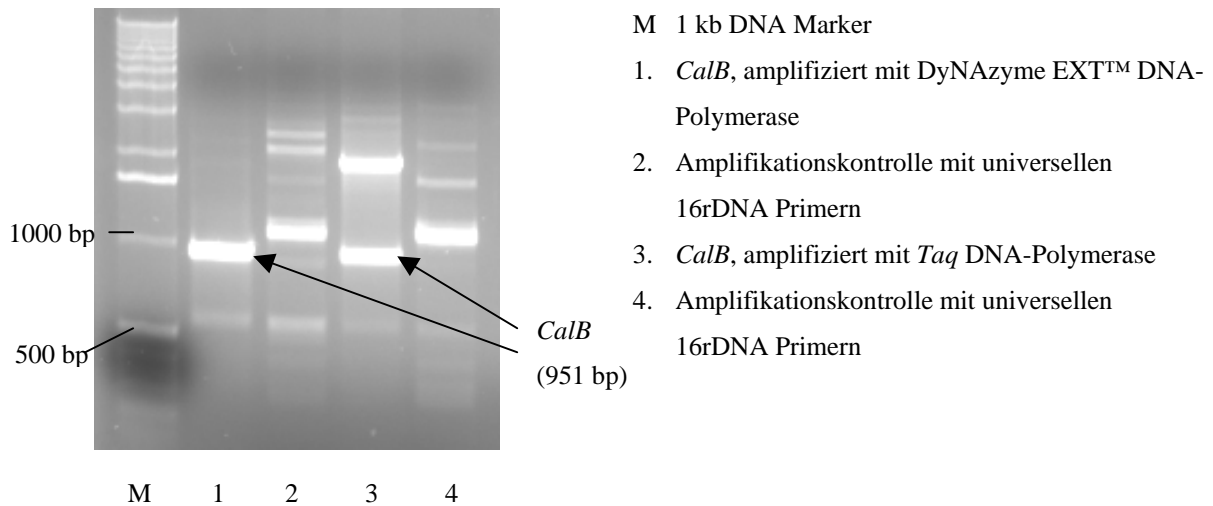


Abbildung 5.9: Ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel des amplifizierten *CalB* Gens und Amplifikationspositivkontrollen.

Suen *et al.* veröffentlichten 2004 die Proteinsequenz der *Pseudozyma tsukubaensis* Lipase B [99]. Die DNA - Sequenz war nicht bekannt. Zur Amplifikation wurden daher sämtliche Kombinationen der teilweise degenerierten Primer *Ptsuk_variant_EcoRI_fw* 1-3 und *Ptsuk_variant_NotI_rev* 1-3 getestet (Tab. 5.6). Die Amplifikation gelang schließlich mit den Primern *Ptsuk_variant_EcoRI_fw* 1 und *Ptsuk_variant_NotI_rev* 2 (Abb. 5.10). Auch hier erfolgte die Amplifikation durch die DyNAzyme EXT™ DNA-Polymerase.

Tabelle 5.6: Primer zur Amplifikation des *Pseudozyma tsukubaensis* Lipasegens B. Bindende Bereiche sind unterstrichen dargestellt, Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* bzw. *NotI* sind kursiv gekennzeichnet.

Primerbezeichnung	Sequenz (5' – 3')
<i>Ptsuk_variant1_EcoRI_f</i>	GATGAATT <u>CACTCCCTTCGGGCTCGGACCC</u>
<i>Ptsuk_variant2_EcoRI_f</i>	GATGAATT <u>CACTYCCYTCGGGHTCGGAYCCYG</u>
<i>Ptsuk_variant3_EcoRI_f</i>	GATGAATT <u>CATTGCCYAGCGGHAGCGAYCCYG</u>
Korrespondierende Aminosäuresequenz	L P S G S D P A
<i>Ptsuk_variant1_NotI_rev</i>	TTTTCCTTTT <u>GCGGCCGCTCAGAGGATGATACCCGAGCAGGTC</u>
<i>Ptsuk_variant2_NotI_rev</i>	TTTTCCTTTT <u>GCGGCCGCTCARAGGATGATRCCVGAGCAGGTC</u>
<i>Ptsuk_variant3_NotI_rev</i>	TTTTCCTTTT <u>GCGGCCGCTCAGAAGATGATRCCGCTGCAGGTC</u>
Korrespondierende Aminosäuresequenz	- L I I G S C T K

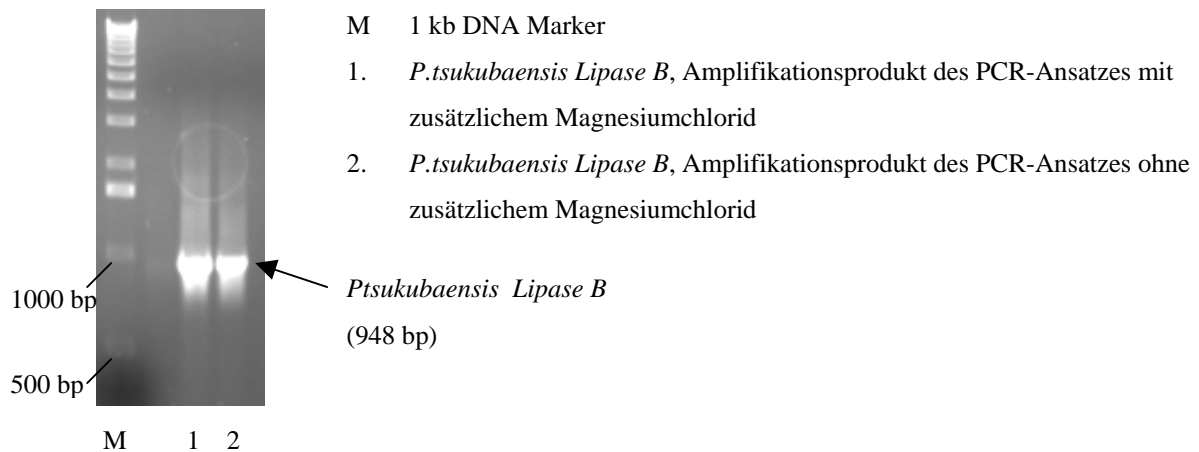


Abbildung 5.10: Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel des amplifizierten *Pseudozyma tsukubaensis* Lipasegens B.

Für die Expression der Lipasegene in *P.pastoris* wurde der kommerzielle Expressionsvektor pPICZ α A von Invitrogen gewählt. Dieser Schaukelvektor kann in *E.coli* vermehrt und dann zur Expression in *P.pastoris* eingesetzt werden. Der Vektor enthält das Resistenzgen *Sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus* bleomycin Gen), welches Resistenz gegen ZeozinTM vermittelt und daher in beiden Zellsystemen die Selektion positiver Transformanden erlaubt. pPICZ α A trägt den α - Faktor aus *S.cerevisiae* zur Ausschleusung des rekombinanten Proteins ins Medium. Die Expression der Proteine erfolgt unter Kontrolle des AOXI-Promotors, der durch Methanol induziert und durch Glycerin oder Glukose reprimiert wird. Abb. 5.11 zeigt die schematische Darstellung der erzeugten Konstrukte zur heterologen Proteinexpression. Nach Transformation von *E.coli* DH5 α wurde Plasmid - DNA isoliert und zur Kontrolle sequenziert. Während die Aminosäuresequenz der *P.tsukubaensis* Lipase B den Literaturangaben entsprach (siehe Anhang, Abb. 11.2), zeigte CalB auf Aminosäureebene die Abweichungen T57A und A89T (siehe Anhang, Abb. 11.3). Abb. 5.12 zeigt einen Sequenzvergleich der amplifizierten CalB sowie der *P.tsukubaensis* Lipase B. Die Sequenzidentität der veröffentlichten CalB - Sequenz mit der *P.tsukubaensis* Lipase B lag bei 77,7 %.

5.3.2 Expression der Lipasegene in *Pichia pastoris* im Schüttelkolbenmaßstab

Nach Transformation kompetenter *P.pastoris* X-33 Zellen mit den Konstrukten pPICZ α A-CalB und pPICZ α A-Ptsuk waren pro Transformationsansatz 3 - 8 Kolonien gewachsen. Während der 4 Tage dauernden Expression wurde parallel ein Klon mit leerem Vektor zur Kontrolle co-kultiviert. Abb. 5.13 zeigt das Wachstumsverhalten einiger kultivierter Klone. Zum Ende der Kultivierung wurde eine OD₆₀₀ zwischen 43 und 55 erreicht. Auffällig war, dass die OD₆₀₀ aller Klone nach 3 Tagen (60 - 80 Stunden) ein Maximum erreichte; danach schien die optische Dichte abzunehmen. Die Expression der Lipasen wurde mittels SDS-PAGE der Kulturüberstände überprüft. Abb. 5.14 und 5.15 zeigen SDS-Gele, die mit Coomassie bzw. Silbernitrat gefärbt wurden.

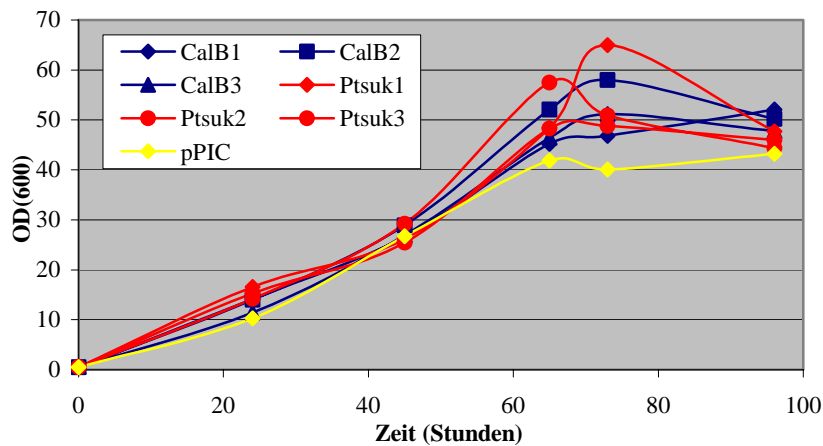
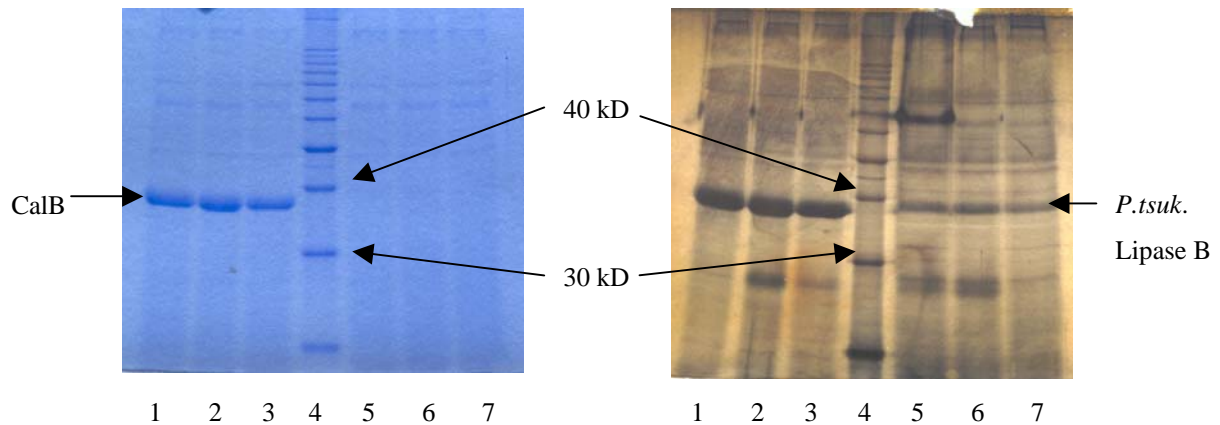


Abbildung 5.13: Wachstumsverhalten der CalB- und Ptsuk Klone im Schüttelkolben.



Abbildungen 5.14 und 5.15: SDS-PAGE der *P.pastoris* Expression von CalB und Ptsuk im Schüttelkolben.

Spuren 1-3: Kulturüberstände aus drei unterschiedlichen CalB Klonen

Spur 4: 10 kD Proteinmarker

Spuren 5-7: Kulturüberstände aus drei unterschiedlichen *P.tsuk.* Lipase B Klonen

Für die Coomassiefärbung (5.14, links) wurden pro Spur 6 µg Gesamtprotein bzw. 10 µl Proteinmarker aufgetragen, für die Silberfärbung (5.15, rechts) wurden jeweils 4 µg Gesamtprotein bzw. 5 µl Proteinmarker aufgetragen.

Deutlich sichtbar war die Expression der *Candida antarctica* Lipase B (theoretisches Molekulargewicht 33 kD) in allen untersuchten Klonen. *Pseudozyma tsukubaensis* Lipase B mit einem theoretischen Molekulargewicht von ebenfalls 33 kD war nur auf dem sensitiven silbergefärbten Gel detektierbar; die Expression war deutlich schwächer als die von CalB. Besonders das Coomassie-gefärbte SDS-Gel zeigt einen hohen Anteil des CalB Enzyms am Gesamtproteingehalt des Kulturüberstands. Daher wurde auf eine weitere Aufreinigung der Enzyme vor den weiteren Aktivitätsmessungen verzichtet.

Die Aktivitäten der Lipasen wurden zuerst mit einem Zymogramm untersucht. In Abb. 5.16 ist eine starke Aktivität der CalB gegenüber dem Substrat α -Naphthylacetat erkennbar. Sowohl die Kulturüberstände der *Pseudozyma tsukubaensis* Lipase B als auch die Überstände der Kontrollzellen zeigten keine Aktivitäten.

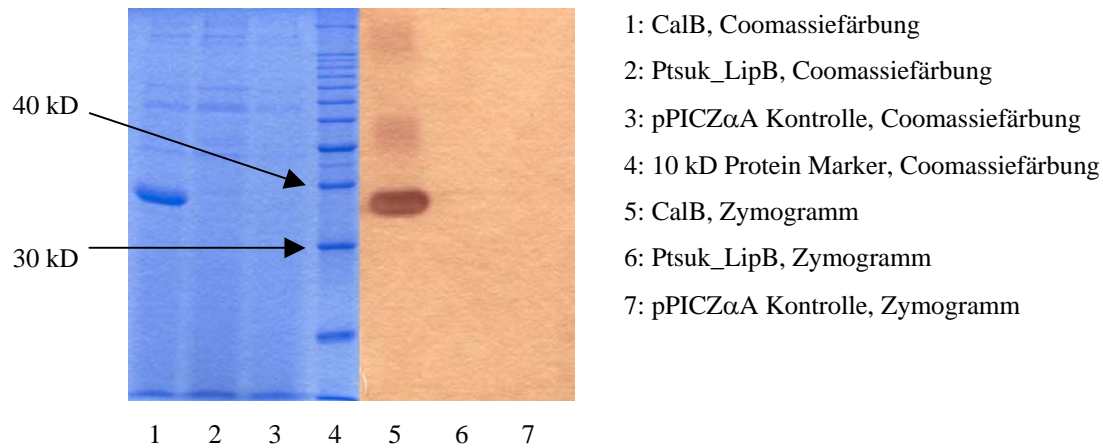


Abbildung 5.16: Zymogramm von CalB und Ptsuk.

Im Folgenden wurden die Aktivitäten der Kulturüberstände gegen die Substrate Tributyrin und MPA mit Hilfe des pH - Stat Assays gemessen. Tab. 5.7 zeigt eine Übersicht über die Messwerte. Angegeben sind die Werte für CalB Klon 1, der die höchste spezifische Aktivität zeigte.

Tabelle 5.7: Aktivität von *P. pastoris* exprimierter CalB, Ptsuk_LipB und pPICZ α A Kontrolle. 1 U ist definiert als Umsatz von 1 μ Mol Substrat pro Minute.

	Gesamtprotein [mg/ml]	Tributyrin		MPA	
		Aktivität (U/ml)	spezifische Aktivität (U/mg)	Aktivität (U/ml)	spezifische Aktivität (U/mg)
CalB	0,061	36,5	595,9	1,5	25,0
Ptsuk_LipB	0,074	0	0	0	0
pPICZ α	0,051	0	0	0	0

Demnach weist CalB eine hohe Aktivität gegenüber Tributyrin auf (36,5 U/ml Kulturüberstand bzw. 595,9 U/mg Gesamtprotein im Kulturüberstand). Die Aktivität von CalB gegen MPA entsprach mit 1,5 U/ml Kulturüberstand bzw. 25 U/mg Gesamtprotein im Kulturüberstand nur 4 % der Aktivität gegen Tributyrin. Weder die Überstände der die *P.tsukubaensis* Lipase B exprimierenden Zellen als auch die Kontrollzellen zeigten nachweisbare Aktivität gegen eines der getesteten Substrate. Auf eine Optimierung der Expression von *P.tsukubaensis* Lipase B wurde in dieser Arbeit aufgrund des völligen Fehlens einer nachweisbaren Lipaseaktivität verzichtet.

5.3.3 Fermentation von *Candida antarctica* Lipase B in *Pichia pastoris*

Als Voraussetzung für einen möglichen industriellen Einsatz von CalB bzw. einer von CalB abgeleiteten Mutante sollte die Fermentation von CalB Wildtyp etabliert werden. Verwendung fand hier pPICZ α A-CalB Klon1 (siehe Abb. 5.14 + 5.15). Die Fermentation wurde im 5 l Maßstab durchgeführt. Der Verlauf des Sauerstoffverbrauchs und der Fütterungen während der Fermentation ist in Abb. 5.17 dargestellt.



Abbildung 5.17: Sauerstoff - und Methanolverbrauch während der CalB-Fermentation.

Bis zum 11. Tag der Fermentation war das Zellwachstum und der damit verbundene Sauerstoffverbrauch sehr gleichmäßig, während die Zellen gegen Ende der Fermentation auf die Methanolzugaben nur sehr verzögert reagierten. Abb. 5.18 zeigt den Verlauf der Fermentation in Bezug auf Biofeuchtmasse, Biotrockenmasse, OD₆₀₀, Aktivität gegen Tributyrin (U/ml Fermentationsüberstand), spezifische Aktivität gegen Tributyrin (U/mg Gesamtprotein).

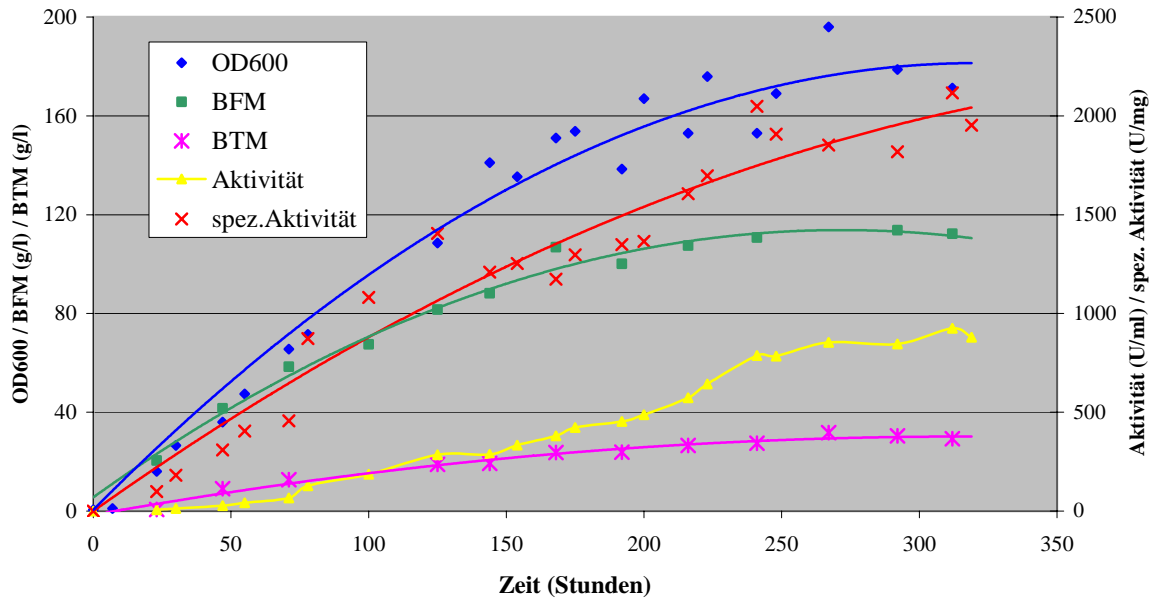


Abbildung 5.18: Fermentationsverlauf

Abkürzungen: BFM = Biofeuchtmasse; BTM = Biotrockenmasse

Der Verlauf der Lipaseexpression wurde zudem auf einer SDS-PAGE verfolgt. Abb. 5.19 und 5.20 zeigen SDS-Gele, auf denen Fermentationsüberstände von verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation aufgetragen sind.

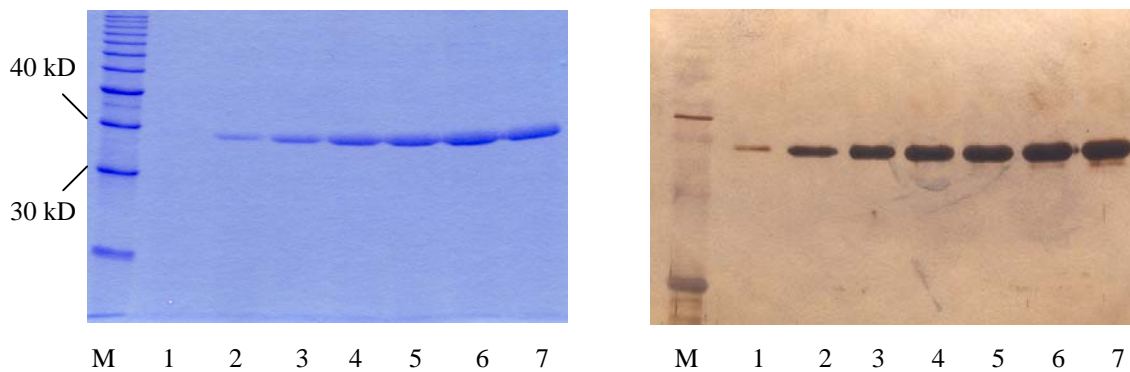


Abbildung 5.19 + 5.20: SDS-PAGE der Fermentationsproben, gefärbt mit Coomassie (5.19, links) bzw. Silberfärbung (5.20, rechts).

M: 100 kD Protein Marker 1: Tag 1 der Fermentation 2: Tag 3 der Fermentation
 3: Tag 5 der Fermentation 4: Tag 7 der Fermentation 5: Tag 9 der Fermentation
 6: Tag 11 der Fermentation 7: Tag 13 der Fermentation

Für die Coomassiefärbung (5.19) wurden 3 μ l Fermentationsüberstand (= 1,35 μ g Gesamtprotein an Tag 13), für die Silberfärbung (5.20) wurden 1 μ l Fermentationsüberstand (= 0,45 μ g Gesamtprotein an Tag 13) aufgetragen.

Beide Gele zeigen die permanente Zunahme an exprimierter Lipase, andere möglicherweise im Überstand vorhandene Proteine waren mit beiden Färbemethoden nicht nachweisbar. Aufgrund dieses Befunds wurde auf eine weitere Aufreinigung des Proteins auch hier verzichtet. Der Fermentationsüberstand wurde mit Hilfe eines Crossflow-Filtersystems (10 kD Membran) aufkonzentriert, in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 umgepuffert und bei 8°C gelagert. Tab. 5.8 zeigt eine Übersicht über die Gesamtausbeute der Fermentation.

Tabelle 5.8: Übersicht über die Ausbeute der CalB-Fermentation. 1 U ist definiert als Umsatz von 1 µMol Tributyrin pro Minute.

	Kultur	Fermentationsüberstand nach Ernte	Fermentationsüberstand nach Umpuffern und Aufkonzentrieren
Volumen (ml)	4100	3600	850
Biofeuchtmasse (mg/ml)	112		
Biotrockenmasse (mg/ml)	29		
OD600	171		
Proteingehalt (mg/ml)		0,45	1,45
Gesamtproteinausbeute (mg)		1620	1230
Aktivität [U/ml]		879	4611
Aktivität gesamt [U]		3 163 536	3 919 520
spezif. Aktivität [U/mg]		1953	3176

5.3.4 Mutagenese der *Candida antarctica* Lipase B, Expression und Charakterisierung der korrespondierenden Genprodukte

Nachdem die Expression und Fermentation des Wildtyps der CalB etabliert waren, sollten verschiedene Typen von Mutationen an der Lipase untersucht werden. Diese sollten einerseits zum Verständnis der außerordentlichen Enantioselektivität von CalB bei der Hydrolyse beitragen, andererseits sollte die Enantioselektivität bei der Umesterung von sekundären Alkoholen erhöht werden.

5.3.4.1 Mutagenese zum Verständnis der hohen Enantioselektivität während der Hydrolyse

Die Strukturvergleiche von CalB und anderen Lipasen ergaben, dass nur CalB eine charakteristische zusätzliche Helix aufweist, die quer über der Substratbindetasche liegt und somit nur einen engen Spalt zum Eintritt der Substrate zum aktiven Zentrum freilässt. Der Umsatz möglicher Substrate sollte daher stark von ihrer Konformation abhängig sein, was die hohe Enantioselektivität von CalB erklären könnte.

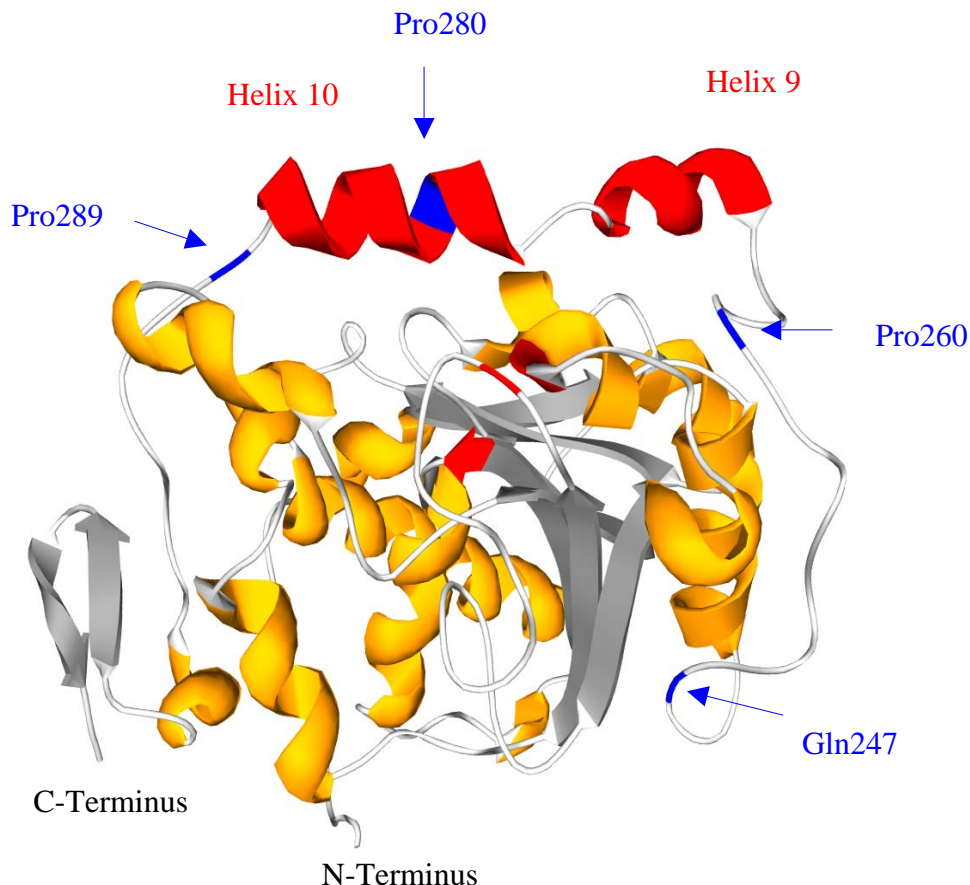


Abbildung 5.21: Position der in CalB eingefügten Kettenabbrüche.

Darstellung durch Swiss PDB-Viewer. α-helicale Strukturen sind orange, β-Stränge sind grau dargestellt. Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot hervorgehoben. Helices 9 und 10 sind rot dargestellt. Positionen der in den Mutanten hervorgerufenen Kettenabbrüche sind blau dargestellt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Punktmutationen zur Einführung von Stopcodons an verschiedenen Stellen in der DNA - Sequenz durchgeführt, die einen vorzeitigen Kettenabbruch bei der Proteinsynthese von CalB zur Folge hatten. Die C - terminale Helix wurde durch diese Kettenabbrüche ganz bzw. teilweise abgeschnitten. Zusätzlich wurde eine Mutante kloniert, die zwar die gesamte Helix besaß, der jedoch die Loopregion am C -

terminalen Ende der Helix fehlte. Hierbei sollte geklärt werden, inwieweit die Helix durch diese Region in ihrer Position oberhalb des aktiven Zentrums stabilisiert wird. Abb. 5.21 veranschaulicht die Positionen der eingeführten Stopcodons in CalB.

Abb. 5.22 zeigt das Wachstumsverhalten der Klone während der 4 Tage dauernden Expression. Sowohl die Mutanten als auch der Klon mit leerem pPICZ α A-Vektor zeigten ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum.

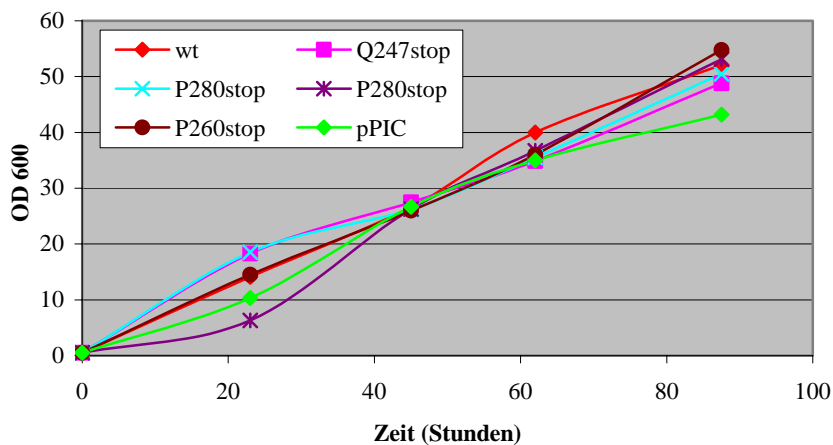


Abbildung 5.22: Wachstumsverhalten der CalB-Klone mit Kettenabbrüchen im Schüttelkolben.

Die Expression der Mutanten wurde mittels SDS-PAGE untersucht. Nach erfolgter Auftrennung der konzentrierten Kulturüberstände auf dem Gel wurden eine Färbung mit Coomassie und eine Färbung mit Silbernitrat durchgeführt. Abb. 5.23 und 5.24 zeigen die gefärbten Gele.

Während CalB-Wt schon auf dem Coomassie-gefärbten Gel eine starke Expression des Proteins zeigte, war sowohl bei den Mutanten als auch bei der Kontrolle mit leerem Vektor keinerlei Proteinüberexpression erkennbar. Auch die sensitivere Silberfärbung gab keinen Hinweis auf eine Expression der CalB-Mutanten (theoretische Molekulargewichte: Q247stop: 26 kD; P260stop: 27 kD; P280stop: 29 kD; P289stop: 30 kD). Auffallend war hierbei auch das Proteinbandenmuster des Q247stop Klons. Dieses zeigte deutliche Abweichungen zu den anderen Klonen, so dass eine Kontamination hier nicht ausgeschlossen werden konnte.

Obwohl die Expression der Mutanten durch Gelelektrophorese nicht nachgewiesen werden konnte, wurden Aktivitätsmessungen durchgeführt, um möglicherweise schwach exprimierte Mutanten nachzuweisen. Die Messungen wurden mit Hilfe der pH – Stat Methode

durchgeführt. Dabei wurden jeweils 100 µl Kulturüberstand bei 30°C, pH 7,5 vermessen. Keiner der Kulturüberstände der Mutanten zeigte Aktivität gegen Tributyrin oder MPA.

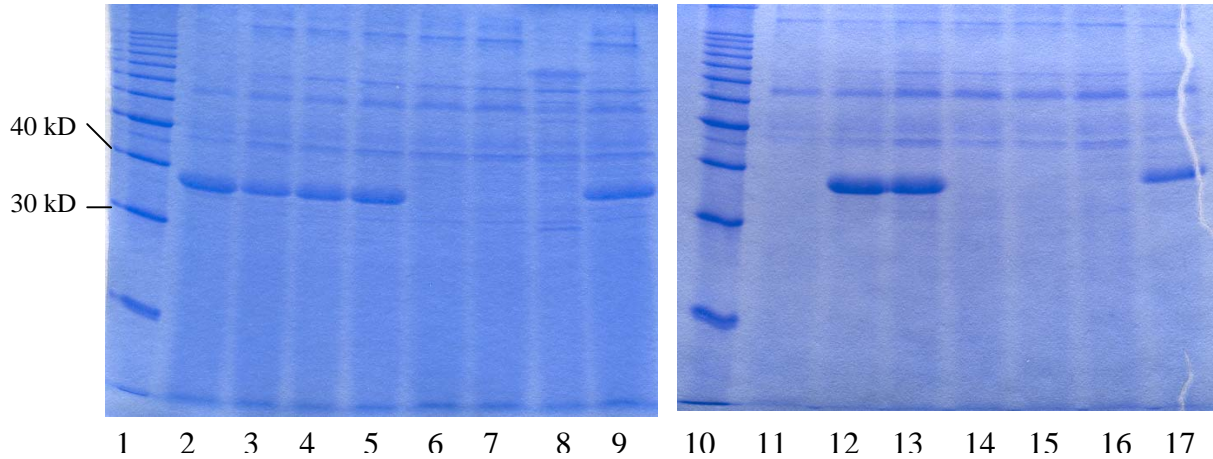


Abbildung 5.23: SDS-PAGE der in *P.pastoris* exprimierten CalB - Mutanten nach Coomassiefärbung.

Für die Coomassie-gefärbten Gele (Abb. 5.23) wurden 10µl Proteinmarker und *P.pastoris*-Kulturüberstand mit jeweils 4 µg Gesamtprotein aufgetragen. Für die Gele mit Silberfärbung (Abb. 5.24) wurden jeweils 2,7 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Spurenbelegung in Abb. 5.23 und 5.24:

1: 10 kD Proteinmarker	6: P280stop	10: 10 kD Proteinmarker	14: P260stop
2: CalB-Wt	7: P260stop	11: pPICZα Kontrolle	15: P280stop
3: A281L	8: Q247stop	12: CalB-Wt	16: P289stop
4: A281V	9: CalB-His	13: G39A	17: CalB-His
5: A281F			

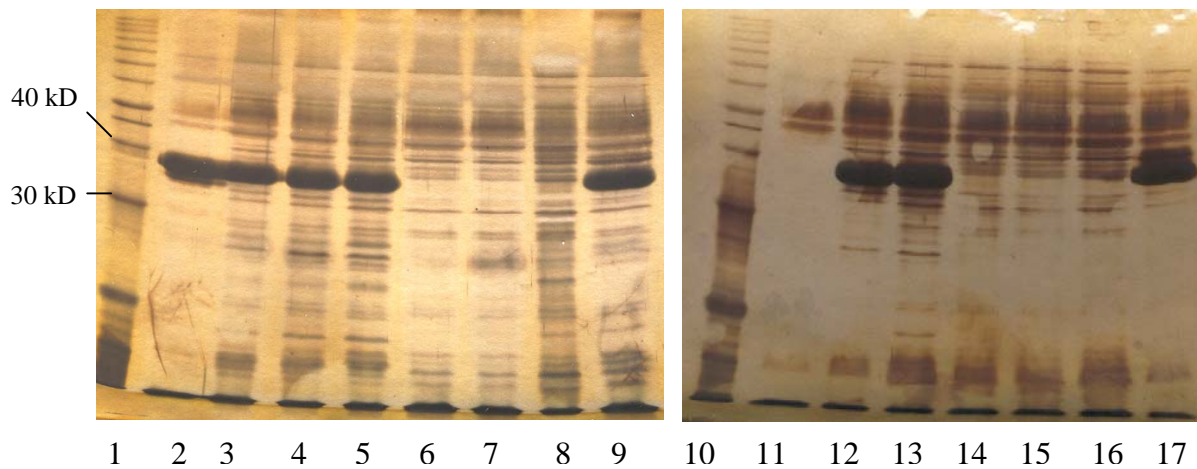


Abbildung 5.24: SDS-PAGE der in *Pichia pastoris* exprimierten CalB-Mutanten nach Silberfärbung.

Aus den oben gezeigten Ergebnissen wurde gefolgert, dass keine stabile Expression der Mutanten stattfand bzw. die Mutanten bei geringer Expression eine nicht nachweisbare Aktivität hatten. Somit wurde auf die Enantioselektivitätsmessung der Kulturüberstände am GC verzichtet.

5.3.4.2 Mutagenese zur Steigerung der Enantioselektivität bei der Umesterung

Während die Hydrolyse von MPA durch CalB mit sehr hoher Enantioselektivität ($E > 100$) stattfindet, wird die Veresterung von MP mit nicht optimalem E -Wert ($E \sim 70$) katalysiert [35]. Eine Optimierung der katalytischen Eigenschaften von CalB mit Hilfe von rationaler Mutagenese bot sich daher an.

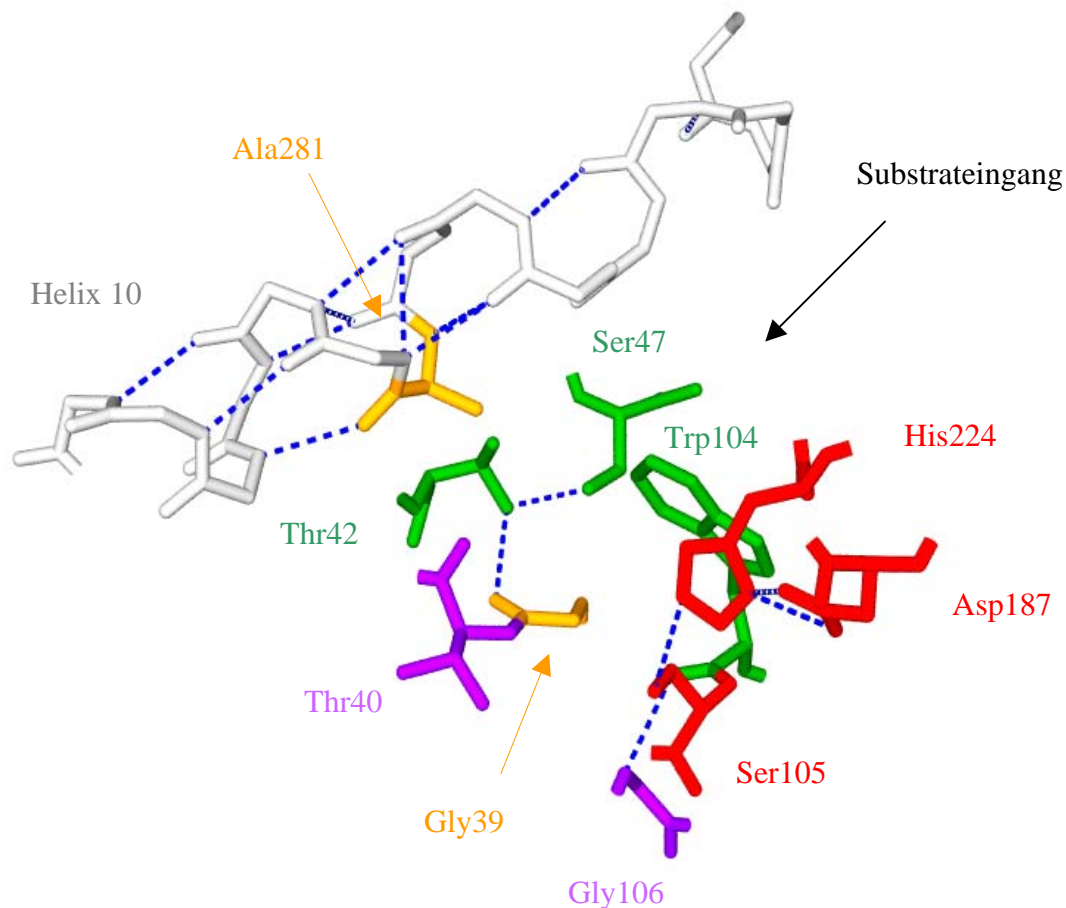


Abbildung 5.25: Positionen der Mutationen in der Substratbindetasche von CalB

Darstellung durch Swiss PDB-Viewer. Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot, die der Oxyanionbinde-tasche violett und die der Stereoselektivitätstasche [47] grün dargestellt. Die in dieser Arbeit veränderten Reste Gly39 und Ala281 sind orange dargestellt. Wasserstoffbrücken sind blau gestrichelt dargestellt.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Mutationen an Position A281 und G39 sollten den schon in CalB Wt beschränkten Raum der Substratbindetasche weiter einschränken, um so eine Erhöhung der Enantioselektivität von CalB zu erreichen (Abb. 5.25).

Das Wachstum der einzelnen Klone während der 4 Tage dauernden Expression ist in Abb. 5.26 dargestellt. Keiner der Klone zeigt hierbei eine vom Wildtyp stark abweichende Wachstumskurve.

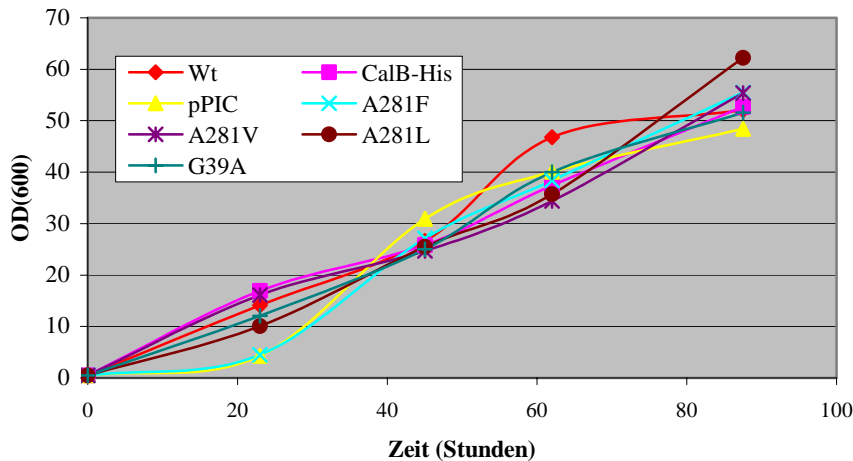


Abbildung 5.26: Wachstumsverhalten der CalB-Klone mit Mutationen der Substratbindetasche im Schüttelkolben.

Die Expression der Lipasen wurde mittels SDS-PAGE der Kulturüberstände überprüft (Abb. 5.23 und 5.24). Deutlich sichtbar ist die Expression von CalB-Wt (theoretisches Molekulargewicht 33 kD) und aller CalB-Mutanten (33 kD). Auch der mit His-Tag fusionierte Klon zeigt eine deutliche Expression (36 kD). Die Aktivität der Mutanten gegenüber MPA und Tributyrin wurde mittels pH-Stat-Methode bei 30°C und pH 7,5 vermessen. Tab. 5.9 zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung, die in Abb. 5.27 veranschaulicht sind.

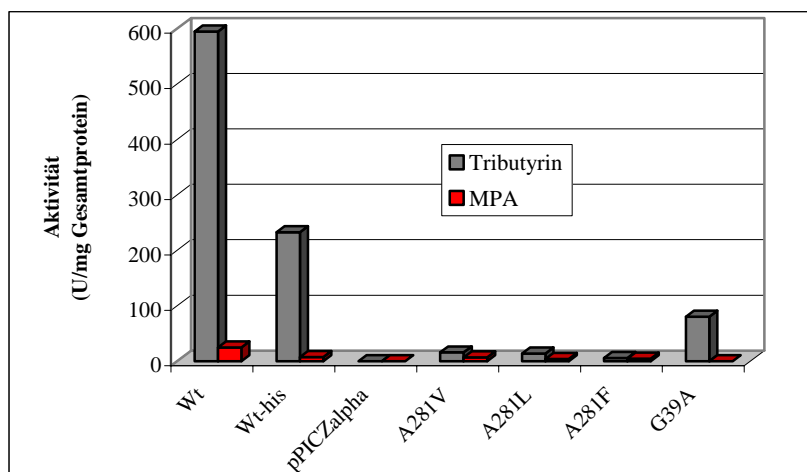
Alle Mutanten zeigen hydrolytische Aktivität, wobei G39A mit 80 U/mg die höchste Aktivität aller Mutanten gegen Tributyrin besitzt, die jedoch nur 13,3 % der Wildtypaktivität (595 U/mg) entspricht. Die Mutanten mit Substitutionen des Alanins 281 zeigen spezifische Aktivitäten gegen Tributyrin von 14 (A281L), 16 (A281V) bzw. 6 U/mg (A281F) und somit nur 1,0 bis 2,7 % der Wildtypaktivität. Wie bereits für den Wildtyp beobachtet, zeigen die Mutanten einen schlechteren Umsatz von MPA als von Tributyrin. Tatsächlich scheint die Spezifität der Mutanten jedoch weniger stark ausgeprägt zu sein als die des Wildtyps. So liegt die Aktivität des Wildtyps bei der Hydrolyse von MPA nur bei 4 % der Aktivität der

Tributyrylhydrolyse; die Mutanten erreichen 28,6 bis 83,3 % der Werte für die Tributyrinhydrolyse.

Tabelle 5.9: Aktivität der CalB-Mutanten bei der Hydrolyse von Tributyrin und MPA. 1 U ist definiert als Umsatz von 1 μ Mol Tributyrin pro Minute.

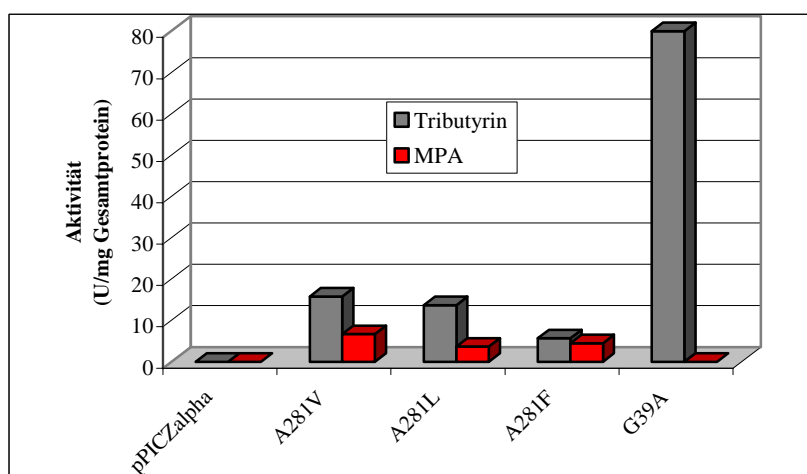
	Wt	Wt-his	pPICZ α A	A281V	A281L	A281F	G39A
Spez. Aktivität (Tributyrin) [U/mg Gesamtprotein]	595	233	0	16	14	6	80
Relative Aktivität (Tributyrin) gegenüber Wt [%]	100	39,1	0	2,7	2,3	1,0	13,4
Spez. Aktivität (MPA) [U/mg Gesamtprotein]	25	8	0	7	4	5	0
Relative Aktivität (MPA) gegenüber Wt [%]	100	32,0	0	28,0	16,0	20,0	0

A



Aktivitäten aller Mutanten, CalB-Wt, CalB-His und pPICZ α A Kontrolle

B



Aktivitäten aller Mutanten und pPICZ α A Kontrolle

Abbildung 5.27: Aktivität der CalB-Mutanten gegen Tributyrin und MPA.

Die Diagramme geben die Werte aus Tabelle 5.9 wieder.

Da die Mutanten eine vom Wildtyp stark abweichende Aktivität zeigten, wurde als Referenzwert der Enantiomerenüberschuss *ee* bzw. der E - Wert bei einem Umsatz von 5 % des Substrats gemessen. Die Werte sind in Abb. 5.28 dargestellt.

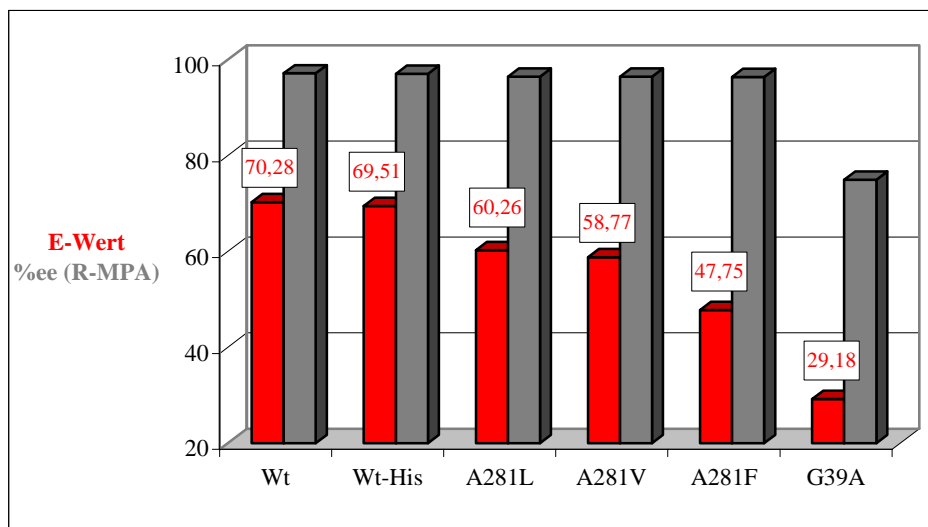


Abbildung 5.28: Enantioselektivität der CalB-Mutanten gegen MP in der Umesterung

Sowohl für den Wildtyp ($E = 70,28$, $ee = 97,17\%$) als auch für Wt-His ($E = 69,51$, $ee = 97,05\%$) wurden die erwarteten Werte erhalten. Alle Mutanten zeigten eine im Verhältnis zum Wildtyp deutlich verringerte Enantioselektivität. Während A281L und A281V ähnliche Werte ergaben ($E = 60,26$, $ee = 96,49\%$ bzw. $E = 58,77$, $ee = 96,45\%$), zeigte die Mutante A281F mit dem deutlich größeren, aromatischen Substituenten Phenylalanin eine geringere Selektivität ($E = 47,75$, $ee = 96,4\%$). Die Mutante G39A zeigte eine relativ geringe Selektivität mit $E = 29,18$ und $ee = 74,97\%$.

5.4 Synthese eines Lipasegens aus *Moraxella* sp. TA144 und Charakterisierung des korrespondierenden Enzyms

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, mit einer vollkommen neuen Methode des synthetischen Shufflings eine hochdegenerierte Genbank darzustellen (s. 5.5). Die zu Grunde liegende Methode der schrittweisen Verlängerung eines synthetischen Gens sollte zunächst anhand der Synthese eines konservierten Lipasegens erprobt werden. Das hier synthetisierte Gen *lip1* aus dem psychrophilen Organismus *Moraxella* sp. TA144 war aus mehreren Gründen interessant: zum einen zeigen Enzyme aus psychrophilen Organismen oft hohe katalytische Aktivität auch bei niederen Temperaturen, was eine Energieersparnis in der industriellen Anwendung bedeutet und eine schonendere Behandlung für instabile Substrate ermöglicht. Außerdem besitzen diese Enzyme oft eine hohe Enantiospezifität, was auf die Rigidität ihrer Struktur bei niederen Temperaturen zurückzuführen ist [230].

5.4.1 Gensynthese

Die DNA - Sequenz des für Lip1 aus *Moraxella* sp. TA144 codierenden Gens wurde an die Codonpräferenz von *E.coli* angepasst, um eine optimale Expression des Lipasegens zu gewährleisten. Die gewählte Nukleotidsequenz enthielt 61 Änderungen zu der Wildtyp - Sequenz, wobei die Aminosäuresequenz nicht verändert wurde (siehe Anhang, Abb. 11.4). Alle Änderungen wurden vorgenommen um

- den G + C Gehalt möglichst nahe an 50 % anzupassen
- die Annealingtemperatur an die des korrespondierenden Primers anzupassen
- die Codons an die Codonpräferenz von *E.coli* anzupassen
- starke Sekundärstrukturen innerhalb der Primersequenzen zu vermeiden

Die Synthese des Gens wurde durch eine schrittweise Verlängerung in einer Serie aufeinanderfolgender PCR Reaktionen unter Verwendung nicht degenerierter Oligonukleotide verwirklicht. Die Oligonukleotide wurden, beginnend vom Zentrum des synthetischen Lipasegens (TA144-0F und 0R), fortlaufend durchnummeriert (Abb. 5.29).

^{12F}GGAATTCCAT^{11F}ATGTTTATCATGATCAAAAAATCTGAACTGGCAAAAGCTATTATCG^{10F}TCACGGGCGCGT
 TGG^{11F}TTTTTCTATTCCGACCTTAGCT^{9F}GAAGTTACCTTATCTGAAACCA^{10F}CGGTTAGCTCAATTAATC^{8F}TG
 AAGCTACGGTTAGCTCA^{9F}ACCAAAAAAGCATTACCGGC^{7F}AACGCCGTCAGATTGTATTG^{8F}CTGATAGCAAAAT
 ACTGCAGTT^{6F}GCTCTGTCAGATACCCG^{7F}TGATAATGGCCCGTTTTCTATCCGT^{5F}ACCAAACGCATTTTCGCGC^{6F}C
 AGTCGGCGAAAGTTTTCGGTGG^{4F}TGGTACGATTCACTACCC^{5F}GACCAACGCTAGCGGCTGCGGTCT^{3F}GTTAGGC
 GCTATTGCCG^{4F}TGGTTCGGGTTACGTTTCTT^{2F}ACGAAAACCTATCAAGTGGTG^{3F}GGGACCGCTCTGGCTTC¹
^FTGGGGCTTTGTCTTATC^{2F}ACCATCAATACCAACTCTATC^{0F/R}TATGATGATCCGGATAGCC^{1F}GCGCCGCACA
 GTTGAATGCA^{1R}GCACTGGATAACATGATTGCT^{0F/R}GATGATACCGTCGGCAGCATG^{2R}ATTGATCCGAAACGGTTG
 G^{1R}GCGCTATTGGCTGGTCAATGGGTGG^{3R}CGGCGGCGCGCTGAAA^{2R}CTGGCAACGGAACGCAGCACCGTGCGA^{4R}G
 CCATTATGCCGCTGG^{3R}CGCCGTATCATGATAAAAGCTATGG^{5R}CGAAGTGAAAACGCCGAC^{4R}CTTGGTCATTGCC
 TGCGAAGAT^{6R}GATCGGATTGCTGAAACCA^{5R}AAAAATATGCCAACG^{7R}CGTTTTATAAAAAATGCCATTGGC^{6R}CCGA
 AAATGAAAGTTGAA^{8R}GTGAACAATGGCAGCCAC^{7R}TTTTGTCCGAGCTACCG^{9R}CTTTAACGAAATCTGTTAAGC
 AA^{8R}ACCGGGCATCGC^{10R}GTGGATGCAGCGTTATATTAATA^{9R}ATGATACGCGTTT^{11R}CGATAAATCTTATGTGCC
 AAC^{10R}GAAAACCTATAGCAAAAG^{12R}CCCGCTATCTCAGCTTATG^{11R}ATTATAAAGATTGCCCGTAAGGATCCCG¹²
 R

Abbildung 5.29: Sequenz des optimierten Lip1-Gens.

Das 5'-Ende jedes Primers ist durch die korrespondierende Nummer in hochgestellter Schrift markiert, das 3'-Ende jeweils durch die entsprechende Nummer in tiefgestellter Schrift. Die überlappenden und somit bindenden Bereiche der Oligonukleotide sind unterstrichen dargestellt. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* sind kursiv dargestellt.

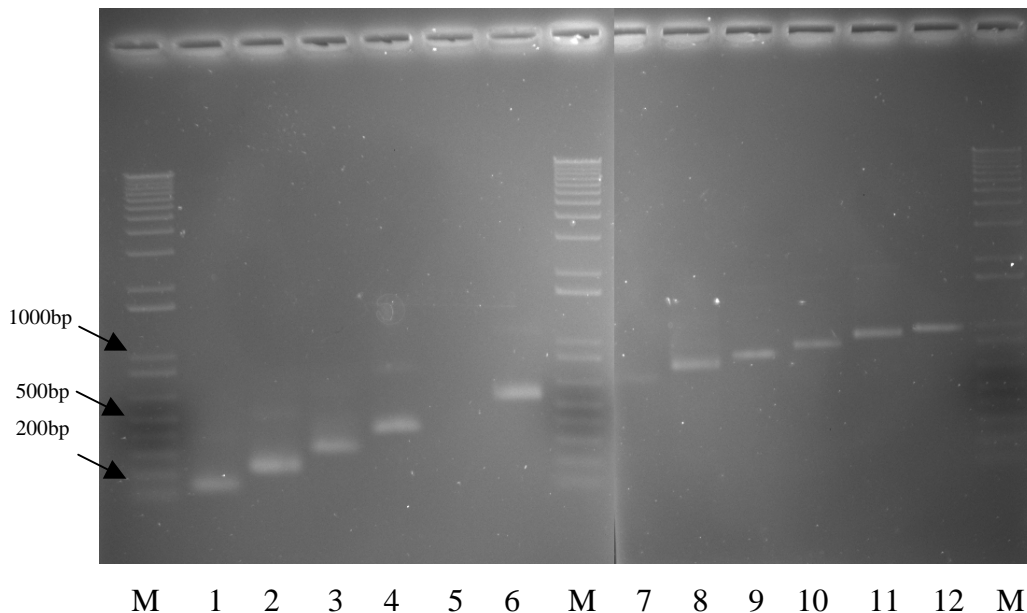


Abbildung 5.30: Zwischenprodukte der Gensynthese.

Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel mit jeweils 10 µl der aufgereinigten PCR-Produkte. M: 50 bp / 1 kb Kombi-Marker (Biorad). 1-12: Zwischenprodukte der Gensynthese (PCR 1-12).

Die Synthese des Gens wurde mit der *Taq* DNA-Polymerase durchgeführt. Die Zwischenprodukte der Gensynthese von *lip1* sind in Abb. 5.30 dargestellt. Die fehlende DNA - Bande in Spur 5 ist auf eine geringe DNA - Konzentration der Probe zurückzuführen. Nichtsdestotrotz war die Menge an Templat-DNA ausreichend für den nachfolgenden Amplifikationsschritt (Spur 6).

Bei einer Sequenzierungsreaktion des 960 bp langen Produkts der Gensynthese wurden drei ungewollte Mutationen innerhalb von *lip1* detektiert. Dabei handelte es sich um zwei Punktmutationen, wobei eine davon keinen Aminosäureaustausch im Protein zur Folge hatte. Die andere Punktmutation bewirkte einen Austausch von Alanin 55 zu Valin. Die dritte Mutation war die Deletion einer Base (A386), was zu einer Leserasterverschiebung und schließlich zum Kettenabbruch an Position 161 führte.

5.4.2 Klonierung des Lipasegens und Expression in *E. coli*

Das synthetisierte Lipasegen wurde in den Expressionsvektor pJOE [234] kloniert, in dem das Lipasegen unter Kontrolle des starken, Rhamnose - induzierbaren Promotors *rhaP* aus *E.coli* stand (Abb. 5.31). pJOE, der zur Selektion das Ampizillinresistenz vermittelnde *bla* - Gen besitzt, liegt in nur geringer Kopienzahl in der Zelle vor.

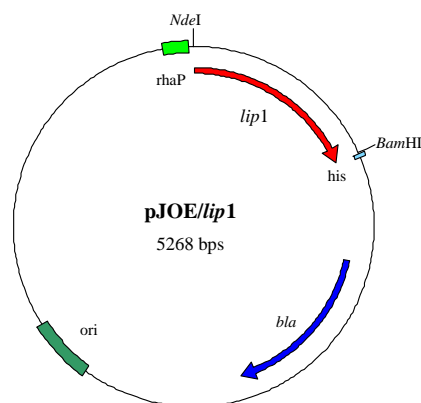


Abbildung 5.31: Expressionskonstrukt pJOE/*lip1*.

Zwei der aufgetretenen Mutationen, Punktmutation A55V und die Deletion, wurden mittels „QuikChange“-Reaktion beseitigt und das Konstrukt nochmals zur Kontrolle sequenziert. Nach Transformation kompetenter *E.coli* XL-1 *blue* Zellen wurden Expressionsexperimente im Schüttelkolbenmaßstab bei 30°C durchgeführt. Abb. 5.32 zeigt den Verlauf der Expression anhand einer Coomassie - gefärbten SDS-PAGE. Lip1 wurde nur geringfügig überexprimiert.

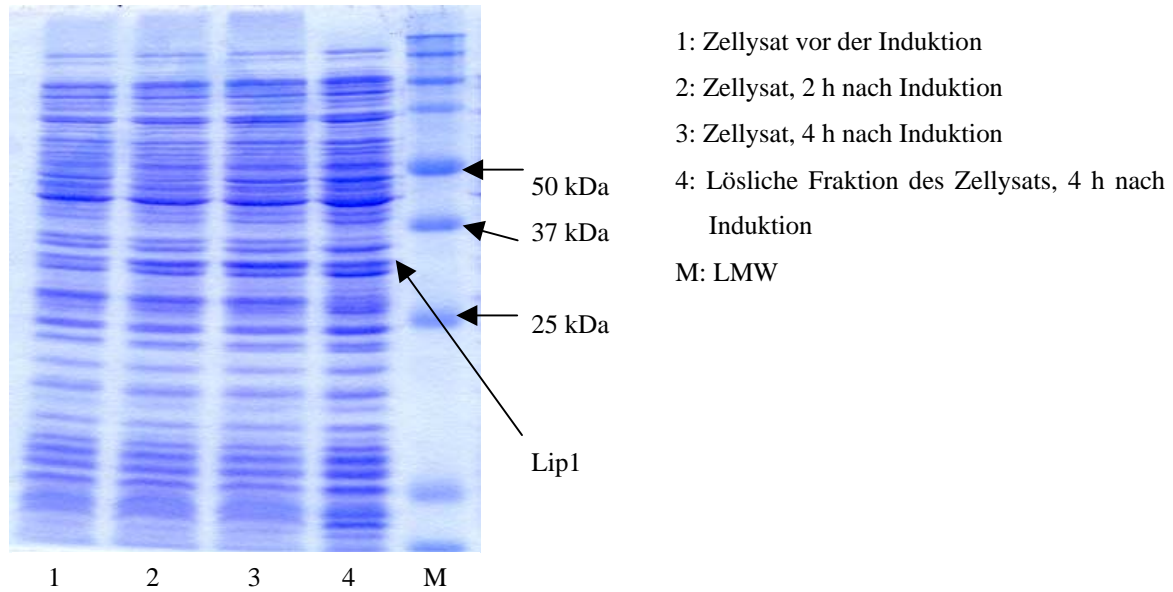


Abbildung 5.32: SDS-PAGE der Lip1-Expression in *E.coli*.

5.4.3 Charakterisierung von Lip1

5.4.3.1 Temperaturprofil

Die temperaturabhängige Aktivität von Lip1 gegen das Substrat Tributyrin wurde mit Zellrohextrakt mit der pH-Stat-Methode bei pH 7.0 gemessen (Abb. 5.33). Für die Messungen wurden jeweils 100 μ l Zellrohextrakt eingesetzt.

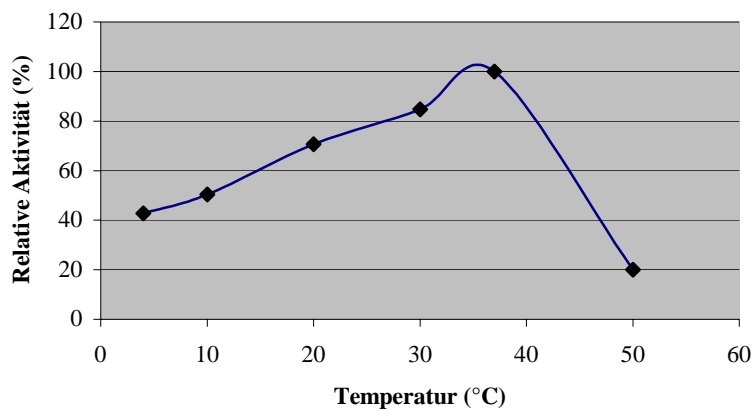


Abbildung 5.33: Relative Aktivität von Lip1 bei unterschiedlichen Temperaturen.

Die höchste Aktivität wurde bei 37°C gemessen, wobei bereits bei 30°C die Aktivität während der Messungen schnell abfiel (Daten nicht dargestellt). Bei 50°C konnte zunächst noch 20 % der Aktivität gemessen werden, nach wenigen Minuten war keine Aktivität mehr nachweisbar. Bei 4°C war 43 % der Aktivität messbar, die bei dieser Temperatur auch über längere Zeit nachweisbar war.

5.4.3.2 Substratspektrum

Zur Bestimmung des Substratspektrums von Lip1 wurde die pH-stat Methode verwendet. Eingesetzt wurde die lösliche, unaufgereinigte Fraktion von *E.coli* Zellysat.

Lip1 zeigte die höchste Aktivität bei der Hydrolyse von Tributyrin. Auch Tricaprylin und Propylbutyrat wurden umgesetzt. MPA wurde nicht hydrolysiert (Tab. 5.10).

Tabelle 5.10: Substratspektrum von Lip1. 1 U ist definiert als Umsatz von 1 µMol Tributyrin pro Minute.

Substrat	Aktivität [U/ml]	Relative Aktivität [%]
Tributyrin	83,74	100
Tricaprylin	68,73	82,1
Triolein	7,60	9,1
Methylbutyrat	1,40	1,7
Methylcaproat	0,24	0,3
1-Methoxy-2-Propanolacetat	0	0
Methyl-(R)-3-hydroxybutyrat	0	0
Oleinsäuremethylester	0	0
Ethylbutyrat	0,59	0,7
Ethyl-3-hydroxybutyrat	0	0
Propylbutyrat	19,73	23,6
Phenylacetat	6,99	8,3
1-Phenoxy-2-Propanolacetat	2,28	2,7
β-Propiolacton	0	0

5.5 Darstellung und Screening einer Genbank mit Hilfe von synthetischem Shuffling

5.5.1 Expression der *Candida antarctica* Lipase B in *E. coli*

Aufgrund seiner unproblematischen Kultivierbarkeit, der hohen Transformationseffizienz und der Expression heterologer Proteine innerhalb weniger Stunden bietet sich *E.coli* als Expressionssystem einer Genbank an. Aus Gründen der Codonpräferenz und vor allem der posttranslatorischen Modifikation, Proteinfaltung und Disulfidbrückenbildung lassen sich jedoch nicht alle Fremdproteine, insbesondere solche eukaryotischen Ursprungs, in *E.coli* aktiv exprimieren. Vor Beginn der Genbanksynthese sollte daher überprüft werden, inwieweit sich eine von CalB abgeleitete Genbank in *E.coli* exprimieren lassen würde. CalB besitzt drei Schwefelbrücken, was die Expression vor allem in Prokaryoten erschwert [152]. Die Expression der Genbankklone müsste in jedem Fall so hoch sein, dass sich aktives Protein mittels eines Plattenassays nachweisen lassen könnte. Eine anschließende Expression zur Produktion der durch Screening gefundenen aktiven Klone in einem anderen Expressionssystem wie *Pichia pastoris* wäre, wie bereits für CalB Wildtyp gezeigt, möglich.

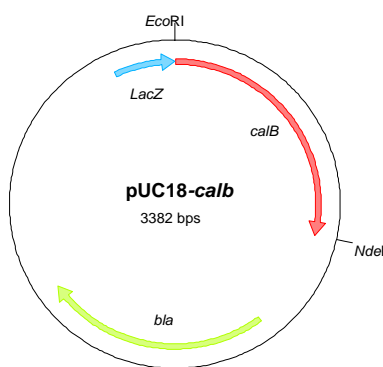
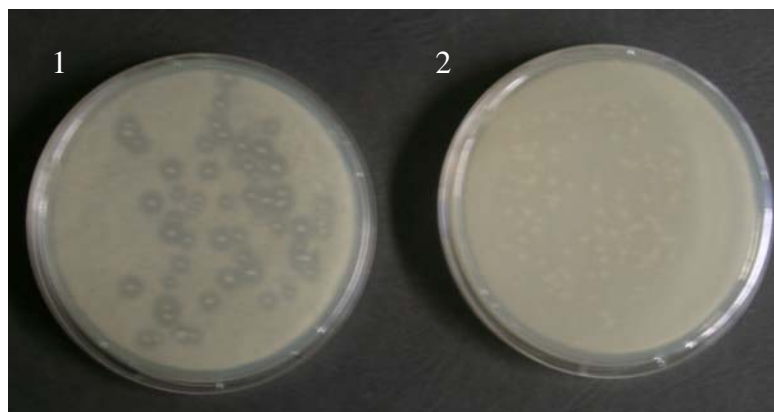


Abbildung 5.34: Expressionskonstrukt pUC18/calB

Für die Expression der Genbank in *E.coli* wurde der Vektor pUC18 (Invitrogen) eingesetzt. Dieser Expressionsvektor liegt in der Zelle in hoher Kopienzahl vor und gehört mit einer Größe von 2686 bp zu den kleinsten Expressionsvektoren. Diese Eigenschaft gewährleistet eine gute Transformationseffizienz der Konstrukte. pUC18 trägt seine *multiple cloning site* innerhalb des *lacZ*-Gens, welches unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacZ*-Promotors

steht. Auch ohne Induktion durch IPTG zeigt pUC18 stets eine geringe Basalexpression. Zur Selektion dient das Ampizillinresistenz vermittelnde *bla* - Gen.

Das CalB-Wt Gen lag in pPICZ α A kloniert vor (Abb. 5.11) und wurde in pUC18 subkloniert (Abb. 5.34). Die aktive Expression der Lipase sollte mit dem Tributyrin - Plattenassay nachgewiesen werden. Dazu wurden drei verschiedene *E.coli* Stämme mit dem ligierten Konstrukt transformiert und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert. Neben dem bereits erwähnten DH5 α Zellen wurden OrigamiTM Zellen (Invitrogen) verwendet. Dieser Stamm besitzt eine Thioredoxin - Reduktase und Glutathion - Reduktase Defizienz; dadurch wird die Ausbildung von Schwefelbrücken im Zytoplasma begünstigt. Zusätzlich erfolgte die Transformation in AD494 Zellen (Novagen), die eine Defizienz der Thioredoxin - Reduktase, nicht aber der Glutathion - Reduktase besitzen. Nach erfolgter Transformation wurden die Zellen auf Tributyrin - Agarplatten, welche zusätzlich Ampizillin zur Selektion und IPTG zur Expressionsinduktion enthielten, ausplattiert und ü.N. bei 30 bzw. 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle dienten jeweils Zellen, die mit leerem Vektor transformiert wurden. Abb. 5.35 zeigt die OrigamiTM Kulturen nach Inkubation bei 30°C. Während alle DH5 α Kulturen, alle AD494 Kulturen und die bei 37°C gewachsene OrigamiTM Kulturen keine Lipaseaktivität erkennen liessen (nicht abgebildet), zeigten die bei 30°C kultivierten OrigamiTM Zellen deutliche Halos, was die Hydrolyse des in den Platten befindlichen Tributyrins anzeigte.



E.coli OrigamiTM Zellen auf LB-Tributyrin Agarplatten, inkubiert bei 30°C

1: transformiert mit pUC18/*calB*

2: transformiert mit pUC18

Abbildung 5.35: Expression von CalB-Wt in *E.coli* OrigamiTM Zellen

Die Expression von CalB wurde im Folgenden im Schüttelkolbenmaßstab getestet. Auch hier wurden *E.coli* OrigamiTM Zellen bei einer Expressionstemperatur von 30°C verwendet. Abb. 5.36 zeigt eine SDS-PAGE mit Extrakten der Proteinexpression.

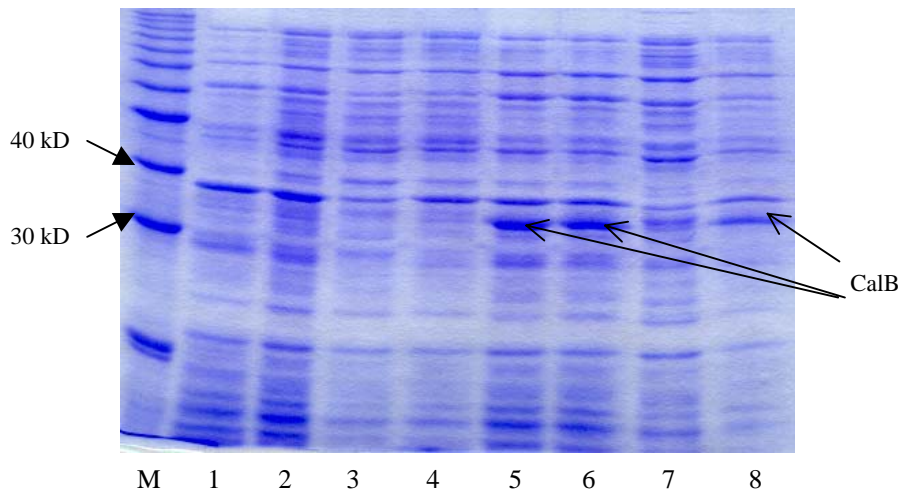


Abbildung 5.36: SDS-PAGE der CalB-Expression in *E.coli* Origami™.

M: 10 kD Proteinmarker

- 1: pUC18 Kontrollzellen, Zellysat, vor Induktion
- 2: pUC18 Kontrollzellen, Zellysat, 2h nach Induktion
- 3: pUC18 Kontrollzellen, 4h nach Induktion, lösliche Fraktion
- 4: pUC18 Kontrollzellen, 4h nach Induktion, unlösliche Fraktion
- 5: pUC18/calB, Zellysat, vor Induktion
- 6: pUC18/calB, Zellysat, 2h nach Induktion
- 7: pUC18/calB, 4h nach Induktion, lösliche Fraktion
- 8: pUC18/calB, 4h nach Induktion, unlösliche Fraktion

Die löslichen Fraktionen der pUC18/calB Zellysate wurden mit Hilfe der pH - stat Methode auf Aktivität bei der Hydrolyse von Tributyrin untersucht. Während in pUC18 Kontrollzellen keinerlei Aktivität nachgewiesen werden konnte, zeigten die CalB - Lysate eine spezifische Aktivität zwischen 2,7 und 3,2 U/mg.

Aus dem Ergebnis konnte geschlossen werden, dass sich von CalB abgeleitete Enzyme in *E.coli* Origami™ aktiv exprimieren lassen. Somit war ein Screening der Genbank in *E.coli* möglich.

5.5.2 Genbanksynthese

5.5.2.1 Planung der zugrundeliegenden Genbanksequenz

Die Festlegung der Sequenz für die von CalB abgeleitete Genbank basiert auf folgenden Voraussetzungen:

1. Ein Screeningsystem, welches die Untersuchung einer befriedigend großer Anzahl an Klonen erlaubt
2. Bestimmte Reste bzw. Regionen innerhalb von CalB sind unverzichtbar für die katalytische Aktivität des Enzyms
3. Andere Reste bzw. Regionen müssen zur Funktionalität ihre Grundeigenschaft (Hydrophobizität, Polarität etc.) beibehalten
4. Die übrigen Reste bzw. Regionen sind variabel
5. Der Degenerationsgrad innerhalb einer DNA - Sequenz erlaubt die korrekte Synthese der Genbank und die Funktionalität der resultierenden Proteine als Hydrolasen bei größtmöglicher Variabilität

1.:

Zum Screening der in *E.coli* exprimierten Genbank wurde der Tributyrin-Plattenassay gewählt. Diese Methode erlaubt das Screening mehrerer Tausend Klone am Tag ohne hohen Zeit - und Arbeitsaufwand, was die Durchmusterung auch großer Genbanken ermöglicht.

2. - 4.:

Die Bereiche des aktiven Zentrums, der Substratbindetasche, der Oxyanion - Bindetasche und anderer für die Aktivität entscheidender Bereiche in CalB wurden dem entsprechenden Eintrags der LED [2, 16, 233] entnommen. Diese Bereiche sollten konstant gehalten werden. Auch wichtige strukturgebende Aminosäurereste aus CalB, vor allem das Helix - brechende Prolin, wurden beibehalten. Um weitere, für die Funktionalität wichtige Bereiche zu identifizieren, wurde ein Sequenzalignment eines zentralen Sequenzbereichs von CalB mit dem entsprechenden Bereich der *Burkholderia cepacia* Lipase durchgeführt (Abb. 5.37). Bereiche innerhalb dieses Alignments, die in beiden Proteinen gewisse chemische Eigenschaften wie Hydrophobizität aufwiesen bzw. stets aromatische Reste enthielten, sollten in der geplanten Genbanksequenz die gleichen Eigenschaften aufweisen. Bereiche, die keine erkennbare Übereinstimmung zeigten und die auch keine bekannten strukturgebenden oder katalytischen Eigenschaften in CalB besaßen, sollten weitgehend variabel gehalten werden.

Dabei wurde bei Unklarheiten über die strukturelle oder katalytische Funktion der Aminosäurereste stets der entsprechende Rest aus CalB in die Genbanksequenz aufgenommen. Die DNA - Sequenz der Genbank wurde an die Codonpräferenz von *E.coli* und *P.pastoris* angepasst. So sollte sowohl die Expression im *E.coli* - Screeningsystem wie auch die möglicherweise später notwendige Expression in *P.pastoris* möglich sein.

```

CALB      LG--YTPCWISPPPFMLNDTQVN--TEYMVNAITALYAGSGNNKLPVLTWSQGGLVAQW
PCL       LQQNGATVYVANLSGFQSDDGPNRGEQLLAYVKTVLAATGATKVNLVGHSQGGLSSRY
Genbank   Lx--Y1PVW91PPP33x7D4QVN--TE439x394193AA1Gx4K9P9915SQGGLV145

CALB      GLTFFPSIRSKVDRLMAFAP-----DYKGTVLAGPLDALAVSAPSVWQQTGGSALTAL
PCL       VAAVAPDLVASVTTIGTPHRGSEFADFVQDVLAYDPTGLSSSVIAAFVNVFG-ILTSSS
Genbank   x3133P89914VDR9M1F3P-----D53x4VLA3PL41L12S9P195x42TGS3LT81x

CALB      RNAGGLTQIVPTTNLYSATDEIVQPQVSNSPLDSSYLFNGKNVQAQAVCGPLFVLDHAG
PCL       HNTN-QDALAALQTLTTARAATYNQNYPSAGLGAPGSCQTGAPTETVGGNTHLLYSWAG
Genbank   xN2xALtQ9VPx47LY1ATDEI37P43241PLx1SYx3423234x4991xPx9LDHAG

CALB      SLTSQFSYVVGR
PCL       TAIQPTLSVFGV
Genbank   43x7QFSxVVGR

```

Abbildung 5.37: Sequenzalignment der *C.antarctica* Lipase B (CalB) und der *Burkholderia cepacia* Lipase (PCL) und abgeleitete Genbanksequenz.

Das Alignment wurde mit dem Programm Clustal-X erzeugt. Die Farbgebung und Beschriftung innerhalb des Alignments entspricht den folgenden Regeln:

Sehr klein:	1	Aromatisch:	5	Positiv geladen:	9
Klein:	2	Aliphatisch:	6	Keine Ähnlichkeit	x
Unpolar:	3	Polar ungeladen:	7	Katalytische Reste:	rot unterlegt
Polar:	4	Klein + polar:	8	Konservierte Reste:	grau unterlegt
				Aus CalB übernommene Reste:	gelb unterlegt

5.:

Ein hoher Degenerationsgrad innerhalb der Genbank erhöht die Wahrscheinlichkeit, Klone mit vollkommen neuen Kombinationen von Eigenschaften, wie erhöhter Enantioselektivität und Thermostabilität, zu finden. Gleichzeitig steigt das Risiko von Primerfehlbindungen und damit von Deletionen und Insertionen während der Synthese, sowie ein Absinken der allgemeinen Aktivität [105]. Zur Verringerung des Degenerationsgrades und zur Vereinfachung der Synthese wurde daher nur der zentrale Sequenzabschnitt von CalB (AS 85 – AS 263) degeneriert; die flankierenden Bereiche blieben konserviert. Die Genbanksequenz zeigte somit einen Degenerationsgrad von 21,1 %. Die gewählte DNA - Sequenz der Genbank ist in Abb. 5.38 mit Markierung wichtiger Bereiche dargestellt. Die Codierung der degenerierten Codons ist in Tab. 5.11 veranschaulicht.

1	ATG	AAA	CTG	CTG	TCT	CTG	ACC	GGT	GTT	GCT	GGT	GTT	CTG	GCT	ACC	TGT	48
49	GTT	GCA	GCC	ACC	CCA	TTG	GTT	AAA	CGT	CTG	CCA	TCT	GGT	TCT	GAT	CCA	96
97	GCC	TTT	TCT	CAG	CCA	AAA	TCT	GTT	CTG	GAT	GCA	GGT	CTG	ACC	TGT	CAG	144
145	GGT	GCC	TCT	CCA	TCC	TCT	GTT	TCT	AAA	CCA	ATT	CTT	CTG	GTC	CCA	GGT	192
193	ACC	GGT	ACC	ACC	GGT	CCA	CAG	TCT	TTC	GAC	TCT	AAC	TGG	ATT	CCA	CTG	240
241	TCA	ACC	CAA	TTG	GSC	TAC	KSC	CCA	GTT	TGG	VBC	KSC	CCA	CCA	CCA	TDS	288
289	VYS	CWA	NRS	GAT	VMM	CAA	GTT	AAC	ACC	GAA	RAT	VYS	VBC	NRS	VYS	VBC	336
337	VMM	VBC	STC	TWC	GCC	GGC	WCC	GGT	NRS	VMM	AAA	VBC	CCA	VBC	VBC	VBC	384
385	TDS	TCT	CAG	GGT	GGT	CTG	GTC	KSC	VMM	TDS	VBC	VTS	VBC	VYS	VYS	CCA	432
433	VMM	VBC	ANA	KSC	VMM	GTT	GAC	CGC	VBC	ATG	GSC	TTC	KSC	CCA	GAT	TDS	480
481	VAT	KSC	VMM	GTT	CTG	GCC	GSC	CCA	CTC	VMM	KSC	CTG	KSC	VBC	TCT	VBC	528
529	CCA	KSC	VBC	TDS	VAA	VAA	VBC	ACC	GGT	TCT	GSC	CTG	ACC	VMM	KSC	VTS	576
577	NRM	AAC	VBC	KSC	GGT	CTA	ACC	CAA	MTC	GTC	CCA	VYS	VMM	NRS	CTG	TAC	624
625	WCC	GCC	ACC	GAT	GAA	ATT	VYS	NRS	CCA	VMM	VYS	KSC	VMM	KSC	CCA	CTG	672
673	VAT	GSC	TCC	TAC	VYS	VYS	VMM	VBC	VAC	VAC	VYS	VMM	KSC	VMM	VBC	VBC	720
721	KSC	KSC	CCA	CNC	TTC	STC	CTC	GAC	CAC	GCC	GGT	VMM	VTS	VYS	VMM	CAA	768
769	TTC	TCG	NRC	GTT	GTA	GGT	AGA	TCG	GCC	GTG	CGT	TCC	ACC	ACT	GGT	CAG	816
817	GCT	CGT	AGT	GCA	GAT	TAT	GGT	ATT	ACC	GAT	TGC	AAC	CCT	CTT	CCA	GCC	864
865	AAT	GAT	CTG	ACT	CCA	GAG	CAA	AAG	GTT	GCC	GCT	GCT	GCC	CTG	CTG	GCC	912
913	CCA	GCA	GCT	GCA	GCC	ATC	GTG	GCA	GGT	CCA	AAA	CAG	AAC	TGC	GAG	CCA	960
961	GAT	CTG	ATG	CCA	TAC	GCC	CGT	CCA	TTT	GCA	GTT	GGT	AAA	CGT	ACC	TGC	1008
1009	TCC	GGT	ATT	GTT	ACC	CCA	TGA										1029

Abbildung 5.38: DNA - Sequenz der Genbank.

Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *MunI* und *Eco52I* zur Klonierung des degenerierten Teils (schwarz) in den konservierten Teil (blau) sind unterstrichen. Startcodon ATG und Stopcodon TGA sind rot dargestellt.

Tabelle 5.11: Codierung und Degeneration der Genbank. Erfasst ist nur der innere, degenerierte Teil der Genbank (AS 85 – AS 263). Der Degenerationsgrad berechnet sich hier als Gesamtzahl der möglichen Aminosäuresequenzen, die sich aus den degenerierten Codons ergeben. Beispiel: Das Codon VAC codiert für drei Aminosäuren und kommt zweimal innerhalb der Sequenz vor. So ergibt sich allein auf Grund dieses Codons eine Variabilität von 3^2 oder $10^{0,954}$. Die Gesamtvariabilität berechnet sich als Produkt der Variabilitäten der einzelnen Codons.

Codon	codierte Aminosäuren	gemeinsame Eigenschaften	Variabilität	Anzahl innerhalb der Sequenz	Degene- rationsgrad
NRS	C W N Q S T Y K R H D E	H-Bindung	12	5	$10^{5,396}$
VYS	A V L I P Y F W M C	unpolar/hydrophob	10	12	10^{12}
VMM	N Q S T K R H D E	polar/hydrophil	9	17	$10^{16,222}$
NRC	N S Y C D G H R	polar+G	8	1	$10^{0,903}$
VBC	G A V L I P	aliphatisch	6	20	$10^{15,563}$
VTS	M I L V A	gering hydrophob	5	3	$10^{2,097}$
ANA	R K T I	R+K+T+I	4	1	$10^{0,602}$
KSC	G A S C	klein	4	16	$10^{9,632}$
CNC	R G P L	R+G+P+L	4	1	$10^{0,602}$
TDS	F W Y	aromatisch	3	5	$10^{2,386}$
VAT	N H D	polar	3	2	$10^{0,954}$
VAC	N H D	polar	3	2	$10^{0,954}$
GSC	A G	sehr klein	2	5	$10^{1,505}$
CWA	Q L	Q+L	2	1	$10^{0,301}$
RAT	N D	klein/polar	2	1	$10^{0,301}$
STC	V L	aliphatisch	2	2	$10^{0,602}$
WCC	T S	sehr klein/polar	2	2	$10^{0,602}$
MTC	I L	aliphatisch	2	1	$10^{0,301}$
konservierte Codons			1	83	10^0
Variabilität der gesamten Genbank					$10^{70,923}$

5.5.2.2 Primerdesign und Synthese

Die Synthese der Genbank erfolgte in zwei Teilschritten, der Synthese des inneren, degenerierten Bereichs und der Synthese des äußeren, konservierten Bereichs. Die konservierten Bereiche wurden analog zu 5.4.1 als künstliches Genfragment unter Verwendung der *Vent* DNA - Polymerase synthetisiert. Dabei waren die beiden 5' bzw. 3' des degenerierten Parts befindlichen Regionen durch eine Linkerregion verbunden, welche die Schnittstellen *MunI* und *Eco52I* zur Klonierung des inneren Teils in das äußere Genfragment enthielt (Abb. 5.39). Zur Klonierung des Fragments in den Vektor pUC18 wurden am 5' bzw. am 3' Ende die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *HindIII* mittels PCR angefügt. Die Sequenz des synthetischen Genfragments wurde durch Sequenzierung überprüft. Dabei wurde eine Punktmutation detektiert, welche durch eine „QuikChange“-Reaktion korrigiert wurde.

```

1      4fGGAATTCTCATATGAAACTGCTGTCTCTGACCGGTGTTGCTGGTGTCTGGCTACCTGTG      60
61     TTGCA3fGCCACCCCATTTGGTTAAAC4fGTCTGCCATCTGGTTCTGATCCAGCCTTTTCTCAG      119
120    2fCCAAAAATCTGTTCTGGATG3fCAGGTCTGACCTGTCAGGGTGCCTCTC1fCATCCTCTGTTT      177
178    CTAAACC2fAATTCTTCTGGTCCAGGTACCGGTACCACCG0fGTCCACAGTCTTTCGACTC1f      235
236    TAACTGGATTCCACTGTCAA0rCCCAATTGCTAAGCCTTAGCC0fCGGCCGTGCGTTCCACCA      294
295    1rCTGGTCAGGCTCGTAG0rTGCAGATTATGGTATTACCGATTGCAAC2rCCTCTTCCAGCCAA      352
353    TGATC1rTGACTCCAGAGCAAAAAGGTTGCCGCTGCTGCCCTGCT3rGGCCCCAGCAGCTGC2rA      410
411    GCCATCGTGGCAGGTCCAAAACAGAACTGCGA4rGCCAGATCTGATGCCA3rTACGCCCGTCC      469
470    ATTTGCAGTTGGTAAACGTACCTGCTCCGGTATTGTTACCCCATGAAAGCTTGGGG4r      525

```

Abbildung 5.39: Sequenz des äußeren, konservierten Genbankbereichs.

Die Schnittstellen zur Klonierung des äußeren Fragments in pUC18 sind rot (*EcoRI*) bzw. blau (*HindIII*) dargestellt. Die Schnittstellen zur Klonierung des degenerierten Fragments sind gelb (*MunI*) bzw. blau (*Eco52I*) unterlegt. Das 5'-Ende jedes Primers ist durch die korrespondierende Nummer in hochgestellter Schrift markiert, das 3'-Ende jeweils durch die entsprechende Nummer in tiefgestellter Schrift. Überlappende Bereiche sind unterstrichen. Start- und Stopcodon sind kursiv dargestellt.

Der innere, degenerierte Bereich wurde in 12 Oligonukleotide von 55 - 87 bp Länge aufgeteilt. Diese Oligonukleotide hatten überlappende Bereiche von 17 – 22 bp, die nur wenig degeneriert waren, um Primerfehlpaarungen zu minimieren (Abb. 5.40).

1	^{5F} CTGGGCTACKSCCCAGTTTGGVBCKSCCCACCACCATDSVYSCWANRSGATVMM ^{4f} <u>CAAGTT</u>	60
61	<u>AACACCGAARAT</u> _{5f} VYSVBCNRSVYSVBCVMMVBC ^{3f} STCTWCGCCGGCWCCGG _{4f} TNRSVMMAA	120
121	AVBCCCAVBCVBCVBCVCTDS ^{2f} <u>TCTCAGGGTGGTCTGGTC</u> _{3f} KSCVMMTDSVBCVTSVBCVYSVYS	180
181	CCAVMMVBCANAKSCVMM ^{1f} <u>GTTGACCGVCBCATGGSC</u> _{2f} TTCKSCCCAGATTDSVATKSCVMM	240
241	^{0f/0R} <u>GTTCTGGCCGSCCCACTC</u> _{1f} VMMKSCCTGKSCVBCTCTVBCCCAKSCVBCTDSVAAVAABV	299
300	<u>C</u> _{1r} <u>ACCGTTCTGSCCTGACC</u> ^{0f/0R} VMMKSCVTSNRMAACVBCKS _{2r} <u>CGGTCTAACCCAAMTCGTC</u>	357
358	<u>CCA</u> ^{1b} VYSVMMNRSCT _{3r} <u>GTACWCCGCCACCGATGAAATT</u> ^{2r} VYSNRSCCAVMMVYSKSCVMMKS	416
417	<u>4r</u> <u>CCCACTGVATGSCCTCTACVY</u> ^{3r} SVYSVMMVBCVACVACVYSVMMKSCVMMVBCVBCSKCKSC	477
478	CCACN _{5r} <u>CTTCSTCTCGACCACGCCGG</u> ^{4r} TVMMVTSVYSVMMCAATTCTCGNRCGTTGTAGGTA	538
539	GA ^{5r}	540

Abbildung 5.40: Sequenz des inneren, degenerierten Genbankbereichs.

Das 5'-Ende jedes Primers ist durch die korrespondierende Nummer in hochgestellter Schrift markiert, das 3'-Ende jeweils durch die entsprechende Nummer in tiefgestellter Schrift. Überlappende Bereiche sind unterstrichen.

Die Synthese erfolgte unter Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase mittels fünf aufeinanderfolgender PCR - Reaktionen (s. 8.2.1.3.4). Als primäres Templat dienten die hybridisierten Oligonukleotide 0-fw und 0-rev. Abb. 5.41 zeigt ein Agarosegel mit den Zwischenprodukten der Synthese des degenerierten Bereichs.

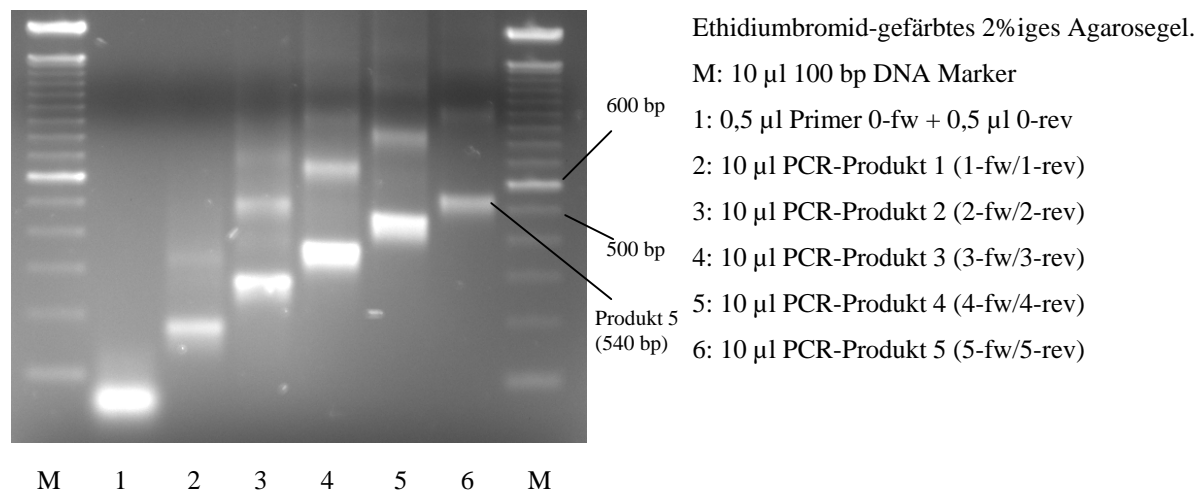


Abbildung 5.41: Zwischenprodukte der Genbanksynthese.

In Spuren 2 – 6 wurden aufgereinigte PCR - Produkte aufgetragen.

Mit der letzten PCR-Reaktion wurden dem Fragment die Restriktionsschnittstellen *MunI* und *Eco52I* zur späteren Klonierung angefügt. Nach erfolgter Synthese wurde das Genbank -

Fragment durch T/A-Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO Vektor kloniert und zwölf Klone exemplarisch sequenziert. Zehn der Klone (83 %) enthielten zumindest ein zusätzliches Stopcodon. Zehn Klone (83 %) enthielten Deletionen und zwei der Klone (17 %) besaßen alle Reste der katalytischen Triade.

5.5.2.3 Optimierung der Genbanksequenz

Die in manchen der sequenzierten Klone enthaltenen Deletionen waren auf Primerfehlbindungen während der PCR zurückzuführen. Daher wurden in einem zweiten Ansatz stringenter Annealingbedingungen gewählt. So wurden „touch down“ PCR-Reaktionen durchgeführt, wobei die Annealingtemperatur im ersten Zyklus 15°C über der Schmelztemperatur der Oligonukleotide gewählt wurde. Nach schrittweisem Verringern der Annealing - Temperatur um 1°C pro Zyklus wurde nach zehn Zyklen konstant 5°C über der Oligonukleotidschmelztemperatur gearbeitet. Zudem wurde dem Reaktionsansatz DMSO zugesetzt, um die Spezifität der Primer zu erhöhen. Zusätzlich wurde die Synthese mit der *Vent* DNA-Polymerase durchgeführt, die im Unterschied zur *Taq* DNA-Polymerase Korrekturlesefunktion besitzt. Dadurch sollte der fehlerhafte Einbau von Basen und somit das Auftreten weiterer unbeabsichtigter Mutationen und Stopcodons verhindert werden. Nach erfolgter Synthese wurden wiederum T/A - Klonierungen durchgeführt und dreizehn Klone exemplarisch sequenziert. Vier der Klone enthielten Deletionen (31 %), wohingegen acht Klone (62 %) alle Reste der katalytischen Triade aufwiesen. Diese Werte spiegeln eine deutliche Verbesserung gegenüber dem ersten Syntheseansatz wieder.

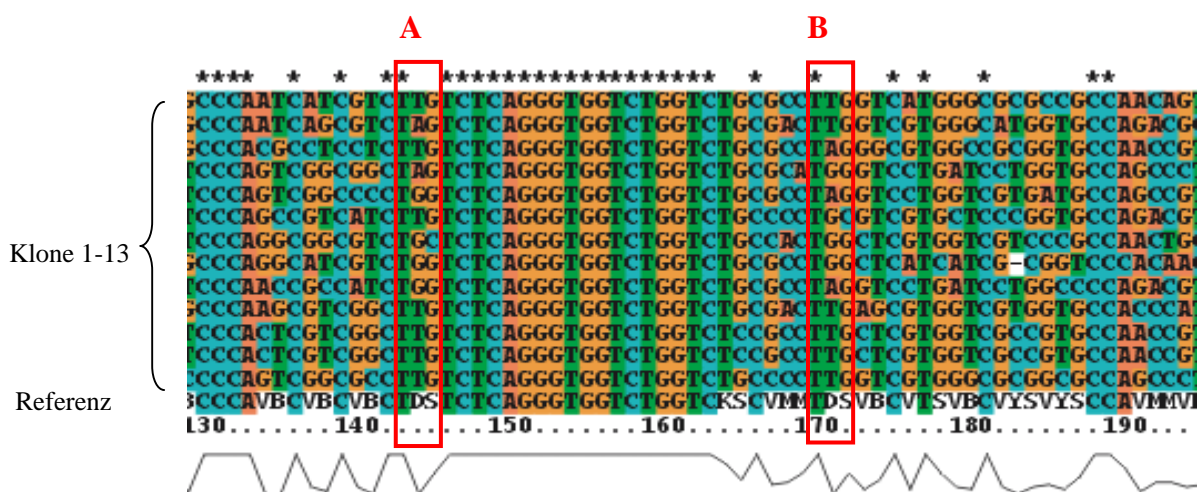


Abbildung 5.42: Ausschnitt eines multiplen Sequenzalignments einiger verbesserter Genbankklone.

Dargestellt sind 13 sequenzierte Klone und die Referenzsequenz der Genbank. Positionen A und B zeigen in der Referenzsequenz das Codon TDS. Das Alignment wurde mit dem Programm Clustal-X erzeugt.

Abb. 5.42 zeigt einen Ausschnitt eines multiplen Sequenzalignments der sequenzierten Klone. Abgebildet ist der Sequenzraum um das katalytisch aktive Serin. Eine nähere Betrachtung der Sequenzen ergab, dass trotz der genannten Verbesserungen zwölf von dreizehn Klonen (92%) zumindest ein zusätzliches Stopcodon enthielten. Über 90 % der zusätzlichen Stopcodons befanden sich an Positionen, die in der Genbank die aromatischen Aminosäuren Trp, Phe oder Tyr codieren sollten. Diese Aminosäuren waren in der degenerierten Sequenz an den jeweiligen Positionen durch das Codon TDS repräsentiert, das neben den für Aminosäuren codierenden Sequenzen auch das Ambercodon TAG beinhaltet. In einem weiteren Syntheseansatz wurden daher alle TDS Codons durch TGG (Trp) oder TWC (Phe/Tyr) ersetzt. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in 8.1.6 aufgeführt (Genbank_xf/rev_2). Die Sequenzierung einiger Klone ergab, dass keiner der aromatischen Reste in der optimierten Genbank durch ein Stopcodon ersetzt wurde. Abb. 5.43 zeigt ein multiples Sequenzalignment aus 3 exemplarisch untersuchten Genbankklonen und der entsprechenden Sequenz aus CalB-Wt.

```

12      FCYSPVWAGPPPFMLRDAQVNTEDI IGVVPTVVFAGTGWKKVP IRVWSQGGLVGA FIMVVT
17      LGYCPVWGCPPPPTLKDAQVNTENAI_VIAALYAGSGGDKVPLVRWSQGGLVGPLVVRAI
9       LGYCPVWVCPPPFTQQDAQVNTENITGALAVVFAGSGEHKLPVVVWSQGGLVCEWVMGVA
CalB   LGYTPCWISPPPFMLNDTQVNT EYMVNAITALYAGSGNNKLPVLTWSQGGLVAQWGLTFF
      : * * *   ***: .*:*****      :.:***:* . * *   *****      :
Ref    lxyxpvwxxpppxxxxxdxqvntexxxxxxxxxxxxagxgxxkxpxxxxwsqggglvxxxwxxxxx

12      PHRIGAVDRVMGFGPDFDCEVLGAGPLTCLSVSVPSLWQQVTGSALTPGLCNPAGLTQQLVP
17      PAIICAVDRVMGFGPDFDQVLAGPLKCLCSSVPGVWEEVTGSALTTAMSNLAGLTQQLVP
9       PAVRCPVDRVMGFGPDFDCTVLGAGPLQCLCVSTPGIWEQVTGSGLTKALRNAGLTQIVP
CalB   PSIRSKVDRLMAFAPDYKGTVLGAGPLDALAVSAPSVWQQTGSALTTALRNAGGLTQIVP
      *   ***  *. *  **:.  *****  *.  *.  *.  *:.  ****. **  .  *  *****: **
Ref    pxxxxxvdrxmxfxpdxxxxv laxplxxlxxsxpwxwxxxxtgsxltxxxxnxgltqxvp

12      ANSLYTATDEIHPDIIATAPLHAS YTPQVNNPKATTTASPPFLLDHAGQITQQFSNVVGR
17      PENLYTATDEIAKPEPGTSPLNASYMAEPNNANATTTAGPHFLLDHAGKITKQFSNVVGR
9       TKNLYSATDEIAKPNIAKSPLNASYIMT'TNNADAEP'TAGPLFLLDHAGTLLEQFSRVVGR
CalB   TTNLYSATDEIVQPQVNSPLDSSYLFNGKNVQAQAVCGPLFVIDHAGSLTSQFSYVVGR
      **:* *****  . *      .      . . . * * : : *****      ***  ****
Ref    xxxlyxatdeixpxxxxxplxxsyxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxpxfxldhagxxxxqfsxvvgr

```

Abbildung 5.43: Multiples Sequenzalignment dreier Klone der zweiten verbesserten Genbank und CalB-Wt.

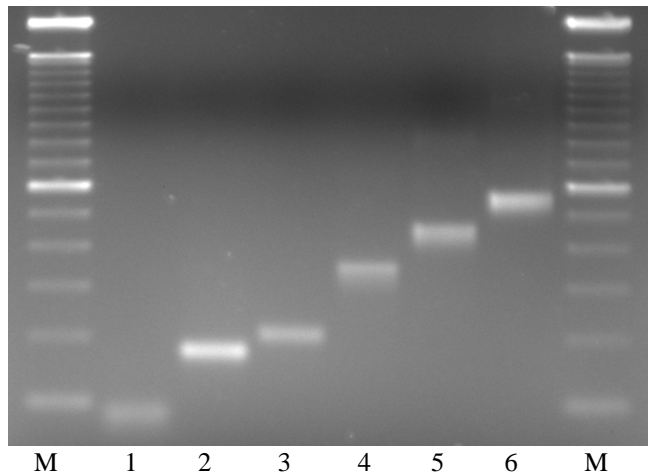
Das Alignment wurde mit dem Programm Clustal-X erzeugt. CalB-Wt Sequenz ist in blau, die konservierten Bereiche um das katalytische Serin, Aspartat und Histidin sind rot dargestellt. Variationen innerhalb der Klone, welche nicht der Referenzsequenz entsprachen, sind rosafarben unterlegt; Aminosäuren, die in allen Klonen trotz Variationen in der Referenzsequenz konserviert waren, wurden gelb unterlegt.

Eine Untersuchung der Sequenzähnlichkeit zwischen den Klonen ergab, dass die Sequenzidentität der Klone in einem Bereich zwischen 58,4 und 64,3 % lag, während die Sequenzidentität zu CalB-Wt mit 47,5 - 56,1 % geringer ausfiel (Tab. 5.12). Die berechneten Werte beziehen sich nur auf den degenerierten inneren Teil der Genbank. Eine Ausdehnung auf die gesamte Sequenz ergibt Identitäten von 78,4 - 81,3 % (Klon - Klon) bzw. 72,5 - 76,9 % (Klon - CalB).

Tabelle 5.12: Sequenzähnlichkeit einiger Klone der zweiten verbesserten Genbank und CalB Wt. Gegeben ist die Sequenzidentität innerhalb des degenerierten Bereichs (schwarz) bzw. der gesamten Genbank (blau) in %.

	Klon 5		Klon 17		Klon 9		CalB	
Klon 12	60,9	79,5	62,1	80,1	58,4	78,4	47,5	72,5
Klon 5			61,7	79,8	62,1	80,1	50,2	74,0
Klon 17					64,3	81,3	53,6	75,7
Klon 9							56,1	76,9

Während die Klone eine deutlich geringere Fehlerrate aufwiesen als die Klone des ersten Syntheseansatzes, zeigte ein relativ hoher Anteil immer noch Fehler in Form von Deletionen und Stopcodons. Daher wurde im nächsten Syntheseansatz (Oligonukleotide in 8.1.6: Genbank_xf/rev_3) das degenerierte Codon NRM, welches ebenfalls die Stopcodons TAA (Ochre) und TGA (Opal) codiert, durch das an dieser Position in CalB befindliche CGT (Val) ersetzt. Zusätzlich wurde der Degenerationsgrad der Genbank durch Konservierung zusätzlicher Aminosäurereste herabgesetzt. Insbesondere alle Cysteine in CalB, welche bei der Bildung von Schwefelbrücken beteiligt sind, wurden konserviert. Mit dem letzten PCR - Schritt wurden zusätzlich die Restriktionsschnittstellen *MunI* und *Eco52I* zur späteren Klonierung an das 5' bzw. 3' Ende des Fragments angefügt. Die Zwischenprodukte der Synthese sind in Abb. 5.44 dargestellt. Abb. 5.45 zeigt die gewählte optimierte Genbanksequenz, Tab. 5.13 gibt eine Übersicht über den Degenerationsgrad.



Ethidiumbromid gefärbtes 2%iges Agarosegel.

M: 10 µl 100 bp DNA Marker

1: 10 µl PCR-Produkt 1 (0-fw/0-rev)

2: 10 µl PCR-Produkt 2 (1-fw/1-rev)

3: 10 µl PCR-Produkt 3 (2-fw/2-rev)

4: 10 µl PCR-Produkt 4 (3-fw/3-rev)

5: 10 µl PCR-Produkt 5 (4-fw/4-rev)

6: 10 µl PCR-Produkt 6 (5-fw/5-rev)

Abbildung 5.44: Zwischenprodukte der Synthese des endgültigen optimierten degenerierten Fragments.

In Spuren 1 – 6 wurden aufgereinigte PCR - Produkte aufgetragen..

1	GGT CCA CAA TTG GSC TAC KSC CCA <u>TGT</u> TGG VBC KSC CCA CCA CCA <u>TWC</u>	48
49	VYS <u>CTG AAC</u> GAT VMM CAA GTT AAC ACC GAA RAT VYS VBC NRS VYS VBC	96
97	VMM VBC STC TWC GCC GGC WCC GGT NRS VMM AAA VBC CCA VBC VBC VBC	144
145	<u>TGG</u> TCT CAG GGT GGT CTG GTC KSC VMM <u>TGG</u> VBC VTS VBC VYS VYS CCA	192
193	VMM VBC ANA KSC VMM GTT GAC CGC VBC ATG GSC TTC KSC CCA GAT <u>TWC</u>	240
241	VAT KSC <u>ACC</u> GTT CTG GCC GSC CCA CTC VMM KSC CTG KSC <u>GTT</u> TCT VBC	288
289	CCA KSC <u>GTT TGG</u> VAA <u>CAG</u> VBC ACC GGT TCT GSC CTG ACC VMM KSC VTS	336
337	<u>CGT</u> AAC VBC KSC GGT CTA ACC CAA MTC GTC CCA VYS VMM NRS CTG TAC	384
385	WCC GCC ACC GAT GAA ATT <u>GTT</u> NRS CCA VMM VYS KSC VMM KSC CCA CTG	432
433	VAT GSC TCC TAC VYS VYS VMM VBC VAC VAC VYS VMM KSC VMM VBC VBC	480
481	<u>TGT</u> KSC CCA CNC TTC STC CTC GAC CAC GCC GGT VMM VTS VYS VMM CAA	528
529	TTC TCG NRC GTT GTA GGT AGA TCG GCC GGA GAG	561

Abbildung 5.45: Sequenz des optimierten degenerierten Genbankfragments.

Änderungen zur ursprünglichen Sequenz sind unterstrichen. Die Schnittstellen zur Klonierung in das äußere konservierte Fragment sind gelb (*Mun*I) bzw. blau (*Eco*52I) unterlegt.

Tabelle 5.13: Codierung und Degeneration der optimierten Genbank. Erfasst ist nur der innere, degenerierte Teil der Genbank (AS 85 – AS 263).

Codon	codierte Aminosäuren	gemeinsame Eigenschaften	Variabilität	Anzahl innerhalb der Sequenz	Degene- rationsgrad
NRS	C W N Q S T Y K R H D E	H-Bindung	12	4	$10^{4,317}$
VYS	A V L I P Y F W M C	unpolar/hydrophob	10	11	10^{11}
VMM	N Q S T K R H D E	polar/hydrophil	9	16	$10^{15,268}$
NRC	N S Y C D G H R	polar+G	8	1	$10^{0,903}$
VBC	G A V L I P	aliphatisch	6	18	$10^{14,007}$
VTS	M I L V A	gering hydrophob	5	3	$10^{2,097}$
ANA	R K T I	R+K+T+I	4	1	$10^{0,602}$
KSC	G A S C	klein	4	15	$10^{9,031}$
CNC	R G P L	R+G+P+L	4	1	$10^{0,602}$
VAT	N H D	polar	3	2	$10^{0,954}$
VAC	N H D	polar	3	2	$10^{0,954}$
TWC	F Y	aromatisch	2	3	$10^{0,903}$
GSC	A G	sehr klein	2	5	$10^{1,505}$
RAT	N D	klein/polar	2	1	$10^{0,301}$
STC	V L	aliphatisch	2	2	$10^{0,602}$
WCC	T S	sehr klein/polar	2	2	$10^{0,602}$
MTC	I L	aliphatisch	2	1	$10^{0,301}$
konservierte Codons			1	98	10^0
Degenerationsgrad gesamt					$10^{63,949}$

Eine Sequenzierung einiger optimierter Klone ergab, dass hier keine Stopcodons anstelle von Aminosäuren eingebaut wurden. Wenige Klone enthielten dennoch zusätzliche Stopcodons als Resultat von Deletionen einzelner Basen und daraus resultierender Leserasterverschiebung. Hierbei konnte nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass es sich um Sequenzierfehler handelte. Abb. 5.46 zeigt ein multiples Sequenzalignment aus fünf exemplarisch untersuchten Klonen der optimierten Genbank und der entsprechenden Sequenz aus CalB-Wt.

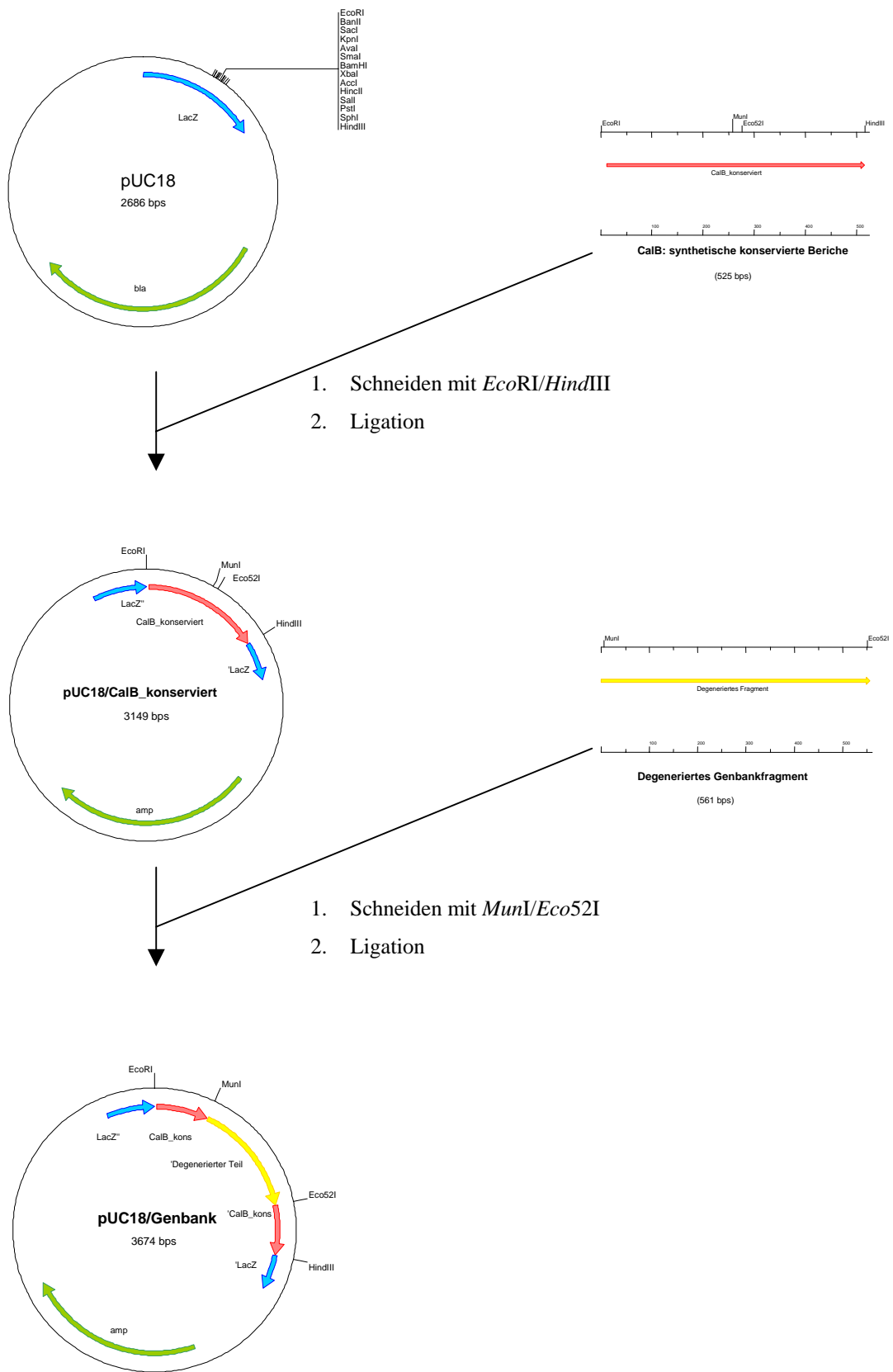


Abbildung 5.47: Klonierungsschema der Genbank.

5.5.4 Screening der Genbank

Das Screening nach aktiven Klonen wurde auf Tributyrin - Agarplatten, versetzt mit IPTG zur Induktion und Ampizillin zur Selektion, durchgeführt. Das Wachstum der Klone erfolgte 24 Stunden bei 30°C, gefolgt von weiteren 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur. Keiner der ca. 19000 gescreenten Klone zeigte detektierbare Lipaseaktivität.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, durch verschiedene Vorgehensweisen wie gezielte Klonierung, Gensynthese, gerichtete Evolution bzw. rationales Proteindesign einen geeigneten Biokatalysator für die enzymatische Resolution der Modellsubstrate 1-Methoxy-2-Propanol (MP) bzw. 1-Methoxy-2-Propanolacetat (MPA) zu erhalten und die Praktikabilität der einzelnen Vorgehensweisen zu vergleichen. Das so erhaltene Enzym sollte das Potenzial zum Einsatz in der chemischen Industrie haben, was hohe Anforderungen sowohl an Enantioselektivität wie auch an die Prozessstabilität eines Biokatalysators stellt.

6.1 Screening vorhandener Enzyme

Zur Identifizierung möglicher Ausgangsenzyme für die gezielte bzw. zufällige Mutagenese wurden mehrere kommerzielle und rekombinant am Institut für technische Biochemie vorliegende Enzyme auf ihre Aktivität und Enantioselektivität in der Hydrolyse von MPA getestet.

Dabei zeigte sich, dass der Umsatz von MPA bei fast allen getesteten Enzymen weit unter dem Umsatz für Tributyrin lag (Tab. 5.1). Dies galt auch für die meisten der getesteten Esterasen, bei denen man einen höheren Umsatz für das kleine, hydrophile Substrat MPA erwarten würde. Eine Ausnahme bildeten hierbei die Lipase aus *Geotrichum candidum* und die Schweineleberesterase; beide Enzyme zeigten einen im Verhältnis höheren Umsatz von MPA. Insgesamt zeigten alle Enzyme jedoch nur geringe Aktivitäten gegen MPA; die höchsten Werte wurden von *Candida antarctica* Lipase B (CalB) erreicht (19,8 U/mg), gefolgt von *Bacillus subtilis* pNB Esterase (Wt) (14 U/mg).

Nur fünf der getesteten Enzyme mit messbarer Aktivität gegen MPA zeigten nachweisbare Enantioselektivität, wobei stets das *R*-Enantiomer bevorzugt wurde (Tab. 5.2). CalB zeigte einen *E* - Wert von über 100, was den Ergebnissen von Baumann und DOW Chemical entsprach [32, 37-39]. *Burkholderia cepacia* Lipase, die nur einen geringen Umsatz von MPA zeigte (1,7 U/mg), besaß die nach CalB höchste Enantioselektivität mit einem *E* - Wert von 6,6. Baumann bestimmte den *E* - Wert dieser Lipase bei der Hydrolyse von MPA mit 8,0, wobei diese geringe Abweichung auf Messungenauigkeiten, verursacht durch den geringen Umsatz des Enzyms zurückzuführen sein könnte [38]. Industrielle Anwendung finden meist nur enzymatische Umsetzungen mit *E* - Werten über 100, wobei bei *E* - Werten > 20 von einer theoretischen Nutzbarkeit einer enzymatischen Resolution nach

Biokatalysatoroptimierung ausgegangen wird [13]. Von den getesteten Enzymen entsprach somit nur CalB den Mindestanforderungen an einen Biokatalysator zur Enantiomerentrennung von MPA, so dass auf eine weitere Optimierung der verbleibenden Enzyme durch Methoden der gezielten oder zufälligen Mutagenese in dieser Arbeit verzichtet wurde.

6.2 Expression, Aufreinigung und Charakterisierung einer

Lipase aus *Archaeoglobus fulgidus*

Ein oft einfacher und erfolgversprechender Ansatz zur Identifizierung eines im Sinne der Fragestellung geeigneten Biokatalysators ist die gezielte Klonierung von unbekanntem Enzymen aus vielversprechenden Organismen, aus denen bereits Enzyme mit interessanten Eigenschaften charakterisiert wurden.

Manco *et al.* klonierten und charakterisierten eine Esterase des hyperthermophilen, sulfatreduzierenden Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* [1]. Dieses Enzym war bei Raumtemperatur kaum aktiv, zeigte jedoch starke Aktivität und Stabilität bei 80°C. Die höchsten Enantioselektivitäten wurden hierbei bei der Hydrolyse aliphatischer sekundärer Alkohole erreicht. Diese Eigenschaften prädestinieren ein solches Enzym für den industriellen Einsatz und machen es auch im Sinne der in dieser Arbeit bearbeiteten Fragestellung interessant.

Das Genom von *Archaeoglobus fulgidus* enthält einen offenen Leserahmen (AF1763), der als putative Lipase (*lipA*) annotiert wurde [204]. Diese sollte aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse bei der Charakterisierung der Esterase dieses Organismus in dieser Arbeit charakterisiert werden.

6.2.1 Expression und Aufreinigung von LipA

Die funktionelle Expression von LipA in *E.coli* DH5 α konnte etabliert werden. Die SDS-PAGE zur Kontrolle der Lipaseproduktion zeigte eine deutliche Lipasebande im erwarteten Bereich von 52,8 kD (Abb. 5.2). Auffällig war hierbei, dass die Gesamtmenge an exprimierter Lipase bereits 70 min nach Induktion ihr Maximum erreicht hatte, welches bis zum Ende der Expression aufrechterhalten wurde. Das Fehlen einer Expressionssteigerung könnte möglicherweise auf eine Schädigung der *E.coli* Zellen durch die Expressionstemperatur von

42°C zurückzuführen sein. Auch eine Degradation der Lipase ist nicht auszuschließen. Die SDS-PAGE der Expression zeigt zwar keine eindeutigen Degradationsprodukte, gleichwohl wären diese in Anbetracht der geringen Expressionsrate von LipA nur schwer nachweisbar. Durch eine zweistufige Strategie mit Ammoniumsulfatfällung und Affinitätschromatographie gelang es, LipA zur Homogenität aufzureinigen (Abb. 5.3). Die spezifische Aktivität betrug nach Aufreinigung 10156 U/mg (gegen 32 U/mg im Zellrohextrakt), was einem Reinigungsfaktor von 317 entsprach (Tab. 5.3). Die Ausbeute an aktivem Protein betrug 22,3%. Die scheinbar geringere Ausbeute nach $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung mit 13,1 % könnte auf inhibierende Wirkungen des noch in Lösung befindlichen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zurückzuführen sein. Die Proteinausbeute nach der Aufreinigung fiel mit 192 µg gering aus, was auf die schwache Expression der Lipase in *E.coli* und auf die mögliche Denaturierung während des Aufreinigungsprozesses zurückzuführen sein dürfte.

6.2.2 Homologiesuche und Sequenzanalyse

LipA weist nur geringe Sequenzsimilarität zu anderen bekannten Lipasen und Esterasen auf. Von den 474 Aminosäuren von LipA überlagern nur 215 Aminosäuren mit dem Enzym mit der höchsten Ähnlichkeit zu LipA, der Lipase aus *Bacillus* sp. B26. Doch selbst innerhalb dieser überlappenden Region besteht nicht mehr als 28 % Sequenzidentität. 2004 veröffentlichten Kim *et al.* ein Mikroorganismenscreening, in Rahmen dessen auch LipA aus *A.fulgidus* beschrieben wurde. In dieser Arbeit wurde ebenfalls von einer Homologie zu Lipasen der *Bacillus subtilis* Familie berichtet [263]. Mit Hilfe eines multiplen Sequenzalignments von LipA und einigen *Bacillus* Hydrolasen mit Sequenzhomologie zu LipA konnten die potentiell an der katalytischen Triade von LipA beteiligten Aminosäuren identifiziert werden (Abb. 5.1). Während sich Ser136 und His210 genau mit den katalytischen Resten der *Bacillus* Enzyme überlagern ließen, fanden die in der LipA - Sequenz vorhandenen Aspartate keine Überlagerung mit den Protonenakzeptoren der *Bacillus* Hydrolasen. Die anhand dieses Sequenzvergleichs generierten Mutanten S136C, D163N und H210N zeigten einen fast vollständigen Verlust ihrer hydrolytischen Aktivität, während die Mutante D169N eine Restaktivität von über 50 % beibehielt. Allerdings besitzen viele Lipasen als Protonenakzeptor einen Glutamatrester statt eines Aspartatrests. So lassen sich in Abb. 5.1 zwei Glutamatrester von LipA, Glu193 und Glu194, direkt mit dem katalytischen Aspartat der *Bacillus* Enzyme überlagern. Während also Ser136 und His210 mit hoher Sicherheit als katalytische Reste von LipA identifiziert werden konnten, müssten zur sicheren

Identifizierung des Protonenakzeptors weitere Versuche durchgeführt werden. Während Asp169 anhand der hohen Restaktivität seiner Mutante wohl ausgeschlossen werden kann, scheint auch Asp163 trotz des fast vollständigen Aktivitätsverlusts seiner Mutante eher nicht an der katalytischen Triade beteiligt zu sein. Der Abstand von Asp163 zum nukleophilen Serin innerhalb der LipA - Sequenz wäre mit nur 27 Aminosäuren deutlich geringer als in allen anderen beschriebenen Lipasen [2, 15, 16]. Der Verlust an Aktivität in Mutante D163N könnte somit auf eine strukturelle Funktion von Asp163 innerhalb von LipA hinweisen. Da die Messungen nicht mit aufgereinigtem Enzym, sondern mit Zellrohextrakt durchgeführt wurden, ist jedoch auch eine unzureichende Expression der Mutante nicht auszuschließen.

Die Sekundärstrukturanalyse von LipA ergab ein weitgehend mit den untersuchten *Bacillus* Lipasen übereinstimmendes Muster der α/β - Hydrolasefaltung innerhalb der N - terminalen Hälfte von LipA. Auffällig ist ein langer Loopbereich in LipA (AS 61 - 94), der keine Entsprechung in den *Bacillus* Enzymen findet (Abb. 5.1). Aufgrund seiner Sekundärstruktur, welche aus Loopregion, β - Faltblattregion und nur wenigen α - helicalen Bereichen besteht, ist jedoch eine Funktion dieser Domäne als „lid“ eher unwahrscheinlich, so dass bei LipA, wie auch bei den *Bacillus* Lipasen, keine Grenzflächenaktivierung stattfinden dürfte.

Die N - terminale Domäne von LipA, die etwa die Hälfte des gesamten Enzyms ausmacht, enthält alle Aminosäuren der katalytischen Triade. Die C - terminale Hälfte der Lipase zeigte keinerlei Homologie zu bekannten Proteinen oder Proteinfragmenten der durchsuchten Datenbanken. Der in dieser Arbeit generierten verkürzten Mutante Y244stop fehlte der gesamte C - terminale Teil von LipA. Trotzdem konnte hier signifikante Lipaseaktivität nachgewiesen werden. Eine Untersuchung der Sekundärstrukturelemente der C - terminalen Domäne von LipA zeigte, dass das α/β - Hydrolasefaltungsmuster der N - terminalen Hälfte des Enzyms hier unterbrochen war (Abb. 5.1), so dass davon ausgegangen werden kann, dass dieser C - terminale Part nicht ausschliesslich zur Funktion des Enzyms als Lipase beiträgt.

Über die Funktion dieser C - terminalen Domäne von LipA kann aufgrund der Ergebnisse nur spekuliert werden. In Anbetracht der geringen Thermostabilität des Enzyms ist eine Funktion von LipA als extrazelluläre Lipase auszuschliessen, so dass eine Funktion der C - terminalen Domäne als Signalsequenz sehr unwahrscheinlich ist. Auch finden sich Signalsequenzen meist am N - Terminus der entsprechenden Proteine. Vorstellbar wäre eine Funktion dieser Domäne als Bindedomäne für spezifische stabilisierende Faktoren wie das unlängst in *Archaeoglobus fulgidus* isolierte kompatible Solut Diglycerolphosphat (DGP) [195]. Für eine solche Funktion spräche die geringe Thermostabilität der aufgereinigten Lipase. Auch die Koaggregation von Proteinen kann sich positiv auf ihre Stabilität auswirken, so dass auch eine

Funktion des C - terminalen Bereichs als Dimerisierungsdomäne nicht ausgeschlossen werden kann. Auch eine Funktion als Chaperone - Bindedomäne wäre denkbar.

Anhand der Aminosäuresequenz um das N - terminale, an Bildung der Oxyanion - Bindetasche beteiligte Leucin konnte die Lipase in die GX - Hydrolaseklasse eingeordnet werden. Aufgrund der sequenzspezifischen Eigenheiten von LipA lies sich dieses Enzym jedoch nicht in eine der postulierten Superfamilien einordnen [2]. Bis heute wurden nur wenige Lipasen aus *Archaea* beschrieben, was eine mögliche Erklärung für den Mangel an signifikanter Sequenzähnlichkeit von LipA zu anderen Enzymen sein könnte.

6.2.3 Charakterisierung von LipA

Aufgrund seines Substratspektrums (Tab. 5.4) war LipA eher als Carboxylesterase denn als Lipase zu bezeichnen, was sich mit den Ergebnissen der Sequenzanalyse von LipA deckte, wonach diesem Enzym eine ausgeprägte „lid“-Struktur fehlten dürfte (s. 6.2.2). Auch kann wohl von einer gewissen Limitierung des Platzes in der Substratbindetasche von LipA ausgegangen werden, wie schon für die Rinder-Palmitoylproteinthioesterase-1 [235] beschrieben. So hatte das Serin - modifizierende Reagenz Phenylmethansulfonfluorid (PMSF) bis zu einer Konzentration von 10 mM keinen inhibierenden Effekt auf die Aktivität von LipA (Ergebnisse nicht dargestellt). Nichtsdestotrotz wurden die großen Substrate p-Nitrophenylpalmitat (pNPP), Tributyrin und Phenylacetat hydrolysiert. Eine räumliche Limitierung der Substratbindetasche kann also nicht der einzige Faktor sein, der die Spezifität des Enzyms beeinflusst. So könnte die Anwesenheit eines geladenen Substituenten einen entscheidenden Effekt auf die Aktivität von LipA haben, was erklären würde, warum die Hydroxy - substituierten Buttersäureester nicht umgesetzt wurden und das Sulfoxy - substituierte PMSF keinen inhibierenden Einfluss auf das Enzym zeigte. Die Ergebnisse des Substratscreenings stimmen nur teilweise mit denen von Kim *et al.* überein. Zwar wurde LipA auch hier als Carboxylesterase beschrieben; Tributyrin wurde hierbei jedoch im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit nicht umgesetzt [263]. Die Abweichungen innerhalb der Substratspektren sind wohl vor allem auf abweichende Reaktionsbedingungen zurückzuführen. In der zitierten Arbeit wurde die Aktivität gegen Tributyrin nur mittels eines Tributyrin - Plattenassays ermittelt, wobei weder die hierbei verwendete Inkubationstemperatur noch der pH - Wert des Mediums angegeben wurde, die, wie in dieser Arbeit gezeigt, erheblichen Einfluss auf die Aktivität von LipA haben. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich auch ein großer Unterschied zwischen den mit Zellrohextrakt und den mit

aufgereinigtem Enzym vorgenommenen Messungen. MPA wurde von LipA nicht hydrolysiert, weswegen eine Nutzung des Enzyms zur Enantiomerentrennung dieses Substrats ausgeschlossen werden musste.

LipA zeigte eine maximale Aktivität bei ca. 70°C (Abb. 5.5). Das Temperaturoptimum dieser Lipase lag somit unter der für andere Enzyme aus *Archaeoglobus fulgidus* bestimmten optimalen Temperatur wie die für die Carboxylesterase (AFEST) bestimmten 80°C [1] oder die für die Deoxyinosin-spezifische Endonuclease angegebenen 85°C [236]. Andererseits zeigte das RadA Protein aus *A.fulgidus* seine optimale Aktivität bei 60 - 70°C [199].

Im Gegensatz zu der Carboxylesterase AFEST, die auch bei Inkubation bei 85°C nach einer Stunde noch über 50 % Restaktivität zeigte [1], konnte für LipA keine Langzeitstabilität bei 80, 60 und sogar bei 40°C detektiert werden (Abb. 5.6). Beide Enzyme zeigen sehr unterschiedliche physikalische Eigenschaften, welche sich in ihrer geringen Sequenzhomologie und abweichender Aminosäurezusammensetzung widerspiegelt. Aus einem Vergleich der Kristallstrukturen von AFEST, der Brefeldin Esterase A und EST2 aus *A.acidocaldarius* wurde gefolgert, dass ein Hauptgrund für die höhere Thermostabilität von AFEST in dem erhöhten Anteil von in α - Helices (43,1 %) und β - Strängen (21,5 %) organisierten Aminosäuren zu finden ist. Zusätzlich waren die Loopregionen von AFEST im Vergleich zu anderen Hydrolasen reduziert [237]. Im Gegensatz dazu sind bei LipA eine signifikant geringere Menge an Aminosäuren in α - helikalen Elementen organisiert (20 - 33 % α - Helices, 22 - 31 % β - Stränge). Diese Ergebnisse variieren jedoch weit je nach verwendetem Programm zur Sekundärstrukturvorhersage. Im Vergleich zu AFEST besitzt LipA eine geringere Menge an geladenen Aminosäureresten, was auf eine reduzierte Anzahl der internen Ionenbindungen hinweisen könnte. Neben diesen intrinsischen Faktoren könnten auch äußere Faktoren bei der Stabilisierung von LipA beteiligt sein. Das kompatible Solut Diglycerolphosphat (DGP) wurde in hohen Konzentrationen (bis zu 350 mM) in *A.fulgidus* nachgewiesen. Zur Stabilisierung durch DGP scheinen spezifische Protein - DGP Interaktionen nötig zu sein [195], wodurch eine Funktion der C - terminalen Domäne von LipA als DGP - Bindestelle wahrscheinlicher wird (s. 6.2.2). Die Anwesenheit von Trehalose, ebenfalls einem verbreiteten kompatiblen Solut, konnte die Stabilität von LipA bei erhöhten Temperaturen deutlich steigern (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die kinetischen Konstanten k_M und k_{kat} wurden mit dem Substrat pNPP bei 50°C und pH 10 zu 552 μM bzw. 18,08 $\text{s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen somit nicht

dem Optimum für LipA, da hierfür 70°C und pNPA günstiger gewesen wären. Das Substrat pNPA ist in alkalischer Umgebung instabil, während das verwendete Substrat pNPP bei Temperaturen über 50°C ebenfalls instabil wird. Im Vergleich zu den für AFEST bestimmten kinetischen Konstanten ($k_M = 11$ bzw. $k_{kat} = 1014 \text{ s}^{-1}$ [1]) fällt somit auch eine deutlich langsamere Kinetik auf.

Die im Sinne einer biotechnologischen Anwendbarkeit wohl interessanteste Eigenschaft von LipA ist sein ungewöhnliches pH - Optimum. Das Enzym ist eine thermoalkalophile Hydrolase mit der höchsten Aktivität bei pH 10 - 11 und deutlicher Aktivität sogar bei pH 12 (Abb. 5.7). Die Toleranz des Enzyms gegen vom Optimum abweichende pH - Bedingungen stand in engem Zusammenhang mit der Assaytemperatur, wobei hohe Temperaturen zu einer Limitierung des tolerierten pH - Bereichs führten. So konnte bei Raumtemperatur im Bereich von pH 7 bis pH 12 hydrolytische Aktivität nachgewiesen werden. Bei 50°C war die signifikante Aktivität auf den Bereich von pH 9 – 12 beschränkt. Auch die Stabilität des Enzyms wurde durch eine alkalische Umgebung positiv beeinflusst. Während bei Inkubation bei 50°C und pH 8 oder 10 bereits nach 8 Stunden nur noch ca. 5 % der Ausgangsaktivität nachweisbar waren, betrug bei Inkubation bei pH 12 die Restaktivität noch 20 % (Abb. 5.8). Die Koexistenz einer thermostabilen und einer thermoalkalophilen Hydrolase in einem Organismus wurde bereits für *Bacillus thermocatenuatus* beschrieben [178]. Die thermoalkalophile Lipase dieses Organismus (BTL2) zeigt ein Temperaturoptimum bei 60 - 70°C und ist bei pH - Werten zwischen 8 und 9.5 aktiv [178]. Andere Beispiele für thermoalkalophile Enzyme sind die alkalische Lipase von *Pseudomonas fluorescens* AK102 mit einem Temperaturoptimum von 55°C und einem pH - Optimum von 8 bis 10 [238] und eine Lipase aus *Bacillus stearothermophilus* L1 (60 - 65°C bei pH 9 - 10) [185]. LipA zeigte somit eines der extremsten alkalischen pH - Spektren aller bis heute charakterisierten Hydrolasen.

6.3 Klonierung und Expression der Lipase B aus *Candida antarctica* und der Lipase B aus *Pseudozyma tsukubaensis*, Fermentation und Mutagenese der *Candida antarctica* Lipase B

Bereits beim Screenen der bekannten Enzyme nach ihrer Enantioselektivität gegenüber 1-Methoxy-2-Propanolacetat (MPA) (s. 5.1) fiel auf, dass *Candida antarctica* Lipase B (CalB) als einziges Enzym eine den industriellen Ansprüchen genügende Enantiomerentrennung des Substrats gewährleistete. Aus diesem Grund sollte das Enzym in einem geeigneten Wirt heterolog exprimiert und somit der Produktion in großem Maßstab sowie der Mutagenese zur weiteren Biokatalysatoroptimierung zugänglich gemacht werden.

Lipase B aus *Pseudozyma tsukubaensis* zeigt eine hohe Sequenzidentität zu CalB [99]. Durch Expression und Charakterisierung des Enzyms sollte untersucht werden, ob auch die katalytischen Eigenschaften dieser Lipase, vor allem in Bezug auf die enantioselektive Hydrolyse von MPA, denen von CalB entsprachen.

6.3.1 Expression der Lipase B aus *Pseudozyma tsukubaensis*

Nach Klonierung des aus genomischer DNA von *P.tsukubaensis* amplifizierten Gens wurde die Lipase in *Pichia pastoris* X33 exprimiert. Während der vier Tage dauernden Expression im Schüttelkolben erreichten die Zellen am dritten Tag das Maximum ihrer optischen Dichte mit $OD_{600} = 50$ bis 65 (Abb. 5.13). Da das Wachstum der Kontrollzellen geringfügig hinter dem der Lipase - produzierenden Zellen zurückblieb, ist von einer Schädigung der Zellen durch das exprimierte Fremdprotein nicht auszugehen. Die Coomassie - gefärbte SDS-PAGE zur Kontrolle der Lipaseexpression zeigt keine Bande im fraglichen Bereich von 33 kD (Abb. 5.14, Spuren 5-7). Die sensiblere Silberfärbung zeigt eine schwache Bande im Bereich zwischen 36 und 38 kD (Abb. 5.15, Spuren 5-7). Obwohl die Bande somit leicht über dem theoretischen Molekulargewicht der Lipase lag, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um das fragliche Enzym handelte. Ein Vergleich mit einer silbergefärbten SDS-PAGE von Kontrollzellen (Abb. 5.24, Spur 11) beweist, dass diese Bande in Kulturüberständen von *P.pastoris* nicht detektierbar ist. Rotticci-Mulder *et al.* berichteten von einer N - Glykosylierung von CalB während der Expression in *P.pastoris* [159]. Das Molekulargewicht

dieser Lipase wurde hierdurch von den theoretischen 33 kD auf 36 kD erhöht. Aufgrund der hohen Homologie der *P.tsukubaensis* Lipase B mit CalB ist eine Glykosylierung auch dieses Proteins und somit eine Erhöhung seines Molekulargewichts in *P.pastoris* wahrscheinlich.

Mit den angewandten Methoden konnte keine Hydrolaseaktivität der Kulturüberstände nachgewiesen werden (Abb. 5.16, Tab. 5.7). Suen *et al.* gelang 2004 die funktionelle Expression dieser Lipase in *Saccharomyces cerevisiae* [99]. Dabei wurde ein heterogenes Glykosylierungsmuster des Enzyms beobachtet, das jedoch kaum Einfluss auf die Aktivität der Lipase hatte. Trotzdem wäre eine in *P.pastoris* abweichende Glykosylierung denkbar, die negativen Einfluss auf die Funktionalität und Stabilität der Lipase haben könnte. Auch eine fehlerhafte Faltung des Proteins in diesem Expressionssystem wäre möglich, aufgrund der Sekretion des Proteins ins Medium jedoch unwahrscheinlich. In dieser Arbeit wurde nur auf Aktivität gegenüber Tributyrin, α -Naphthylacetat und MPA getestet. Suen *et al.* konnten bei der Hydrolyse von Tributyrin bzw. 4-Nitrophenylbutyrat durch Lipase B aus *P.tsukubaensis* nur 13 bzw. 17 % der CalB - Aktivität nachweisen. So scheint ein Zusammenwirken geringer Aktivität und schwacher Expression die wahrscheinlichste Erklärung für die in dieser Arbeit nicht nachweisbare Aktivität zu sein. Eine nachträgliche Inaktivierung der Lipase, möglicherweise durch die Expressionstemperatur von 30°C, scheint aufgrund der von Suen *et al.* beschriebenen hohen Thermostabilität dieser Lipase unwahrscheinlich.

Aufgrund des Fehlens jeglicher messbaren Aktivität des Enzyms gegen MPA wurde auf eine Optimierung der Expression in *P.pastoris* verzichtet.

6.3.2 Expression der Lipase B aus *Candida antarctica*

Eine Sequenzierung des aus genomischer DNA von *Candida antarctica* amplifizierten und klonierten Lipasegens zeigte auf Aminosäureebene zwei Abweichungen von der veröffentlichten Wt - Sequenz (NCBI Zugangsnummer CAA83122) (Abb. 5.12). Eine Untersuchung der Positionen der veränderten Aminosäurereste T57A und A89T ergab, dass sich diese Reste an der Peripherie des Enzyms befanden und höchstwahrscheinlich nur geringen Einfluss auf die Faltung und somit auch die Aktivität der Lipase haben dürften. Da sich die Sequenzabweichungen in allen isolierten Klonen fanden und bei der Amplifikation des Lipasegens die DyNAzyme™ EXT DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet wurde, kann angenommen werden, dass die gefundenen Sequenzabweichungen auf einer natürlichen Mutation während der Evolution von *Candida antarctica* und nicht auf

Fehler während der PCR - Amplifikation beruhen. Auf eine Korrektur der Positionen T57A und A89T hin zur veröffentlichten Aminosäuresequenz wurde daher verzichtet.

Die Expression von CalB im Schüttelkolbenmaßstab wurde über vier Tage verfolgt (Abb. 5.13). Wie bereits für die die *P.tsukubaensis* Lipase B exprimierenden Zellen berichtet, zeigten auch die CalB-Zellen eine maximale optische Dichte nach dreitägiger Expression ($OD_{600} = 45 - 60$). Anhand des schnellen Wachstums der Klone im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte auch hier eine Toxizität der Lipase ausgeschlossen werden. Die Coomassie - gefärbte SDS-PAGE zur Kontrolle der Lipaseexpression (Abb. 5.14, Spuren 1-3) zeigte starke Proteinbanden im Bereich von 36 – 38 kD. Die von Rotticci-Mulder *et al.* in *P.pastoris* exprimierte CalB zeigte ein Molekulargewicht von 36 kD, während das theoretische Molekulargewicht dieser Lipase bei 33 kD lag. Diese Abweichung konnte auf N - Glykosylierungen zurückgeführt werden [159]. Weitere Proteine oder Abbauprodukte konnten mit der Coomassiefärbung nicht nachgewiesen werden. Die sensiblere Silberfärbung einer SDS-PAGE zeigte mehrere schwache zusätzliche Banden (Abb. 5.15, Spuren 1-3). Aufgrund des hohen Anteils der Lipase an Gesamtprotein wurde auf eine Aufreinigung der Kulturüberstände jedoch verzichtet. Die Gesamtproteinkonzentration der Kulturüberstände betrug 0,061 mg/ml (Tab. 5.7). Da aufgrund der SDS-PAGE angenommen werden konnte, dass ein großer Anteil des Gesamtproteins die rekombinante CalB darstellte, übertrifft diese Ausbeute die von Rotticci-Mulder erreichten 0,025 mg exprimierter CalB/ml Kulturüberstand deutlich [159].

Die exprimierte Lipase zeigte in einem Zymogramm deutliche Aktivität gegen α -Naphthylacetat (Abb. 5.16). Auffällig war hierbei, dass neben der erwarteten Bande im Bereich von 36 kD auch braune Aktivitätsbanden im Bereich um 50 - 60 kD und über 100 kD sichtbar waren. Möglicherweise handelte es sich hierbei um multimere Formen der CalB. Die spezifische Aktivität der Kulturüberstände bei der Hydrolyse von Tributyrin betrug 595,9 U/mg und lag somit über der bislang von anderen Gruppen erreichten spezifischen Aktivität bei der Expression von CalB in *P.pastoris* (480 U/mg, [159]) bzw. in *S.cerevisiae* (560 U/mg, [99]). Die Aktivität gegen MPA lag mit 25 U/mg bei 4 % der für Tributyrin erreichten Aktivität. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Messergebnissen des Enzymscreenings (5.1). Auch dort war die Aktivität der kommerziellen CalB von Roche (Chirazyme L2-lyo) bei der Hydrolyse von Tributyrin um den Faktor 13 höher als bei der Hydrolyse von MPA. Eine ebenfalls in *P.pastoris* exprimierte CalB-Variante mit C-terminalem His-tag konnte ebenfalls mit Hilfe einer SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 5.23, Spuren 9 + 17). Da diese

Variante jedoch nur 39 % der hydrolytischen Aktivität des Wildtyps zeigte, wurde die Fermentation mit dem Wildtyp durchgeführt (Tab. 5.9).

6.3.3 Fermentation der *Candida antarctica* Lipase B

Zur Steigerung der Proteinausbeute und zur Evaluierung der Lipaseproduktion wurde eine Fermentation von CalB im fünf Liter Maßstab durchgeführt. Während der 13 Tage dauernden Fermentation konnte eine fortlaufende Zunahme sowohl der Biomasse als auch der Aktivität beobachtet werden (Abb. 5.18). Somit kann davon ausgegangen werden, dass keine längeren Perioden mit unzureichender Methanolversorgung der Zellen auftraten. Bei einer Aktivität zum Zeitpunkt der Ernte von 879 U/ml Fermentationsüberstand betrug die optische Dichte OD_{600} 171 (Tab. 5.8). Das Verhältnis der Aktivität zur optischen Dichte und somit zur Biomasse konnte im Vergleich zur Expression im Schüttelkolben versiebenfacht werden (Tab. 6.1). Gleichzeitig wurde die spezifische Aktivität von 595,9 U/mg auf 1953 U/mg erhöht. Diese Verbesserung der Lipaseproduktion war wohl auf die gleichbleibende Konzentration von Methanol im Medium und die bessere Sauerstoffversorgung während der Fermentation zurückzuführen. Nach Anpassung des pH - Wertes des Fermentationsüberstands von pH 6,0 auf pH 7,5 konnte eine weitere Zunahme der spezifischen Aktivität von 1953 U/mg auf 3176 U/mg beobachtet werden (Tab. 5.8). Es ist anzunehmen, dass dieser für die Aktivität von CalB optimale pH - Wert auch eine Stabilisierung des Enzyms bewirkte.

	Expression im Schüttelkolben	Expression im 5 l Fermenter
OD_{600} bei Ernte	~ 50	171
Aktivität [U/ml] bei Ernte	36,5	879
Spezifische Aktivität [U/mg] bei Ernte	595,9	1953
Verhältnis Aktivität zu Biomasse [Ux OD_{600} /ml] bei Ernte	0,73	5,14

Tabelle 6.1: Vergleich der CalB - Expressionen im Fermenter und im Schüttelkolben. 1 U entspricht dem Umsatz von 1 μ Mol Tributyrin pro Minute.

Die Gesamtproteinausbeute der Fermentation lag bei 0,45 g/l (Tab. 5.8). Jahic *et al.* erreichten durch Anreicherung der Zuluft mit reinem Sauerstoff Ausbeuten von 1,5 g/l bei der Fermentation eines CalB - Fusionsproteins [239]. In einer anderen Arbeit konnte die gleiche Gruppe die Proteinausbeute durch Anwendung einer Temperatur - limitierten

Zufütterungstechnik auf 2 g/l erhöhen [240]. In beiden Arbeiten wurde mit Minimalmedium statt dem in dieser Arbeit verwendeten Komplexmedium gearbeitet. Da bei der in dieser Doktorarbeit durchgeführten Fermentation ohne zusätzlichen Sauerstoff belüftet wurde, sollte eine Optimierung der Proteinproduktion durch Sauerstoffanreicherung auch hier möglich sein. Ein Vorteil der Temperatur - limitierten Zufütterungstechnik liegt vor allem in der geringeren Proteolyse rekombinant erzeugten Proteins bei niederen Temperaturen. Da bei der durchgeführten Fermentation keine Degradationsprodukte nachweisbar waren, ist von einer entscheidenden Verbesserung der Fermentationsausbeute durch diese Technik nicht auszugehen. Während der Fermentation fand eine fortlaufende Zunahme der Lipasekonzentration im Medium statt (Abb. 5.19 + 5.20). Gleichzeitig konnten selbst auf der mit der sensiblen Silberfärbemethode behandelten SDS-PAGE keine weiteren Proteine oder Degradationsprodukte im Fermentationsüberstand nachgewiesen werden, weshalb auf eine Aufreinigung der Lipase verzichtet wurde.

6.3.4 Mutagenese der *Candida antarctica* Lipase B

Bis heute ist die strukturelle Ursache der hohen Enantioselektivität von CalB gegenüber sekundären Alkoholen weitgehend unverstanden. Das zeigt sich vor allem daran, dass trotz Identifizierung der Stereoselektivitätstasche von CalB [206] bis heute keine Mutanten aus Ansätzen des rationalen Proteindesigns mit signifikant verbesserter Enantioselektivität generiert werden konnten [47, 100].

Strukturvergleiche von CalB und anderen Lipasen zeigten, dass CalB ein charakteristisches zusätzliches Strukturelement aufweist. Dabei bilden Helices neun und zehn eine Art „Deckel“ über dem aktiven Zentrum von CalB und verengen somit die Substratbindetasche dieser Lipase. Die Helices wurden bereits von Zhang als Nukleationsstelle bei der thermischen Aggregation von CalB identifiziert [84]. Eine ursächliche Verbindung dieses Strukturmerkmals mit der Enantioselektivität schien aufgrund der Besonderheit beider Faktoren wahrscheinlich und sollte in dieser Doktorarbeit durch Generierung von Mutanten, denen Teile dieses C - terminalen Strukturelements fehlten, untersucht werden.

Mit keiner der angewandten Methoden konnte die Expression der Mutanten nachgewiesen werden (Abb. 5.24 + 5.25, Spuren 6-8, 14-16). Da die Kulturüberstände auch keine messbare Aktivität zeigten, wurde auf eine Bestimmung der Enantioselektivität am GC verzichtet. Die Tatsache, dass keine nachweisbare stabile Expression der Mutanten stattfand, lässt darauf schließen, dass die C - terminale Helixstruktur in CalB eine wichtige stabilisierende Funktion

besitzt. Ein Fehlen dieser Struktur bzw. eine Lockerung der Helixverankerung führt somit möglicherweise zur unkorrekten Faltung und in Folge dessen zur Degradation des Proteins. Die N - Glykosylierungsstelle von CalB liegt in der N - terminalen Hälfte von CalB, so dass diese Form der Prozessierung nicht direkt durch die Deletionen beeinträchtigt werden sollte [241]. Der C - terminale Teil von CalB enthält jedoch zwei Disulfidbrücken, eine zwischen Cys216 und Cys258 und eine zwischen Cys293 und Cys311. Sämtliche Deletionen führten somit zu mindestens einer fehlenden Disulfidbrücke, wodurch die Struktur des Enzyms grundlegend verändert werden dürfte und möglicherweise die Degradation der Proteine eintrat. Allerdings wird CalB von *P.pastoris* sekretiert, so dass die Faltung erst außerhalb der Zelle komplettiert wird und eine unkorrekte Faltung wohl nicht zur Degradation des Proteins führen würde. Gleichwohl könnte die mRNA der Mutanten eine instabile Struktur besitzen, die eine Translation möglicherweise erst gar nicht möglich macht.

Im Gegensatz zu Vorgehensweisen anderer Gruppen, die an der Stereoselektivitätstasche beteiligten Aminosäuren direkt zu mutieren [47, 100], wurden in dieser Doktorarbeit die in der Substratbindetasche befindlichen Aminosäuren G39 und A281 gegen größere, hydrophobe Reste ersetzt, um den Raum um das aktive Zentrum zu verengen (Abb. 5.25). Die Klone zeigten sowohl ein dem Wt entsprechendes Wachstum (Abb. 5.26), als auch einen vergleichbaren Expressionslevel (Abb. 5.23 + 5.24, Spuren 3-5, 13-16). Alle Mutanten zeigten hydrolytische Aktivität, wobei auch hier die Aktivität bei der Hydrolyse von Tributyrin deutlich höher lag als bei der Hydrolyse von MPA (Tab. 5.9, Abb. 5.27). Insgesamt war die Aktivität aller Mutanten bei Hydrolyse der getesteten Substrate gegenüber dem Wildtyp erheblich erniedrigt. Die höchste Aktivität bei der Hydrolyse von Tributyrin zeigte G39A mit 13 % der Wt - Aktivität, während diese Mutante MPA nicht in nachweisbarem Umfang umsetzte. G39 befindet sich in direkter Nachbarschaft zu dem an der Oxyanion - Bindetasche beteiligten T40. Es ist möglich, dass durch Mutation dieses Restes die räumliche Ausrichtung von T40 leicht verändert wird, wodurch sich die Akzeptanz gegenüber verschiedenen Substraten und somit auch gegenüber MPA ändern würde. Die Mutanten mit Substitutionen des Alanins 281 zeigten nur 1,0 – 2,7 % der Wt - Aktivität bei der Hydrolyse von Tributyrin; MPA wurde jedoch mit 16 - 28 % der Aktivität des Wildtyps umgesetzt (Tab. 5.9, Abb. 5.27). Diese im Vergleich gesteigerte Toleranz des Enzyms gegenüber dem kleinen hydrophilen Substrat MPA könnte auf die Verengung der Substratbindetasche zurückzuführen sein. Tatsächlich korreliert die Aktivität der Mutanten mit der Größe der eingefügten Aminosäurereste. So zeigt A281V die höchste Aktivität bei der Hydrolyse von Tributyrin,

während A281F nur noch 1 % der Wt - Aktivität aufweist. Die allgemein geringe Aktivität der an Position A281 substituierten Mutanten war wenig überraschend. Rotticci *et al.* berichteten von einer CalB - Mutante, die nur eine Aminosäuresubstitution aufwies und im Gegensatz zum Wildtyp keine Expression im verwendeten Expressionssystem zeigte [133]. Zhang *et al.* gelang durch Methoden der *epPCR* und Sättigungsmutagenese die Isolierung von CalB - Mutanten mit erhöhter Thermostabilität und Aktivität gegen die untersuchten Substrate 6,8-Difluoro-4-Methylumbelliferyloctanoat (DiFMU) und *p*-Nitrophenylbutyrat (pNB). Die Mutante A281E zeigte hierbei eine 22fach erhöhte Halbwertszeit bei 70°C. Die Doppelmutante V210I/A281E zeigte darüber hinaus eine 22fach erhöhte Aktivität bei der Hydrolyse von DiFMU und eine vierfach erhöhte Aktivität bei der Hydrolyse von pNB [84]. Tatsächlich führte Zhang die positive Auswirkung von A281E auf die Ladungsverhältnisse in dieser Region zurück. A281 ist Bestandteil einer sogenannten Nukleationsstelle, einer langen hydrophoben Aminosäuresequenz (V₂₇₂AAAALLAPAAAIV₂₈₆), die durch ihre exponierte Position eine Aggregation des Proteins initiieren kann [242, 243]. Diese hydrophobe Kette wurde durch die Substitution A281E unterbrochen, so dass diese als Nukleationsstelle gestört wurde. Die in dieser Doktorarbeit vorgenommenen Substitutionen A281V, A281L und A281F erhalten den hydrophoben Charakter der Nukleationsstelle und wirken sich somit nicht stabilisierend auf die Proteinstruktur aus.

Aufgrund der geringen Aktivität der Mutanten konnte eine Umsatzrate von 50 % zur Bestimmung von *E* nicht erreicht werden; die Vergleichbarkeit der Werte wurde jedoch durch Messung aller *E* - Werte der Mutanten und des Wildtyps bei der Umsatzrate von 5 % gewährleistet. Alle Mutanten zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp geringere Enantioselektivität bei der Veresterung von 1-Methoxy-1-Propanol (Abb. 5.28). Der für den Wildtyp ermittelte *E* - Wert von 70,3 entsprach den Erwartungen [35]. Die Enantioselektivität der Mutante G39A fiel mit 29,2 am geringsten aus. Auch hier zeigt sich die geringe Akzeptanz der Mutante gegen das Substrat MP, dessen Acetat nur in nicht nachweisbarem Umfang hydrolysiert wurde (s.o.). Die an A281 substituierten Mutanten zeigten höhere *E* - Werte von 60,3 (A281L), 58,8 (A281V) bzw. 47,7 (A281F). Hierbei fällt auf, dass gerade A281F, bei dem die größte Einengung der Substratbindetasche zu erwarten wäre, die geringste Enantioselektivität aufwies. Es ist anzunehmen, dass die Mutationen an dieser Position zu einer weitreichenden Veränderung der Struktur der Substratbindetasche führten, die Vorhersagen über die Enantioselektivität möglicher Mutanten nicht zuließ und die Funktionalität des Enzyms herabsetzten (s.o.).

6.3.5 Expression der *Candida antarctica* Lipase B in *E.coli*

Bis heute konnte CalB in *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia methanolica* und *Pichia pastoris* funktionell exprimiert werden [84, 159, 205, 216]. Die Gruppe um Aleksey Zaks führte verschiedene Hochdurchsatz - Screenings mit Mutantenbibliotheken der CalB in *S.cerevisiae* durch. Dabei wurden 2500 [99] bzw. 20200 Klone gescreent [84]. Trotz dieser Erfolge sind solche Methoden enorm zeit - und arbeitsaufwendig. Aus diesen Gründen wäre eine funktionelle Expression dieser Lipase in *E.coli* wünschenswert. Diese wurde bereits von mehreren Gruppen vergeblich in Angriff genommen [153]. Dabei schienen vor allem die drei in CalB vorhandenen Disulfidbrücken eine funktionelle Expression der Lipase zu erschweren.

In dieser Arbeit konnte die funktionelle Expression von CalB in *E.coli* etabliert werden. Dabei zeigte nur einer der drei getesteten *E.coli* Stämme, Origami™, eine Produktion von aktivem Enzym unter optimierten Expressionsbedingungen. Durch Verwendung des relativ schwachen *lac*-Promotors des verwendeten pUC18 Vektors (Abb. 5.34) und der Inkubation der Zellen bei relativ niedrigen Temperaturen sollte eine langsame Lipaseproduktion stattfinden, die eine Bildung von *inclusion bodies* minimieren sollte. Die Expression von CalB wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE kontrolliert (Abb. 5.36). Deutlich sichtbar ist die in den Kontrollzellen nicht nachweisbare Bande im Bereich von 33 kD. Interessanterweise erscheint diese Bande bereits vor der Induktion mit IPTG (Spur 5), was auf eine annähernd konstitutive Aktivität des Promotors hinweist. Nach der vier Stunden dauernden Expression konnte die Lipase mit der verwendeten Färbemethode nur in der unlöslichen Fraktion der Zellen zweifelsfrei nachgewiesen werden (Spur 8). Eine Aktivitätsmessung der löslichen Fraktion ergab jedoch eine Hydrolyse von Tributyrin mit 2,7 bis 3,2 U/mg. Auch mit einem Tributyrin - Plattenassay konnte die Expression von funktioneller Lipase gezeigt werden (Abb. 5.35). Im Vergleich zu der SDS-PAGE der in *P.pastoris* exprimierten CalB fiel auf, dass die in *E.coli* produzierte Lipase ein leicht geringeres Molekulargewicht hatte. Dieses Ergebnis korrelierte mit den Ergebnissen von Rotticci-Mulder, wonach in *P.pastoris* eine N - Glycosylierung von CalB stattfindet, die das Molekulargewicht von 33 kD auf 36 kD erhöht [159]. Da in *E.coli* keine Glycosylierungen stattfinden, sollte das Molekulargewicht von CalB bei 33 kD liegen.

Die Expression von CalB in *E.coli* scheint in höchstem Maße von den Expressionsbedingungen und dem Zelltyp abhängig zu sein. So wurde Lipaseaktivität nur in Origami™ Zellen beobachtet, die sich durch Mutationen innerhalb ihres Thioredoxin Reduktase Gens (*trxB*) sowie ihres Glutathion Reduktase Gens (*gor*) auszeichnen, wodurch

die Disulfidbrückenbildung im Zytoplasma der Zelle stark begünstigt wird. Prinz *et al.* berichteten von einer 10fachen Ausbeute an aktivem Protein bei Verwendung dieses Stammes [244]. Die ebenfalls verwendeten AD494 Zellen zeigen ebenfalls eine Mutation ihres Thioredoxin Reduktase Gens, besitzen jedoch keine Glutathion Reduktase Mutation. Sowohl in AD494 Zellen wie auch in DH5 α Zellen konnte keine funktionelle Lipaseexpression nachgewiesen werden, was auf die inhibierende Rolle der Glutathion Reduktase bei der Ausbildung der Disulfidbrücken von CalB hinweist. Die Origami™ Zellen zeigten nur bei Inkubation bei 30°C funktionelle Lipaseproduktion, bei höheren Temperaturen konnten auf Tributyrin - Agarplatten keine Lysehöfe beobachtet werden.

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass tatsächlich die Ausbildung von Disulfidbrücken und somit die korrekte Faltung der Proteine der limitierende Faktor bei der funktionellen Expression von CalB in *E.coli* ist. Während das in dieser Arbeit verwendete Expressionssystem nur geringe Ausbeuten an aktiver Lipase zeigte, sollte eine Optimierung der Expression, möglicherweise durch Ausschleusung des Proteins ins Periplasma, möglich sein [152]. Auch die Verwendung anderer Expressionsvektoren könnte einen positiven Einfluss auf die Ausbeute an aktivem Enzym haben. So unterstützt das in dem Vektor pET-32 (Novagen, Darmstadt) enthaltenen Thioredoxin - Fusionstag zusätzlich die Ausbildung von Disulfidbrücken in Verbindung mit Origami™ Zellen [245, 246].

Der in dieser Arbeit erreichte Expressionlevel war ausreichend zur Durchmusterung großer Mutantenbibliotheken, da im ersten Durchlauf eines Enzymbibliothekenscreens meist nur nach aktiven Klonen gesucht wird, die sich durch das verwendete Expressionssystem leicht durch den Tributyrinplattenassay nachweisen lassen.

6.4 Synthese eines Lipasegens aus *Moraxella* sp. TA144 und

Charakterisierung des korrespondierenden Enzyms

Durch die Synthese eines Lipasegens aus dem antarktischen Organismus *Moraxella* sp. TA144 sollte eine neue Methode der schnellen Gensynthese erprobt werden, die später auch bei der Erstellung einer synthetischen Genbank angewandt werden sollte. Dabei wurde die Gensequenz an die *codon usage* von *E.coli* angepasst. Die Funktionalität des korrespondierenden Enzyms sollte nach Expression in *E.coli* überprüft und mit den Literaturdaten verglichen werden.

6.4.1 Gensynthese

Die Synthese des Gens *lip1* des psychophilen Organismus *Moraxella* sp. TA144 gelang durch eine neue Methode der Gensynthese. Dieser Ansatz stellte sich als günstige und schnelle Alternative zu den gängigen Synthesemethoden heraus. Innerhalb nur einer Woche konnte das gesamte Gen mit einer Länge von 960 bp synthetisiert und in den Expressionvektor pJOE kloniert werden (Abb. 5.30 + 5.31). Dabei wurde für jeden der zwölf einzelnen Syntheseschritte nicht mehr als drei Stunden inklusive der Elektrophorese und Aufreinigung des Amplifikationsprodukts benötigt.

Durch Beschränkung der Zeiten für Denaturierung und Anlagerung der Primer auf 15 Sekunden sollte eine weitere Reduzierung der für die PCR benötigten Zeit möglich sein [247]. In einem PCR - Programm mit jeweils 10 Sekunden Denaturierung und Anlagerung konnte so eine starke Bande von 300 bp für den dritten Reaktionsschritt erhalten werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Auch die Aufreinigung der PCR - Produkte könnte durch eine einfache und preiswerte Filtermethode beschleunigt werden [248]. Durch Optimierung sowohl der PCR - Schritte wie auch des Aufreinigungsprotokolls könnte die für einen Schritt benötigte Zeit so auf 1,5 Stunden reduziert werden.

Das amplifizierte Gen enthielt drei Sequenzfehler, von denen einer eine stille Mutation darstellte. Bei einer der verbleibenden Mutationen handelte es sich um die Deletion einer Base im Primerbereich, was auf einen Fehler während der Primersynthese zurückzuführen sein dürfte. Die dritte Mutation, ein Basenaustausch, wurde wahrscheinlich durch einen Amplifikationsfehler der *Taq* DNA-Polymerase verursacht. Durch Nutzung einer DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion wie z.B. *Pfu* oder *Vent* DNA-Polymerase sind solche Amplifikationsfehler vermeidbar.

Die verwendete schrittweise Strategie beinhaltet Wiederholungen der Amplifikation der Bereiche des synthetisierten Gens, die als Templat für die nachfolgenden Syntheseschritte dienen. Somit ist die tatsächliche Zahl an amplifizierten Basen deutlich höher als die Länge des Gens, im Falle von *lip1* sind das etwa 5600 Basen. In der vorliegenden Arbeit liegt die Fehlerrate der *Taq* DNA-Polymerase somit bei 2 - 3 Synthesefehler auf 5600 bp oder $4,6 \times 10^{-5} \pm 0,9 \times 10^{-5}$. Bei einer angenommen Verdopplungsrate des Templats von 10 läge die durchschnittliche Fehlerrate bei $4,6 \times 10^{-6} \pm 0,9 \times 10^{-6}$, was publizierten Werten entspräche [249].

Die für die Synthese von *lip1* verwendeten Oligonukleotide waren auf maximal 60 bp beschränkt, wodurch sowohl Fehler während der Primersynthese wie auch starke Sekundärstrukturen der Oligonukleotide vermieden werden sollten. In der Literatur wurde

jedoch auch die Verwendung von bis zu 140 bp langen Oligonukleotiden beschrieben, die jedoch durch HPLC gereinigt wurden [250]. Eine Reduzierung der benötigten Syntheseschritte durch Verwendung längerer Oligonukleotide sollte also möglich sein.

Aufgrund des geringen Zeitaufwands und der bis auf wenige Mutationen korrekten Sequenz des Produkts eignete sich die hier etablierte Methode der Gensynthese sehr gut für die Synthese einer Genbank, wie sie in dieser Arbeit geplant war. Dabei sollte durch Verwendung einer DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion das Auftreten von Mutationen minimiert werden können. Auch die Synthesedauer sollte durch Nutzung längerer Oligonucleotide verkürzt werden können.

6.4.2 Expression und Charakterisierung von Lip1

Lip1 konnte funktionell in *E.coli* XL-1 *blue* exprimiert werden. Eine SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression zeigte eine nur schwache Bande im erwarteten Bereich von 34 kD (Abb. 5.32). Durch das Vorhandensein hydrolytischer Aktivität im Zellysate konnte die Expression der Lipase jedoch zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Falle von Lip1 keine Optimierung der Lipaseexpression durch Angleichung der verwendeten Codons erreicht werden konnte. Auch Feller gelang eine geringfügige Überexpression des Wt - Enzyms ohne Angleichung an *E.coli codon usage* [219]. Die Verwendung anderer Expressionsvektoren wie pUC18, bei dem das Gen unter Kontrolle des eher schwachen Lactosepromotors *lacZ* stand, oder pET22b (Novagen, Darmstadt), der den starken T7 Promotor und eine Signalsequenz zur Ausschleusung des rekombinanten Proteins ins Periplasma besitzt erbrachten genausowenig eine Verbesserung der Lipaseproduktion wie eine konstitutive Expression in einem modifizierten pUC-Vektor [264] (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine weitere Optimierung der Expression könnte durch Änderung der Expressionsbedingungen, so Expression bei niedrigeren Temperaturen, möglich sein.

Lip1 zeigte die höchste hydrolytische Aktivität bei 37°C (Abb. 5.33). Die Stabilität der Lipase lies jedoch schon ab 30°C nach, so dass nach wenigen Minuten kaum Aktivität mehr nachweisbar war (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei 50°C konnte anfänglich noch 20 % der maximalen Aktivität nachgewiesen werden, diese war jedoch nicht länger als wenige Sekunden stabil. Diese Ergebnisse decken sich mit der von Feller beobachteten reduzierten

Thermostabilität der rekombinanten Lipase im Vergleich zu dem aus *Moraxella* sp. TA144 isolierten Wt - Enzym [219]. *Moraxella* sp. TA144 entlässt seine extrazellulären Lipasen assoziiert zu Lipopolysacchariden, die hochmolekulare Komplexe bilden [218]. Das Fehlen dieser stabilisierenden Strukturen bei der heterologen Expression des Enzyms in *E.coli* könnte auch die allgemein geringe Aktivität des Enzyms gegen alle getesteten Substrate sowie die geringe Expressionsrate erklären. In der vorliegenden Arbeit zeigte Lip1 bei 4°C noch 43 % der maximalen Aktivität, wodurch sich die Lipase eher als psychrotolerantes denn als echtes psychrophiles Enzym charakterisieren ließ. Insgesamt deckt sich das Temperaturprofil von Lip1 jedoch mit dem anderer charakterisierter Lipasen aus psychrophilen Organismen [224-228, 251].

Lip1 zeigte die höchste Aktivität bei der Hydrolyse von Tributyrin, so dass dieses Enzym als echte Lipase charakterisiert werden konnte (Tab. 5.10). Die Ergebnisse des Substratscreenings zeigten, dass Lip1 zwischen verschiedenen Substratspezifitätsmustern unterscheiden kann. Dabei scheinen Buttersäureester mittellanger Alkohole die bevorzugten Substrate für dieses Enzym zu sein. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen einer Substratuntersuchung mit *p*-Nitrophenolestern. Auch hier wurde der Buttersäureester bevorzugt umgesetzt [219]. Das für diese Arbeit interessante 1-Methoxy-2-Propanolacetat wurde von Lip1 nicht hydrolysiert.

Die relative Limitierung des Substratspektrums von Lip1 auf Substrate mit eng definierten Eigenschaften lässt sich durch die Anwesenheit von drei Lipasen in *Moraxella* sp. TA144 erklären, von denen jede ein eng umgrenztes Substratspektrum aufweist [219].

6.5 Darstellung und Screening einer Genbank mit Hilfe von synthetischem Shuffling

Die Lipase B aus *Candida antarctica* erwies sich als das für die Enantiomerentrennung von 1-Methoxy-2-Propanolacetat am besten geeignete Enzym (s. 6.1). Nichtsdestotrotz wäre, vor allem bei der Umesterungsreaktion, eine Optimierung der Enantioselektivität wünschenswert. Durch die Etablierung der Expression von CalB in *E.coli* wurde der Weg für die gerichtete Evolution von CalB geebnet, da hierdurch die Möglichkeit zur Durchmusterung großer Mutantenbibliotheken gegeben wurde (s. 6.3.5). In dieser Arbeit wurde durch eine neue

Methode des synthetischen Shufflings eine auf der Sequenz der CalB basierende Genbank dargestellt und nach Klonen mit Lipaseaktivität durchmustert.

6.5.1 Genbanksynthese

Zur Synthese der konservierten Bereiche der Genbank wurde die schon bei der Synthese von *lip1* aus *Moraxella* sp. TA144 angewandte Methode der Gensynthese verwendet (s. 6.4). Obwohl bei der Synthese die *Vent* DNA-Polymerase, welche Korrekturlesefunktion besitzt, verwendet wurde, zeigte das Produkt eine Punktmutation. Die bei der Synthese verwendeten Oligonukleotide waren mit bis zu 84 bp deutlich länger als die bei der Synthese von *lip1* benutzten Oligonukleotide (Abb. 5.39). Mit zunehmender Länge steigt das Risiko einer Sequenzabweichung innerhalb der Oligonukleotide, so dass die aufgetretene Punktmutation mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Mutation während der Oligonukleotidsynthese zurückzuführen sein dürfte.

Die zur Synthese des variablen Teils der Genbank verwendeten Oligonukleotide hatten eine Länge zwischen 55 und 87 bp und zeigten einen hohen Degenerationsgrad von 20 – 41 %. Eine Sequenzierung des 540 bp PCR - Produktes der mit der *Taq* DNA-Polymerase durchgeführten Synthese zeigte, dass die Mehrzahl der Klone (83 %) Deletionen enthielten, die zu vorzeitigen Kettenabbrüchen in den korrespondierenden Proteinen führen würden. Nur wenige der Klone (17 %) enthielten alle Codons für die Aminosäurereste der katalytischen Triade. Und auch diese Klone zeigten teilweise nach dem Histidin Kettenabbrüche bzw. Aminosäureaustausche über die gesamte Fragmentlänge. Während die aufgetretenen Punktmutationen sowohl auf Amplifikationsfehler der *Taq* DNA-Polymerase, die keine Korrekturlesefunktion besitzt, sowie auf Fehler während der Oligonukleotidsynthese zurückzuführen sein dürften, waren für die vielen Deletionen Primerfehlbindungen während der Amplifikationsschritte verantwortlich.

Ein Optimierungsansatz, bei dem während der Syntheseschritte stringenteres Annealing-Bedingungen gewählt wurden, untermauerte diese Hypothese. Von den so erhaltenen Klonen zeigten nur noch 31 % Deletionen, 62 % codierten für alle Reste der katalytischen Triade. Insgesamt konnte die Anzahl der durch Deletionen verursachten Leserasterverschiebungen also deutlich verringert werden. Die trotzdem noch hohe Anzahl an Deletionen war auf trotz der stringenteren Annealingbedingungen auftretenden Primerfehlbindungen zurückzuführen. Hierfür verantwortlich zeichnete der extrem hohe Degenerationsgrad der Oligonukleotide, der zu nur bedingt kontrollierbaren Fehlbindingen während der Gensynthese führte. Zur weiteren

Reduktion der Zahl der Deletionen wäre somit eine Reduktion der Variabilität der Genbank nötig, die gleichzeitig die theoretisch mögliche Verbesserung des besten Mutanten beeinflussen könnte, die durchschnittliche Aktivität der Bibliothek jedoch erhöhen würde [105, 252] (Abb. 6.1).

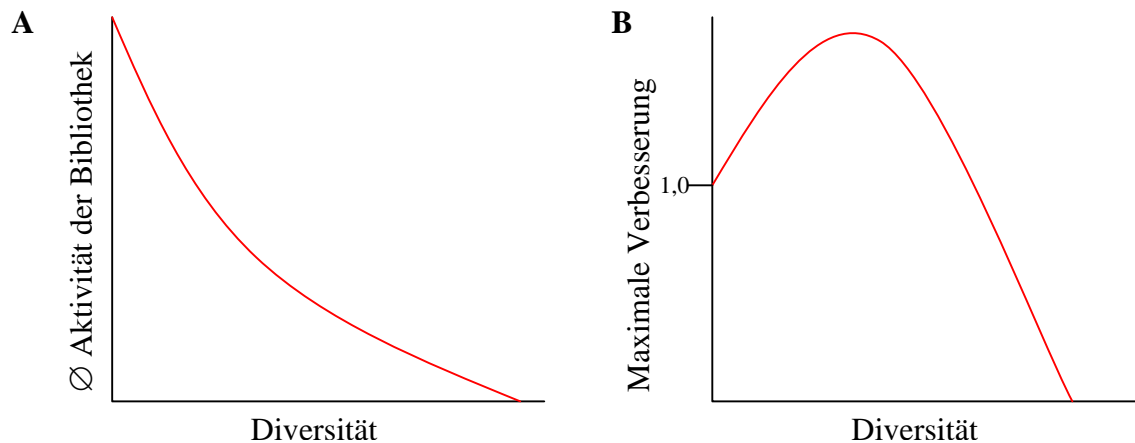


Abbildung 6.1: Zusammenhang zwischen Diversität einer Mutantenbibliothek und der durchschnittlichen Aktivität der Klone (A) bzw. der Verbesserung der Eigenschaften der besten Mutante (B).

Nach Ostermeier, 2003 [105].

Die Analyse des folgenden Syntheseansatzes, bei dem das degenerierte Codon TDS durch TGG oder TWC ersetzt wurde, ergab interessante Erkenntnisse. Einige Positionen, die in der Referenzsequenz variabel geplant waren, erwiesen sich als in allen sequenzierten Klonen identisch (Abb. 5.43). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die tatsächliche Variabilität innerhalb der Oligonukleotide weniger hoch war als die in der Referenzsequenz geplante, so dass auch hier Synthesefehler während der Oligonukleotidsynthese vorlagen.

Die Klone zeigten innerhalb des degenerierten Bereichs (179 AS) Sequenzidentitäten zueinander von 58,4 bis 64,3 %. Weitet man den Sequenzvergleich auf die gesamte endgültige Sequenz von 342 Aminosäuren aus, so ergeben sich Sequenzidentitäten zwischen 78,4 und 81,3 %. Ein Vergleich der Genbankklone zu CalB - Wt Sequenz zeigte Sequenzidentitäten zwischen 72,5 und 76,9 % (Tab. 5.12). Suen erreichte eine Sequenzidentität seiner durch DNA *family shuffling* erzeugten aktiven Klone zu CalB von 73,9 bis 81,2 % [99]. Die Sequenzähnlichkeit der Klone zu CalB lag also in einem Bereich, der durchaus eine Aktivität einer Vielzahl der Klone erwarten lassen dürfte.

In einem letzten Optimierungsschritt wurde der Degenerationsgrad leicht abgesenkt, um die Gefahr des Auftretens von Deletionen zu minimieren und die Ausbeute an aktiven Klonen zu erhöhen (Abb. 6.1) [105]. Zusätzlich wurde das Codon NRM, welches noch in der

Referenzsequenz vorhanden war und ebenfalls für die Stopcodons TAA (Ochre) und TGA (Opal) codiert, durch CGT ersetzt (Abb. 5.45). Die in diesem Ansatz verwendeten Oligonukleotide zeigten einen Degenerationsgrad zwischen 16,7 und 39,1 %. Insgesamt zeigte der so optimierte degenerierte Teil der Genbank eine Diversität von $10^{63,9}$, d.h. dass die Genbank einen Pool aus theoretisch $10^{63,9}$ Klonen umfasste (Tab. 5.13). Im Vergleich zur anfänglich geplanten Referenzsequenz, die einen Pool von theoretisch $10^{70,9}$ Klonen umfasste (Tab. 5.11), wurde die Variabilität somit im Laufe der Optimierungsansätze um den Faktor 10^7 herabgesetzt. Bei der Analyse der Sequenzen der optimierten Klone fiel auf, dass mehrere Positionen variabel waren, obwohl sie in der Referenzsequenz konserviert wurden (Abb. 5.46). Die Abweichungen von der geplanten Sequenz sind hier wohl auf Fehler während der Synthese der bis zu 87 bp langen Oligonukleotide zurückzuführen. Auszuschließen sind jedoch auch Synthesefehler während der Amplifikation mit der *Vent* DNA-Polymerase nicht.

6.5.2 Screening der Genbank

Nach Klonierung des degenerierten Teils der Genbank in die äußere, konservierte Region wurde ein Screening in dem vorher etablierten *E.coli* Origami™ Expressionssystem auf Tributyrin - Agarplatten durchgeführt. Dabei konnte von 19000 gescreenten Kolonien kein Klon mit Lipaseaktivität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Gruppen. Bei dem 2003 von Zha *et al.* veröffentlichten „assembly of designed oligonucleotides“ (ADO), einer methodisch anderen Form des synthetischen Shufflings, zeigten 1 % der getesteten Klone Lipaseaktivität [116]. Die Diversität dieser Genbank war jedoch deutlich geringer als die in dieser Arbeit generierte. Ness *et al.* konnten in ihrer durch synthetisches Shuffling generierten Genbank sogar 20 % aktive Klone identifizieren. Im Vergleich zu einer durch klassisches Fragmentations - Shuffling entstandenen Genbank der gleichen Parentalgene, die eine Ausbeute von 75 % aktiven Klonen zeigte, war der Anteil an funktionellen Proteinen jedoch auch hier eher gering [3, 98]. Auch in dieser Arbeit war die Diversität eher gering. So waren auf DNA - Ebene nur 53 von insgesamt 681 bp variabel (7,8 %), im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit variierten 190 von insgesamt 1026 bp (18,5 %). Die durchschnittliche Aktivität einer Mutantenbibliothek nimmt mit zunehmender Variabilität ab [105] (Abb. 6.1). Auch die maximal mögliche Verbesserung des besten Klons einer Genbank nimmt zuerst mit steigender Diversität zu; nach Erreichen eines kritischen Punktes sinkt sie jedoch schnell auf Ausgangsniveau ab, um dann mit weiter steigender Diversität auf Null abzusinken, was einem

Aktivitätsverlust aller Mutanten gleich kommt [105, 252] (Abb. 6.1). Da dieser kritische Wert für die Diversität nicht bekannt war, ist eine möglicherweise weite Überschreitung dieses Punktes bei der Planung der CalB - Genbank nicht auszuschliessen.

Das bei der Planung der Genbanksequenz zu Rate gezogene Sequenzalignment der CalB mit der Lipase aus *Burkholderia cepacia* zeigt nur im vorderen Bereich signifikante Sequenzhomologie zwischen den beiden Enzymen. Die daraus resultierende enorme Variabilität der Genbank innerhalb des hinteren Bereiches führte ebenfalls zu einer hohen Diversität der Mutanten, die zu einem Aktivitätsverlust eines großen Prozentsatzes geführt haben könnte.

In dieser Arbeit wurden 19000 Klone nach Aktivität durchmustert. Das entspricht 2×10^{-58} % der theoretischen Größe der Genbank. Bei der Annahme, der kritische Punkt für die Diversität der Genbank wäre noch nicht entscheidend überschritten worden, wäre doch in jedem Fall die durchschnittliche Aktivität der Genbank und somit der prozentuale Anteil an aktiven Klonen eher gering, was möglicherweise eine Durchmusterung einer größerer Anzahl vom Klonen erforderlich machen würde. Eine Durchmusterung der gesamten Genbank scheint jedoch angesichts der hohen Variabilität unmöglich.

Bereits einzelne Punktmutationen können die Aktivität eines Enzyms erheblich beeinflussen, was auch im Speziellen für CalB gezeigt werden konnte [100, 101, 133] (s. 5.3.4). Es ist anzunehmen, dass die meisten Klone der Genbank eine deutlich geringere Aktivität zeigen als der CalB - Wt Klon. Die Expression von CalB - Wt in *E.coli* führte zu einer reproduzierbaren, jedoch geringen Menge an aktivem Protein (s. 5.5.1). In dieser Arbeit wurden sieben der Genbankklone mit überprüfter Gensequenz exemplarisch in *E.coli* Origami™ exprimiert und auf einer SDS-PAGE analysiert (Ergebnisse nicht dargestellt). In keinem der Klone konnte eine Lipaseexpression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass der Expressionslevel der Genbankklone deutlich unter dem der Wt - CalB liegt. Eine sehr viel geringere Ausgangsaktivität des Enzyms würde hier in Verbindung mit einer sehr geringen Enzymmenge die Aktivität möglicherweise unter die Nachweisgrenze für das Lipasescreening auf Tributyrin-Agarplatten senken, so dass die Detektion der Klone mit dem vorhandenen Expressions - und Screeningsystem nicht möglich wäre.

Durch die erstmals in der vorliegenden Arbeit angewandte synthetische Methode zur Exploration des Aminosäure- Sequenzraums konnte eine Genbank mit einer alle bisher veröffentlichten Arbeiten übertreffenden Diversität synthetisiert werden. Durch systematische

Optimierung konnte die angestrebte Sequenz der Genbank zufriedenstellend dargestellt werden.

Die wohl wahrscheinlichste Erklärung für das Fehlen von Klonen mit nachweisbarer hydrolytischer Aktivität liegt in der geringen Expression der CalB-Mutanten in *E.coli*, verbunden mit einer niedrigen Durchschnittsaktivität der Klone, verursacht durch den hohen Degenerationsgrad der Genbank. Eine Optimierung der CalB-Expression in *E.coli* könnte somit auch die Wahrscheinlichkeit, aktive Klone zu detektieren, erheblich verbessern. Auch die Expression der Genbank in einem anderen Expressionssystem wie *P.pastoris* oder *S.cerevisiae* könnte hier möglicherweise Abhilfe schaffen. Die Anzahl an Klonen, die gescreent werden könnten, wäre in solchen Systemen jedoch begrenzt. Während keine Hochdurchsatzscreening - Methoden für *P.pastoris* bekannt sind, wurde in *S.cerevisiae* bereits eine Genbank mit 20000 Klonen durchmustert [84]. Eine weitere Möglichkeit, aktive Klone zu finden, wäre die Verwendung eines effektiveren und sensitiveren Hochdurchsatzscreeningsystems. Durch die Methode des *fluorescence activated cell sorter* (FACS) könnten Millionen von Klonen pro Tag hochsensitiv durchmustert werden [253]. Hierfür müsste das Gen der pH - sensitiven GFP - Mutante pH - Luorin in den Genbankklonen koexprimiert werden. Durch den intrazellulären Umsatz von MPA durch eine aktive CalB - Mutante würde der intrazelluläre pH - Wert sinken, was durch eine Fluoreszenzverschiebung des pH - Luorins direkt nachweisbar wäre.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen geeigneten Biokatalysator für die Enantiomerentrennung des Modellsubstrats 1-Methoxy-2-Propanol (MP) bzw. seines Esters 1-Methoxy-2-Propanolacetat (MPA) bereitzustellen. Das Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf die Evaluierung verschiedener Strategien zur Identifizierung bzw. Optimierung des Biokatalysators. Hierbei sollten sowohl Methoden der *de novo* Klonierung und biochemischer Charakterisierung neuer Enzyme, als auch der gerichteten Evolution und des rationalen Proteindesigns bereits bekannter Biokatalysatoren angewandt werden. Es war bekannt, dass die Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) eine hohe Enantioselektivität vor allem bei der Hydrolyse von MPA zeigte. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war daher die Abschätzung der Nutzbarkeit und Verfügbarkeit von CalB für die Enantiomerentrennung von MP / MPA.

Durch die stetig zunehmende Zahl genomsequenzierter Organismen wird eine Vielfalt putativer Lipasen und Esterasen entdeckt, die oft einzigartige Eigenschaften besitzen. Ein exzellentes Beispiel dafür ist die in dieser Arbeit charakterisierte Carboxylesterase aus *Archaeoglobus fulgidus*, die sich in ihren Eigenschaften erheblich von den bislang beschriebenen Enzymen dieser Klasse unterscheidet. Das ungewöhnliche pH - Spektrum mit signifikanter Aktivität bis zu einem pH - Wert von 12 ist für Enzymkatalysatoren bemerkenswert. Hinsichtlich der Stabilität gibt dieses Enzym jedoch Rätsel auf, da es innerhalb kurzer Zeit die Aktivität fast völlig verliert, und zwar nahezu unabhängig von der Reaktionstemperatur. Das konterkariert die Stabilität der zuvor charakterisierten Carboxylesterase aus diesem thermophilen Organismus und betont den großen Einfluss extrinsischer Faktoren auf die Stabilität von Enzymen. Interessant ist in diesem Zusammenhang vor allem auch die C - terminale Domäne von LipA, die keinerlei Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen aufweist und über deren Funktion nur spekuliert werden kann. Aufgrund der Literaturdaten zu *Archaeoglobus fulgidus* könnte sich hier ein neuer Mechanismus der sequenzspezifischen Stabilisierung durch kompatible Solute oder die evolutive Selektion von Chaperon - Domänen in thermostabilen Enzymen andeuten.

Der Vergleich der beiden eukaryotischen Lipasen aus *Candida antarctica* und *Pseudozyma tsukubaensis* und der untersuchten Mutanten konnte eindeutig zeigen, wie sensitiv heterologe Expressionssysteme auf strukturelle oder sequenzielle Veränderungen reagieren. Die fehlende Expression bei den Mutanten und bei der Lipase aus *P.tsukubaensis* belegen die

Schwierigkeit beim Aufbau von effektiven Expressionssystemen deutlich. Das gilt insbesondere für industrielle Maßstäbe, bei denen Produktionskosten der Biokatalysatoren einen nicht unerheblichen Anteil der Gesamtprozesskosten darstellen. Die Arbeiten an den verschiedenen Biokatalysatoren haben daher gezeigt, dass auf bereits charakterisierte Enzyme oder auf die einzelne Klonierung unbekannter Gene zur Entdeckung geeigneter Biokatalysatoren nur in sehr begrenztem Maße zurückgegriffen werden kann.

Die neu entwickelte Methode der gezielten Gensynthese mit hoch degenerierten Oligonukleotiden kombiniert jedoch die Erkenntnisse aus den Sequenz- und Strukturvergleichen bereits charakterisierter Enzyme mit den Methoden der gerichteten Evolution, die auf dem Prinzip der Zufallsmutagenese und dem anschließenden Durchmustern großer Enzymbibliotheken basiert. Dass trotz der recht großen Anzahl von erzeugten Klonen keine funktionelle Variante in der Bibliothek detektiert werden konnte, hat sicherlich eine Vielzahl von Gründen. Wie die Mutageneseexperimente mit CalB eindeutig gezeigt haben, ist die Expression gerade dieses Enzyms sehr stark von der Sequenz abhängig. Folglich ist die Zahl der überexprimierten Varianten in dem in dieser Arbeit neu etablierten bakteriellen Expressionssystem für CalB vermutlich sehr gering. Zudem war die Aktivität aller charakterisierten Mutanten von CalB im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Die Kombination dieser Faktoren mit einem extrem weit gespannten Sequenzraum führt somit zwangsläufig zu einer drastischen Verringerung der Wahrscheinlichkeit, aktive Klone zu finden. Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz der gerichteten Evolution zeigte somit auch auf, dass bei evolutiven Mutagenesestrategien stets mehrere Variablen existieren, deren Auswirkungen auf das Ergebnis gegeneinander gewichtet werden müssen. So sollte die Variabilität einer Mutantenbibliotheken hoch sein, um Klone mit möglichst neuen Kombinationen von gewünschten Eigenschaften zu erhalten. Gleichzeitig sollte bedacht werden, dass die strukturelle Stabilität der Mutanten mit steigender Variabilität sinkt, so dass der verfügbare Sequenzraum stets begrenzt bleiben muss, um eine zufriedenstellende Ausbeute an funktionellen Klonen zu gewährleisten.

Die Erzeugung einer Bibliothek basierend auf Sequenzen rein bakterieller Lipasen oder Esterasen hätte mit hoher Wahrscheinlichkeit eine größere Erfolgchance, da diese Enzyme sich besser in bakteriellen Wirten heterolog exprimieren lassen. Zudem stehen aus der großen Zahl bereits charakterisierter prokaryotischer Lipasen mehr strukturelle Informationen zur Verfügung, die in das Design der Oligonukleotide einfließen könnten. Dieser Ansatz war jedoch durch die Beschränkung auf ein bestimmtes Substrat, das im Rahmen des Projektes

bearbeitet werden sollte, sowie die geringe Zahl gegen MPA aktiver bakterieller Lipasen und Esterasen von vornherein eingeschränkt.

Trotz dieser Ergebnisse hat die entwickelte Methode jedoch ein enormes Potential als Ergänzung zu den bereits etablierten Methoden zur Verbesserung biokatalytischer Eigenschaften. Der enorme Sequenzraum, der auf diese Weise der industriellen Biotechnologie zugänglich gemacht wird, stellt den Aufwand von Umweltscreenings wie es bei Firmen wie Diversa (San Diego, USA) oder BRAIN (Zwingenberg, Deutschland) betrieben wird, deutlich in Frage.

Insgesamt konnte diese Arbeit zeigen, dass es zur enzymatischen Enantiomerentrennung von MPA im Moment keinen Ersatz zu CalB gibt. Durch die Etablierung der CalB - Expression in *E.coli* wurde jedoch die entscheidende Voraussetzung zur Optimierung der noch verbesserungswürdigen Enantioselektivität, vor allem in der Umesterungsreaktion, sowie der noch geringen Thermostabilität geschaffen.

8 Material und Methoden

8.1 Materialien

8.1.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Pipettenspitzen, 15 + 50 ml Reaktionsgefäße	Greiner, Nürtingen
0.5, 1.5 + 2.0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Millipore, Molsheim, Frankreich
Ultrafiltrationsmembranen	Millipore, Bedford, USA
Elektroporationsküvetten	Biorad, Hercules, USA
1,5 ml Messküvetten	Multimed, Kirchheim unter Teck
Multiscreen® Assay System (Nucleic A, Mananly 10, 50) Mikrotiterplatte	Millipore, Molsheim, Frankreich
Petrischalen quadratisch 22 cm Ø	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen rund 9,4 cm Ø	Greiner, Nürtingen

8.1.2 Laborchemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton, Acetonitril, Ethanol 98% für die Analyse, Kupfersulfat-Pentahydrat, Natriumcarbonat, 2-Propanol, Schwefelsäure, Silbernitrat, Trichlormethan	Riedel-deHaën, Seelze
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 30%, Bacto-Pepton, Pepton, Roti®-Phenol/Chloroform, Rotiphorese NF-Harnstoff, Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid,	Roth GmbH, Karlsruhe
Agar, Ammoniumhydroxid, Ammoniumperoxidsulfat (APS), Ammoniumsulfat, Ampizillin Natriumsalz, Biotin, Borsäure, Bromphenolblau, Butylacetat, Calciumchlorid Dihydrat, Coomassie Brilliant Blue R250, Dimethylsulfoxid (DMSO), di-Kaliumhydrogenphosphat, di-Natriumhydrogenphosphat, Eisensulfat-Heptahydrat, Essigsäure-2-Phenylethylacetat, Ethidiumbromid, Ethylbutyrat, Ethyldecanoat, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethyl-3-Hydroxybutyrat, Ethylpropionat, Formamid, D-Glucose Monohydrat, Glycin, Gummi Arabicum, Hefeextrakt, Imidazol, Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG), Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kobaltchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Malzextrakt, Manganchlorid, β-Mercaptoethanol, 1-Methoxy-2-Propanol, 1-Methoxy-2-Propanolacetat, Methylacetat, Methylbutyrat, Methylcaproat, Methylmyristat, Methyloleat,	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

Methylpropionat, Methyl-(R)-3-Hydroxybutyrat, 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), α -Naphthylacetat, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumhydroxid, Natriumiodid, Natriummolybdat-Dihydrat, N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-2-ethansulfonsäure (HEPES), Nickelchlorid, 4-Nitrophenol (pNP), 4-Nitrophenylacetat (pNPA), 4-Nitrophenyl-palmitat (pNPP), N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Ölsäure-Methylester, Olivenöl, Orange-G, ortho-Phosphorsäure, Pentanon, Phenol, Phenylacetat, β -Propiolacton, Propylbutyrat, Rhamnose Monohydrat, Rubidiumchlorid, Salzsäure 35 %, Sorbitol, Tributyrin, Tricaprylin, Vinylacetat, Wasser für die Molekularbiologie, Xylencyanol, Zinkchlorid	
Agarose, Harnstoff, 1 kb DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder, 50 bp DNA Ladder	Gibco, Eggenstein
Antischaum, Dextranblau 2000, Fast Red TR, Triton-X-100, (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure (MES), Oligonukleotide,	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BioRad Proteinassay Kit, SDS-PAGE Proteinstandard (LMW)	BioRad Laboratories, Richmond, USA
Essigsäure 100%, Glycerol, Methanol, Tris(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol), Tween 20	Roche, Mannheim
Formaldehyd 37%	Wienand KG, Köln
PAGE-PLUS Konzentrat	Amresco, Solon, USA
Sephadex™ G-50 Superfine	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden
Trypton	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Mangansulfat-Monohydrat, Wasser HPLC-rein	Merck, Darmstadt
Desoxynukleotidphosphate (dNTPs, 100 mM)	Promega, Madison, USA
Zeozin™	Invitrogen, Leek, Niederlande

8.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophorese	
DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell, Mini Sub Cell GT, Power Pac 3000, Power Pac 300, Modell200/2.0 Power Supply	BioRad, Hercules, USA
Brutschränke	
WTE	Binder, Tuttlingen
UM500	Memmert, Schwabach
DNA-Sequenzierung	

ABI Prism™ 377 DNA Sequencer Applied	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Elektroporation	
Gene Pulser®, Pulse Controller	BioRad, Hercules, USA
Fermentation	
Labfors	Infors, Bottmingen, Schweiz
Gaschromatographie	
CP-3800 Gaschromatograph	Varian, Palo Alto, USA
Gefriertrocknung	
Lyovak GT-2	Finnaqua
Homogenisator	
Ultra Turrax T25 mit Disperierstab S25N-25F	Janke & Kunkel, Staufen
Inkubatoren	
HA-Schüttelinkubator	Infors, Botmingen, Schweiz
SDS-PAGE	
Modell583 Gel Dryer	BioRad, Hercules, USA
Minigel-Twin G42	Whatman Biometra, Göttingen
PCR	
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	
Digital pH Meter pH525	WTW, Weilheim
pH-Stat	
Impulsomat 614, pH-Meter 620, Dosimat 665, Thermostatierbare Rührzelle	Metrohm, Filderstadt
Kryostat C1	Haake
Flachsreiber	Linseis, Selb
Photometer	
Fluorostar	BMG
UV/VIS-Spektrophotometer Ultrospec 3000	Amersham Bioscience, Freiburg
Proteinaufreinigung	
Äkta Explorer	Amersham Bioscience, Freiburg
Rotoren	
A-4-62	Eppendorf, Hamburg
SS-34, SLA-3000	Sorvall, Langenselbold
Thermomixer	
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Waagen	
Basic, MC1 Research RC 210 D	Sartorius, Göttingen
HF-2000G	AND
Zellaufschluss	
Branson Sonifier 250	Branson, Danbury, USA

Zentrifugen

Eppendorf Zentrifuge 5417 C, Eppendorf Zentrifuge 5415 R, Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Universal 30 F	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments
Concentrator 5301 ("Speedvac")	Eppendorf, Hamburg

8.1.4 Datenbanken und *online* Programme

Verwendung	Datenbank/Programm	URL
Allgemeine Sequenzrecherche	TIGR Data Base	http://www.tigr.org/tdb/
	EMBL Data Base	http://www.ebi.ac.uk/embl/
	NCBI Data Base	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/index.html
Sequenz-Alignment	Clustal X	http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html
	T-Coffee	http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi
Struktur-Daten	Brookhaven Protein Data Base (PDB)	http://www.rcsb.org/pdb
Patentrecherche	Europe's network of patent databases	http://gb.espacenet.com/
Sequenzhomologiesuche	BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi
Sequenz-/ Strukturvergleiche von Hydrolasen	Lipase Engineering Database	http://www.led.uni-stuttgart.de
Berechnung von Oligonukleotideigenschaften	Oligocalculator	http://www.basic.nmw.edu/biotools/oligocalc.html
Sekundärstrukturvorhersagen	Predict protein	http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html

8.1.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Klonierungen	
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP), T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Kommerzielle Hydrolasen	
Chirazyme E1-lyo, Chirazyme L1-lyo, Chirazyme L2-lyo, Chirazyme L3-lyo, Chirazyme L5-lyo	Roche, Mannheim
Lipase F-API5	Amano, Nagoya, Japan

PCR Anwendungen	
DyNAzyme EXT™ DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Eppendorf, Hamburg
<i>Vent</i> DNA Polymerase	New England Biolabs, USA
Restriktionsendonukleasen	
<i>Bam</i> HI, <i>Dpn</i> I, <i>Eco</i> 52I, <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III, <i>Mun</i> I, <i>Nde</i> I, <i>Not</i> I, <i>Sac</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Weitere Enzyme	
Big Dye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Lysozym, Proteinase K	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
RNaseA	QIAGEN, Hilden

8.1.6 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden entsalzt ohne weitere Aufreinigung von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die Sequenzen sind jeweils von 5' nach 3' angegeben.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
Klonierung und Charakterisierung von <i>Archaeoglobus fulgidus</i> lipA		
AFLIP-NdeI-f	TAGGTAATTCACATATGAGAGGGCTTGCCGTGCT GGTG	Klonierung
AFLIP-BamHI-b	CTTCTGGAGGATCCAGGAGTGGAGATTGAGTTCT TTCC	"
AFLIP-BamHI-His-rev	GCGGATCCTCAATGGTGATGGTGATGGTGAATGT AATCCGAAAACCTGCACG	Anfügen eines His-Tags
AFLIP_S136C_f	CTGGTCGGGCACTGCATGGGGACGTTTTTCTGG	Mutagenese von lipA
AFLIP_S136C_rev	CCAGGAAAACGTCCCCATGCAGTGCCCGACCA G	"
AFLIP_D163N_f	GAAGGTTGCGCACCTCATTCTTCTTAACGGCGTC TGGGGGGTTGA	"
AFLIP_D163N_rev	TCAACCCCCAGACGCCGTTAAGAAGAATGAGG TGCGCAACCTTC	"
AFLIP_D169N_f	TTGACGGCGTCTGGGGGGTTAATGCTCCCGAAGG GCTTCCGAC	"
AFLIP_D169N_rev	GTCGGAAGCCCTTCGGGAGCATTAACCCCCAG ACGCCGTCAA	"
AFLIP_H210N_f	CCAACGTTTACTTCAACAACATGACGAACGTTCA GCTCTGCACTTCTCC	"
AFLIP_H210N_rev	GGAGAAGTGCAGAGCTGAACGTTTCGTCATGTTGT TGAAGTAAACGTTGG	"
AFLIP_Y244stop_f	GACATAGTGCCGAGGATGGAGATTAAGTGAAG GTTAAGGGGAAGTTTCTG	"
AFLIP_Y244stop_rev	CAGAACTTCCCCTTAACCTTCACTTAATCTCCA TCCTGCGGCACTATGTC	"
Klonierung der Lipase B aus <i>Candida antarctica</i> und Lipase B aus <i>Pseudozyma tsukubaensis</i>, Mutagenese der <i>Candida antarctica</i> Lipase B		
CalB_EcoRI_f	GATGAATTCCTACCTTCCGGTTCGGACC	Klonierung von <i>calB</i>
CalB_NotI_rev	TTTTCTTTTTCGGGCCGCTCAGGGGGTGACGATG CC	"

Ptsuk_variant1_EcoRI_f	GATGAATTCACCTCCCTTCGGGCTCGGACCC	Klonierung der Ptsuk Lipase
Ptsuk_variant2_EcoRI_f	GATGAATTCACYCCYTCGGGHTCGGAYCCYCG	"
Ptsuk_variant3_EcoRI_f	GATGAATTCATTGCCYAGCGGHAGCGAYCCYCG	"
Ptsuk_variant1_NotI_rev	TTTTCTTTTTCGGCCGCTCAGAGGATGATACCC GAGCAGGTC	"
Ptsuk_variant2_NotI_rev	TTTTCTTTTTCGGCCGCTCARAGGATGATRCCV GAGCAGGTC	"
Ptsuk_variant3_NotI_rev	TTTTCTTTTTCGGCCGCTCAGAAGATGATRCCG CTGCAGGTC	"
CalB_A281F_f	GCTCCTGGCGCCGTTTGCTGCAGCCATCGTG	Mutagenese von <i>calB</i>
CalB_A281F_rev	CACGATGGCTGCAGCAAACGGCGCCAGGAGC	"
CalB_A281L_f	GCTCCTGGCGCCGTTTGCTGCAGCCATCGTG	"
CalB_A281L_rev	CACGATGGCTGCAGCCAACGGCGCCAGGAGC	"
CalB_A281V_f	GCTCCTGGCGCCGTTTGCTGCAGCCATCGTG	"
CalB_A281V_rev	CACGATGGCTGCAGCAAACGGCGCCAGGAGC	"
CalB_G39A_f	CATCCTTCTCGTCCCCGCAACCGGCACCACAGGT C	"
CalB_G39A_rev	GACCTGTGGTGCCGGTTGCGGGGACGAGAAGGA TG	"
CalB_P260stop_f	GGCATTACGGACTGCAACTAACTTCCCGCCAATG ATCTG	"
CalB_P260stop_rev	CAGATCATTGGCGGGAAGTTAGTTGCAGTCCGTA ATGCC	"
CalB_P280stop_f	CTGCGCTCCTGGCGTAAGCGGCTGCAGCCATC	"
CalB_P280stop_rev	GATGGCTGCAGCCGTTACGCCAGGAGCGCAG	"
CalB_P289stop_f	GCCATCGTGGCGGGTTAAAAGCAGAACTGCGAG CC	"
CalB_P289stop_rev	GGCTCGCAGTTCTGCTTTTAACCCGCCACGATGG C	"
CalB_Q247stop_f	GCTCCACCACGGGCTAAGCTCGTAGTGCAGACTA TG	"
CalB_Q247stop_rev	CATAGTCTGCACTACGAGCTTAGCCCGTGGTGGA GC	"

Synthese und Klonierung von *Moraxella* sp. TA144 *lip1*

TA144_0f	TATGATGATCCGGATAGCCGCGCCGCACAGTTGA	Synthese
TA144_0rev	ATGCAGCACTGGATAACATGATTGCT AGCAATCATGTTATCCAGTGCTGCATTCAACTGT GCGGCGCGGCTATCCGGATCATCATA	"
TA144_1f	TTGGGGCTTTGTCGTTATCACCATCAATACCAAC TCTATCTATGATGATCCGGATAGCC	"
TA144_1rev	CCAACCGTTTCGGATCAATCATGCTGCCGACGGT ATCATCAGCAATCATGTTATCCAGTGC	"
TA144_2f	ACGAAAACCTATCAAGTGGTGGGGACCGCGTC TGGCTTCTTGGGGCTTTGTCGTTATC	"
TA144_2rev	TTTCAGCGCGCCGCGCCACCCATTGACCAGCCA ATAGCGCCCAACCGTTTCGGATCAAT	"
TA144_3f	GTTAGGCGCTATTGCCGTGGTTCCGGGTTACGTT TCTTACGAAAACCTCTATCAAGTGGTG	"
TA144_3rev	CCAGCGGCATAATGGCTCGCACGGTGCTGCGTTC CGTTGCCAGTTTCAGCGCGCCGCGC	"
TA144_4f	TGGTACGATTCACCTACCCGACCAACGCTAGCGGC TGCGGTCTGTTAGGCGCTATTGCCG	"
TA144_4rev	GTCGGCGTTTTCACTTCGCCATAGCTTTTATCATG ATACGGCGCCAGCGGCATAATGGC	"
TA144_5f	ACCAAACGCATTTTCGCGCCAGTCGGCGAAAGGT TTCGGTGGTGGTACGATTCACCTACCC	"
TA144_5rev	TGGTTTCAGCAATCCGATCATCTTCGCAGGCAAT GACCAAGGTCGGCGTTTTCACTTCG	"

TA144_6f	GCTCTGTCAGATACCCGTGATAATGGCCCGTTTT CTATCCGTACCAAACGCATTTTCGCGC	"
TA144_6rev	GCCAATGGCATTTTTATAAAACGCGTTGGCATAT TTTTTGGTTTCAGCAATCCGATC	"
TA144_7f	AACGCCGTCAGATTGTATTGCTGATAGCAAAATT ACTGCAGTTGCTCTGTCAGATACCCG	"
TA144_7rev	GTGGCTGCCATTGTTCACTTCAACTTTCATTTTCG GGCCAATGGCATTTTTATAAAACG	"
TA144_8f	TGAAGCTACGGTTAGCTCAACCAAAAAAGCATT ACCGGCAACGCCGTCAGATTGTATTG	"
TA144_8rev	TTGCTTAACAGAATTTTCGTTAAAGCGGTAGCTCG GACAAAAGTGGCTGCCATTGTTTAC	"
TA144_9f	GAAGTTACCTTATCTGAAACCACGGTTAGCTCAA TTAAATCTGAAGCTACGGTTAGCTCA	"
TA144_9rev	TATTAATATAACGCTGCATCCACGCGATGCCCGG TTTGCTTAACAGAATTTTCGTTAAAG	"
TA144_10f	TCACGGGCGCGTTGGTTTTTCTATTCCGACCTTA GCTGAAGTTACCTTATCTGAAACCA	"
TA144_10rev	GTTGGCACATAAGAATTTATCGAAACGCGTATCA TTATTAATATAACGCTGCATCCAC	"
TA144_11f	ATGTTTATCATGATCAAAAAATCTGAACTGGCAA AAGCTATTATCGTCACGGGCGCGTTGG	"
TA144_11rev	CATAAGCTGAGATCCGCGGGCTTTTGCTATAGTT TTCGTTGGCACATAAGAATTTATCG	"
TA144_NdeI_12F	GGGAATTCATATGTTTATCATGATCAAAA	Synthese und Klonierung
TA144_BamHI_12rev	CGGGATCCTTACGGGCAATCTTTATAATCATAAG CTGAGATACGCGG	"
TA144_Del_A386_f	CGGGATCCTTACGGGCAATCTTTATAATCATAAG CTGAGATACGCGG	Entfernen der Deletion A386
TA144_Del_A386_rev	CAGACGCGGTCCCCACCATTTCGATAGAGTTTTTCG TAAGAAACG	"
TA144_V55A_f	GCATTACCGGCAACGCCGTCAGA	Entfernen der Mutation V55A
TA144_V55A_rev	TCTGACGGCGTTGCCGGTAATGC	"
Synthetisches Shuffling: Klonierung von <i>calB</i>-Wt in pUC18		
CalB_pUC18_EcoRI_f	GATGAATTCGCTACCTTCCGGTTCGGACC	Klonierung von <i>calB</i> in pUC18
CalB_pUC18_NdeI_rev	CCACATATGTCAGGGGGTGACGATGCC	"
Synthetisches Shuffling: Synthese des degenerierten Mittelstücks		
Genbank_0f_1	GTTCTGGCCGSCCCACTCVMMKSCCTGKSCVBCT CTVBCCCAKSCVBCTDSVAAVAABVCACCGGTTT TGSCCTGACC	Synthese des Mittelstücks (1.)
Genbank_0rev_1	GGTCAGGSCAGAACCGGTGVBTTBTTBSHAGVBG SMTGGGVVBAGAGVBGSMCAGGSMKKBGAGTGG GSCGGCCAGAAC	"
Genbank_1f_1	GTTGACCGVCBCATGGSCCTTCKSCCCAGATTDSV ATKSCVMMGTTCTGGCCGSCCCACTC	"
Genbank_1rev_1	TGGGACGAKTTGGGTTAGACCGSMGVBGTTKYN SABGSMKKBGGTCAGGSCAGAACCGGT	"
Genbank_2f_1	TCTCAGGGTGGTCTGGTCKSCVMMTDSVBCVTSV BCVYSVYSCCAVMMVBCANAKSCVMMGTTGACC GCVBCATGGSC	"
Genbank_2rev_1	AATTTTCATCGGTGGCGGWTACAGSYNKKBSRBT GGGACGAKTTGGGTTAGACCG	"
Genbank_3f_1	STCTWCGCCGGCWCCGGTNRSVMMAAAVBCCCA VBCVBCVBCTDSTCTCAGGGTGGTCTGGTC	"
Genbank_3rev_1	RBGTAGGAGSCATBCAGTGGGSMKKBGMSRBK KBTGGSYNSRBAATTTTCATCGGTGGCGGWTAC	"

Genbank_4f_1	CAAGTTAACACCGAARATVYVSVCNRSVYVSBCV MMVBCSTCTWCGCCGGCWCCGG	"
Genbank_4rev_1	CCGGCGTGGTCGAGGASGAAGNGTGGGSMGSMG VBGVBKKBGSMKKBSRBGTBGTBGBVKKBSRBSR BGTAGGAGSCATBCAGTGGG	"
Genbank_5f_1	CTGGSCACKSCCCAGTTTGGVBCKSCCCACCAC CATDSVYSCWANRSGATVMMCAAGTTAACACCG AARAT	"
Genbank_5rev_1	TCTACCTACAACGYNCGAGAATTGKKBSRBSABK KBACCGGCGTGGTCGAGGASGAAG	"
Genbank_0f_2	GTTCTGGCCGSCCACTCVMMSKSCCTGKSCVBCT CTVBCCCAKSCVBCTGGVA AVAAVBCACCGGTTT TGSCCTGACC	Synthese des verbesserten Mittelstücks (2.)
Genbank_0rev_2	GGTCAGGSCAGAACCGGTGVBTTBTTBCCAGVBG SMTGGGV BAGAGVBGSMCAGGSMKKBGAGTGG GSCGGCCAGAAC	"
Genbank_1f_2	GTTGACCGVCBCATGGSCCTTCKSCCCAGATTWCV ATKSCVMMGTTCTGGCCGSCCACTC	"
Genbank_2f_2	TCTCAGGGTGGTCTGGTCKSCVMMTGGVBCVTSV BCVYSVYSCCAVMMVBCANAKSCVMMGTTGACC GCVBCATGGSC	"
Genbank_3f_2	STCTWCGCCGGCWCCGGTNRSMMAAAVBCCCA VBCVBCVBCTGGTCTCAGGGTGGTCTGGTC	"
Genbank_5f_2	CTGGSCACKSCCCAGTTTGGVBCKSCCCACCAC CATWCVYSCWANRSGATVMMCAAGTTAACACC GAARAT	"
Genbank_0f_3	GTTCTGGCCGSCCACTCVMMSKSCCTGKSCGTTT CTVBCCCAKSCGTTTGGVAACAGVBCACCGGTTT TGSCCTGACC	Synthese des verbesserten Mittelstücks (3.)
Genbak_0rev_3	GGTCAGGSCAGAACCGGTGVBCTGTTBCCAAACG SMTGGGV BAGAAACGSMCAGGSMKKBGAGTGG GSCGGCCAGAAC	"
Genbank_1f_3	GTTGACCGVCBCATGGSCCTTCKSCCCAGATTWCV ATKSCACCGTTCTGGCCGSCCACTC	"
Genbank_1rev_3	TGGGACGAKTTGGGTTAGACCGSMGVBGTTACG SABGSMKKBGGTGAGSCAGAACCGGT	"
Genbank_3rev_3	GTAGGAGSCATBCAGTGGGSMKKBGSMRBSRBSR TGGSYNAACAATTTTCATCGGTGGCGWGTACAG	"
Genbank_4rev_3	CCGGCGTGGTCGAGGASGAAGNGTGGGSMACAG VBGVBKKBGSMKKBSRBGTBGTBGBVKKBSRBSR BGTAGGAGSCATBCAGTGGG	"
Genbank_5f_3_MunI	GGTCCACAATTGGSCACKSCCCATGTTGGVBCK SCCACCACCATWCVYSCTGAACGATVMMCAAG TTAACACCGAARAT	"
Genbank_5rev_3_Eco52I	CTCTCCGGCCGATCTACCTACAACGYNCGAGAAT TGKKBSRBSABKKBACCGGCGTGGTCGAGGASGA AG	"
Synthetisches Shuffling: Synthese der konservierten Außenbereiche		
CalB_kons_0f	GTCCACAGTCTTTCGACTCTAACTGGATTCCACT GTCAACCCAATTGCTAAGCCTTAGCC	Synthese der konservierten Außenbereiche
CalB_kons_0rev	CTACGAGCCTGACCAGTGGTGGAAACGCACGGCC GGGCTAAGGCTTAGCAATTGGG	"
CalB_kons_1f	CATCCTCTGTTTCTAAACCAATTCTCCTGGTTCCA GGTACCGGTACCACCGGTCCACAGTCTTTCGACT C	"
CalB_kons_1rev	GATCATTGGCTGGAAGAGGGTTGCAATCGGTAA TACCATAATCTGCACTACGAGCCTGACCAG	"
CalB_kons_2f	CCAAAATCTGTTCTGGATGCAGGTCTGACCTGTC AGGGTGCTCTCCATCCTCTGTTTCTAAACC	"

CalB_kons_2rev	GCAGCTGCTGGGGCCAGCAGGGCAGCAGCGSMG TCCTTCTGCTCCGAGTCAGATCATTGGCTGGAA GAGG	"
CalB_kons_3f	GCCACCCCATTGGTTAAACGACTGCCATCTGGTW CAGACCCAGCCTTTTCTCAGCCAAAATCTGTTCT GGATG	"
CalB_kons_3rev	TGGCATCAGATCTGGCTCGCAGTTCTGTTTTGGA CCTGCCACGATGGCTGCAGCTGCTGGGGCC	"
CalB_kons_4f_EcoRI	GGAATTCTCATATGAAACTGCTGTCTCTGACCGG TGTTGCTGGTGTCTGGCTACCTGTGTTGCAGCC ACCCATTGGTTAAAC	Synthese u. Klonierung der konservierten Außenbereiche
CalB_kons_4rev_HindIII	CCCCAAGCTTTCATGGGGTAACAATACCGGAGC AGGTACGTTTACCAACTGCAAATGGACGGGCGT ATGGCATCAGATCTGGC	"
CalB_ohne_sig_f_EcoRI	CCGGAATTCTCTGCCATCTGGTTCTGATC	Amplifikation der CalB Außenbereiche ohne Signalsequenz
CalB_ohne_sig_rev_Hind III	GCCAAGCTTTCATGGGGTAA	"
CalB_kons_D122V_f	CTGACTCCGGAGCAGAAGGTTGCCGCTGCTGCC TGCTG	Entfernen der Mutation V122D
CalB_kons_D122V_rev	CAGCAGGGCAGCAGCGCAACCTTCTGCTCCGG AGTCAG	"
Sequenzierprimer		
5'-AOX_f	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	pPICZ α A-Konstrukte
3'-AOX_rev	GCAAATGGCATTCTGACATCC	"
α -Faktor_f	TATTGCCAGCATTGCTGC	"
M13_f	GTAAAACGACGGCCAG	pUC18 / pCR [®] 2.1- TOPO Konstrukte
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC	"
pJOE_f	GGTCGACGCTCTCCCTTATG	pJOE-Konstrukte
pJOE_rev	GCAGTTCCTACTCTCGCATG	"
CalB1_f	GTGCTTACCTGGTCCAGG	CalB-Konstrukte
CalB2_rev	CCATAGTCTGCACTACGAGC	"

8.1.7 Stämme

Spezies	Stamm	Genotyp	Anbieter
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	supE44 Δ lacU169(Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi1relA1	Clontech, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-lhsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lac ^q Z Δ M15 Tn 10 (Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i>	One Shot [®] TOP10	F_mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen, Leek, Niederlande
<i>Escherichia coli</i>	Origami [™]	Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac ⁺ (lacI ^q)pro] gor522::Tn10 (Tc ^R) trxB::kan	Novagen, Darmstadt

<i>Escherichia coli</i>	AD494	Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoAPvuII phoR Δ malF3 F' [lac ⁺ (lacI ^q)pro] trxB::kan	Novagen, Darmstadt
<i>Candida antarctica</i> (<i>Pseudozyma aphidis</i>)	DSM 70725	Wt	DSMZ, Braunschweig
<i>Pseudozyma</i> <i>tsukubaensis</i>	DBVPG 6988	Wt	DBVPG, Perugia, Italien
<i>Pichia pastoris</i>	X33	Wt	Invitrogen, Leek, Niederlande

8.1.8 Plasmide

Plasmid	Referenz/Herkunft
pCR [®] 2.1-TOPO	Invitrogen, Leek, Niederlande
pCYTEXP1	Belev <i>et al.</i> [232]
pJOE	J.Altenbuchner, Universität Stuttgart
pPICZ α A	Invitrogen, Leek, Niederlande
pUC18	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

8.1.9 Verwendete “Kits”

Bezeichnung	Hersteller
GenElute [™] Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
pCR [®] 2.1-TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande

8.1.10 Medien

Buffered Glycerol-complex Medium for Yeast (BMGY)

10 g/l Hefeextrakt

20 g/l Bacto-Pepton

ad 800 ml H₂O

autoklavieren; Zugabe von 100 ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 (autoklaviert)

100 ml 10 % Glycerin (autoklaviert)

2 ml 0,02 % Biotin (sterilfiltriert)

Buffered Methanol-complex Medium for Yeast (BMMY)

10 g/l Hefeextrakt

20 g/l Bacto-Pepton

ad 900 ml H₂O

autoklavieren; Zugabe von 100 ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 (autoklaviert)

2 ml 0,02 % Biotin (sterilfiltriert)

5 ml Methanol

Luria-Bertani Medium (LB-Medium) [254]

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

autoklavieren

LB-Agarplatten

LB-Medium + 15 g/l Agar

autoklavieren; Zugabe von Antibiotikum / Induktor und Giessen in Petrischalen

LB-Tributylin-Agarplatten

LB-Medium + 15 g/l Agar + 1 % Tributyrin

10 min am Ultraturrax (24 000 rpm) homogenisieren

autoklavieren; Zugabe von Antibiotikum / Induktor und Giessen in Petrischalen

PTM1-Spurensalzlösung

6 g CuSO₄ x 5 H₂O

0,2 g Na₂MoO₄ x 2 H₂O

0,08 g NaI

65 g FeSO₄ x 7 H₂O

3 g MnSO₄ x H₂O

0,2 g Biotin

0,5 g CoCl₂

30 ml 6N H₂SO₄

20 g ZnCl

ad 1l H₂O

0,02 g H₃BO₃

sterilfiltrieren

YM Medium (Universales Hefemedium)

3 g/l Hefeextrakt

3 g/l Malzextrakt

5 g/l Pepton

autoklavieren; Zugabe von 100 ml steriler Glukoselösung (100 g/l)

YPD Medium (Medium zur Kultivierung von *P.pastoris*)

10 g/l Hefeextrakt

20 g/l Bacto Pepton

ad 800 ml H₂O

autoklavieren; Zugabe von 200 ml steriler Glukoselösung (100 g/l)

YPDS Transformationsmedium Agarplatten

YPD-Medium + 15 g/l Agar + 1 M Sorbitol

autoklavieren; Zugabe von Antibiotikum und Giessen in Petrischalen

8.1.11 Stammlösungen

Ampizillin-Stammlösung

100 mg/ml Ampizillin-Natriumsalz in demineralisiertem H₂O, sterilfiltriert. Lagerung aliquotiert bei -20°C.

IPTG-Stammlösung

1 M IPTG in demineralisiertem H₂O, sterilfiltriert. Lagerung aliquotiert bei -20°C.

Rhamnose-Stammlösung

20 % (w/v) Rhamnose-Monohydrat in demineralisiertem H₂O, sterilfiltriert. Lagerung bei Raumtemperatur.

ZeozinTM-Stammlösung

100 mg/ml ZeozinTM in demineralisiertem H₂O, sterilfiltriert. Lagerung aliquotiert bei -20°C.

8.2 Methoden

8.2.1 Molekularbiologische Methoden

8.2.1.1 Isolierung und Reinigung von DNA

8.2.1.1.1 Isolierung von Plasmid DNA im kleinem Maßstab

Die Isolierung plasmidischer DNA aus *E.coli* Zellen erfolgte durch alkalische Lyse der Zellen, gefolgt von einer Aufreinigung der DNA durch Chromatographie an Anionenaustauscher - Säulen. Zur Isolierung kleiner Mengen an DNA (bis zu 5 µg) wurde das GenElute™ Plasmid Miniprep Kit von Sigma (Saint Louis, USA) verwendet.

1-4 ml einer *E.coli* Übernachtskultur wurden zentrifugiert (RT, 5000 rpm, 3 min) und das Zellpellet in 200 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lysispuffer kam es zur Lyse der Zellen und im Anschluss durch Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer zur Ausfällung von Proteinen und genomischer DNA. Nach Zentrifugation (RT, 14000 rpm, 10 min) wurde der geklärte Überstand auf die Anionenaustauschersäule dekantiert. Die an die Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA wurde gewaschen und in 100 µl Wasser eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

8.2.1.1.2 Isolierung von Plasmid DNA in größerem Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab (bis zu 100 µg) erfolgte mit dem QIAgen Plasmid-Midi Kit, QIAgen, Hilden nach Angaben des Herstellers.

8.2.1.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus Hefen

10 ml einer Hefekultur wurden bei 2500 rpm und 4°C 3 min abzentrifugiert und in 500 µl PBS + 1 mg/ml Proteinase K resuspendiert. Nach 20 min Inkubation bei 65°C wurden 500 µl Glasperlen eines durchschnittlichen Durchmessers von 0,75-1,00 mm zugegeben und 30 min in der Retschmühle bei 4°C geschüttelt. Die Glasperlen und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (5 min 14000 rpm 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 150 µl SDS-TE wurde nochmals 5 min bei 65°C inkubiert. Nun wurden 150 µl 5 M Kaliumacetat zugegeben und 40 min auf Eis inkubiert. Die DNA wurde 2x mit Isopropanol gefällt und in der Speedvac getrocknet. Das Pellet wurde schließlich in 100 µl TE + RNaseI (400 µg/ml) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

TE-Puffer:

Tris	100 mM
EDTA	10 mM
	mit HCl auf pH 7,5 einstellen

SDS-TE:

TE + 2 % (m/v) SDS

PBS-Puffer:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O	ad 1l

8.2.1.1.4 Ethanol-Präzipitation von DNA

Verunreinigte DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5.5) gemischt und anschließend mit drei Volumen Ethanol (100 %, -20°C) versetzt. Nach Präzipitation der DNA (-20°C, 30 min) wurde zentrifugiert (4°C, 14000 rpm, 10 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, die DNA in der Speedvac getrocknet (40°C, 30 min), in Wasser gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

8.2.1.1.5 Isopropanol-Präzipitation von DNA

Die verunreinigte DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung versetzt und dann mit 1/1 Volumen Isopropanol gemischt. Die DNA wurde 10 min bei -20°C präzipitiert und 10 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 70 % (v/v) Ethanol resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (1 min 1400 rpm 4°C) wurde das Pellet in der Speedvac 10 min bei 40°C im Vakuum getrocknet und dann in H₂O (für die Molekularbiologie) aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

8.2.1.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten mittels QIAquick® PCR Purification Kit

Zur schnellen Aufreinigung vor allem kleiner DNA-Mengen aus Restriktionsansätzen oder PCRs wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die DNA-Lösung wurde hierfür in fünf Volumen PB Puffer aufgenommen und über die dem Kit

beigefügten Säulchen zentrifugiert (1 min 14000 rpm RT). Die an der Säulenmembran bindende DNA wurde durch Zentrifugation mit 750 µl PE Puffer gewaschen und die Membran im Anschluss durch nochmalige Zentrifugation getrocknet. Zur Elution wurden 50 µl H₂O_(für die Molekularbiologie) auf die Membran pipettiert und 1 min bei 14000 rpm und RT abzentrifugiert.

8.2.1.1.7 Elektrophoretische Trennung von DNA

Zur Analyse oder gezielten Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Zur Darstellung von Fragmenten < 500 bp wurden 2 %ige, zur Darstellung von Fragmenten > 500 bp wurden 1 %ige Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Zum Anfärben der DNA wurde der Agaroselösung Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Die DNA-Lösung wurde mit 1 – 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in die Gelkammern pipettiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V (analytische Gelelektrophorese) bzw. 80-100 V (präparative Gelelektrophorese) in TAE-Puffer. Nach der Auftrennung wurden die Gele mit Hilfe des LAS-1000 CH (Fuji Film, Japan) fotografiert.

TAE-Puffer (50x):

Tris	242 g
Essigsäure 100 %	57 ml
EDTA	0,5 M
H ₂ O	ad 1l
	auf pH 8,0 einstellen

DNA-Probepuffer:

EDTA	60 mM
Xylencyanol	0,05 % (m/v)
Orange G	0,2 % (m/v)
Glycerol	60 % (v/v)

8.2.1.1.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die DNA enthaltenden Gelstücke wurden hierfür in einem Puffer bei 50°C aufgelöst und die DNA im Folgenden an

eine Kieselgelmatrix gebunden. Nach Waschen der Matrix kann die DNA in H₂O eluiert werden. Für Fragmente in 2 %igem Agarosegel wurde die doppelte Menge an Puffer eingesetzt.

8.2.1.2 In vitro Manipulation von DNA

8.2.1.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur analytischen Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurden 1 - 2 µl Plasmid-DNA mit 0,5 U des entsprechenden Enzyms in 10 µl Gesamtvolumen mit dem den Angaben des Herstellers entsprechenden Reaktionspuffer geschnitten. Die Inkubation erfolgte 2 h bei enzymespezifischer Temperatur. Zum präparativen Restriktionsverdau wurden 0,1 – 5 µg DNA mit 1 - 2 U des entsprechenden Enzyms nach Herstellerangaben geschnitten.

8.2.1.2.2 Behandlung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Um die Religation geschnittener Plasmid-DNA zu verhindern wurden die 5' ständigen Phosphatreste durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) abgespalten. Dazu wurde 1 µl CIAP direkt in den Restriktionsansatz pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

8.2.1.2.3 Ligation von DNA Fragmenten

Geschnittene und gereinigte Vektor - und Insert - DNA wurde im Verhältnis 1:3 bis 1:10 zur Ligation eingesetzt. Die DNA wurde dazu mit 2 µl 10x Ligasepuffer und 2 µl T4-Ligase versetzt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte für 1 h bei RT.

8.2.1.3 PCR (Polymerase Kettenreaktion)

Die Polymerase Kettenreaktion dient der gezielten enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA Fragmente. Das jeder PCR zugrundelegende Prinzip beruht auf der mehrfachen Wiederholung dreier Teilschritte:

1. **Schmelze (Denaturierung):** Durch Erhitzen der DNA - Matrize auf > 92°C werden die komplementären Einzelstränge getrennt.
2. **Anlagerung (Annealing):** Bei Abkühlung des Reaktionsmixes auf 37 - 72°C können sich kurze einzelsträngige DNA Fragmente (Oligonukleotide, Primer) an die nun einzelsträngige DNA - Matrize anlagern. Die verwendeten Oligonukleotide sind

komplementär zu kurzen Sequenzabschnitten am 5` und 3` Ende des zu amplifizierenden DNA Fragments.

- 3. Synthese (*Elongation*):** Bei Temperaturen zwischen 68 und 72°C und optimalen Pufferbedingungen synthetisieren hitzestabile DNA-Polymerasen, beginnend an den angelagerten Oligonukleotiden, den komplementären DNA - Strang. Die Synthese erfolgt stets 5` nach 3` unter Verwendung zugesetzter Desoxyribonukleotide (dNTPs).

Jeder synthetisierte DNA-Strang dient im nächsten Zyklus wieder als Matrize, so dass die Anzahl der DNA - Stränge unter optimalen Synthesebedingungen exponentiell anwächst.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Anwendung sind v.a. folgende Bedingungen zu variieren:

Zusammensetzung des PCR - Ansatzes

- Wahl der DNA-Polymerase (mit/ohne Korrekturleseaktivität, Synthesegeschwindigkeit, Synthesetemperatur, Stabilität)
- Wahl der Primer: Für Standard - PCRs sollten die verwendeten Primer ca. 20 bp lang sein, eine Schmelztemperatur T_M von 50 – 60°C und einen GC - Gehalt von nicht mehr als 60 % haben. Zusätzlich sollte gewährleistet sein, dass sie nicht unspezifisch an der eingesetzten DNA binden können.

- Zusätze:

Magnesiumionen: Sämtliche DNA-Polymerasen benötigen zur Funktion die Anwesenheit von Magnesiumionen im Reaktionsansatz. Durch Zugabe von zusätzlichem Magnesium kann die DNA - Ausbeute im Einzelfall erhöht werden.

DMSO: DMSO interagiert mit dem Matrizenstrang, so dass die Anlagerung der Primer erschwert wird. Dadurch sinkt die Gefahr unspezifischer Primerbindungen, die Anlagerungstemperatur kann erniedrigt werden.

Reaktionsprogramm

- Anlagerungstemperatur: sie berechnet sich aus der Schmelztemperatur T_M der eingesetzten Primer nach folgendem Prinzip:

$$T_M = 64,9 + \left(41 \times \frac{yG + zC - 16,4}{wA + xT + yG + zC} \right)$$

wobei w, x, y, and z der Anzahl der Basen A, T, G bzw. C in der Sequenz entsprechen. Zur Berechnung der Anlagerungstemperatur der Primer wurde in dieser Arbeit standardmäßig das im Internet zugängliche Programm „Oligocalculator“ eingesetzt.

- Elongationstemperatur: richtet sich nach der optimalen Arbeitstemperatur der eingesetzten DNA-Polymerase
- Elongationsdauer: richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA - Fragments und der Geschwindigkeit der eingesetzten DNA-Polymerase; für die meisten DNA-Polymerasen gilt: 1 min Elongationsdauer für 1000 bp.

Tabelle 8.1: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes.

Komponente	Volumen [μ l]
10x Reaktionspuffer	5
dNTPs (Mischung, je 2,5 mM)	2
DNA-Matrize (20-200 ng/ μ l)	2
1. PCR Primer (10 pM/ μ l)	2
2. PCR Primer (10 pM/ μ l)	2
DNA-Polymerase (2 U/ μ l)	0,5
H ₂ O (für die Molekularbiologie)	36,5

Tabelle 8.2: Temperaturprogramm eines Standard-PCR-Ansatzes.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [sec]	Zyklen
Denaturierung	94	240	1
Denaturierung	94	40	} 25
Anlagerung	55	40	
Synthese	72	60	
Synthese	72	240	1

8.2.1.3.1 Kolonie - PCR

Um die erfolgte Ligation eines DNA - Fragments in einen Vektor zu überprüfen, wurden Kolonie - PCR Reaktionen durchgeführt. Statt isolierter Matrizen - DNA wurde hierbei eine geringe Menge *E.coli*-Zellen einer Kolonie direkt als Templat eingesetzt. Die Amplifikation wurde mit Vektor - spezifischen Primern unter Standardbedingungen durchgeführt.

8.2.1.3.2 PCR unter Verwendung von degenerierten Primern

Wenn die DNA-Sequenz an den Primer - Bindestellen eines zu amplifizierenden Gens nicht genau bekannt war, z.B. wenn nur die Proteinsequenz bekannt war, mussten degenerierte Primer zur Genamplifikation eingesetzt werden. Für das Design der Primer war vor allem die Kenntnis der Codonpräferenz des jeweiligen Organismus von Bedeutung. So konnte der Degenerationsgrad der Primer durch Vernachlässigung selten benutzter Codons minimiert werden. Generell wurde ein Degenerationsgrad von 20 % nicht überschritten. Bei der Amplifikation wurden im Vergleich zur Standardreaktion stringendere Bedingungen eingesetzt. So wurde die Anlagerungstemperatur 5 - 10°C oberhalb der Schmelztemperatur der Primer gewählt, um Primerfehlbindungen zu verhindern. Zusätzlich wurde dem Ansatz DMSO zugesetzt.

8.2.1.3.3 Punktmutagenese innerhalb eines DNA Abschnitts (QuikChange®)

Bei dieser Methode zur gerichteten Mutagenese innerhalb eines DNA Abschnitts wird das gesamte Plasmid, welches das Gen trägt, amplifiziert. Als Primer dienen hierbei zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide von 25 - 40 bp Länge, welche die gewünschte Mutation im Zentrum ihrer Sequenz tragen. Zur Amplifikation wurde die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, welche Korrekturlesefunktion besitzt. Während der Amplifikation entstehen ausgehend von den Primern Kopien des Plasmids, welche nun die gewünschte Mutation tragen. Da diese jedoch aufgrund ihrer Linearität nicht als Templat während der PCR dienen können, handelt es sich bei dieser Reaktion im Gegensatz zur Standard - PCR nicht um eine exponentielle, sondern um eine lineare Produktzunahme.

Nach der PCR liegt ein Gemisch an Produkt mit gewünschter Mutation und Ausgangsplasmid ohne Mutation vor. Da das Ausgangsplasmid in *E.coli* synthetisiert wurde, lag es im Gegensatz zum PCR - Produkt methyliert vor, so dass es durch Restriktionsverdau mit *DpnI*, welches hochspezifisch für methylierte DNA ist, abgebaut werden kann. Die PCR - Mischung konnte direkt nach dem *DpnI* - Verdau, welcher ebenfalls direkt im PCR - Ansatz 1 h bei 37°C durchgeführt wurde, zur Transformation kompetenter Zellen verwendet werden.

Tabelle 8.3: Zusammensetzung eines QuikChange® PCR Ansatzes.

Komponente	Volumen [μ l]
10x Pfu-Reaktionspuffer	5
dNTPs (Mischung, je 2,5 mM)	2
DNA-Matrize (20-200 ng/ μ l)	2
1. PCR Primer (10 pM/ μ l)	2
2. PCR Primer (10 pM/ μ l)	2
Pfu-DNA-Polymerase (2 U/ μ l)	0,5
DMSO	2,5
H ₂ O (für die Molekularbiologie)	34

Tabelle 8.4: Temperaturprogramm einer QuikChange® PCR.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	94	5	1
Denaturierung	94	1	} 16-20 ²
Anlagerung	55	1	
Synthese	72	7-11 ¹	
Synthese	72	11	1

¹: Die Synthesedauer richtete sich nach Größe des zu amplifizierenden Plasmids. *Pfu* DNA-Polymerase benötigt zwei Minuten pro 1000 Basen.

²: Die Zyklenzahl richtete sich nach der Art der gewünschten Mutation; bei einem einzelnen Basenaustausch genühten 16 Zyklen, bei Austausch mehrerer Aminosäuren sollten 20 Zyklen gewählt werden.

8.2.1.3.4 Gensynthese

Zur Synthese des *Moraxella* sp. TA144 lip1 Gens, des konservierten *Candida antarctica* Genfragments und des degenerierten Genbankfragments wurde prinzipiell die gleiche Methode angewandt. Die Gene wurden in Oligonukleotide von einer Länge bis zu 61 bp im Falle der *Moraxella* sp. TA144 Lipase, bis zu 87 bp im Falle des degenerierten Genbankfragments bzw. einer Länge von bis zu 73 bp im Falle des konservierten CalB Fragments aufgeteilt. Da die Kopplungseffizienz bei der Oligonukleotidsynthese unter 100 % liegt, bestehen Primer, die eine gewisse Gesamtlänge übersteigen, oft aus einer Mischung verschieden langer Oligonukleotide. Das kann in der PCR - Reaktion zu

Amplifikationsfehlern und damit zu Mutationen in der Sequenz des synthetischen Gens führen. Basierend auf unseren Erfahrungen sollten Primer eine Gesamtlänge von 80 bp nicht wesentlich übersteigen, wenn man sie ohne weitere Aufreinigung einsetzt. Beim Design der Oligonukleotide wurde darauf geachtet, dass sie sich an ihren 5' und 3' Enden jeweils um 15 bis 24 bp überlappten. Alle Primer wurden dergestalt geplant, dass ihre überlappenden Bereiche die gleichen Schmelztemperaturen ($55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) aufwiesen. Die Anordnung der Primer auf dem geplanten Gen bzw. Genfragment ist in Abb. 8.1 dargestellt.

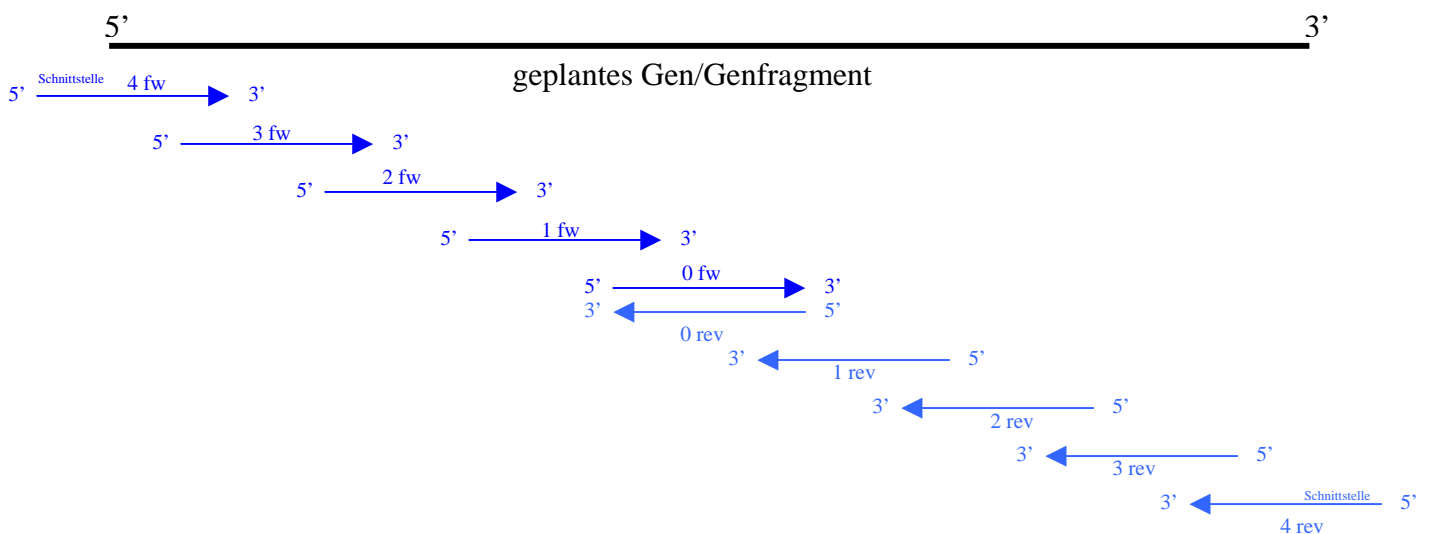


Abbildung 8.1: Schematische Darstellung der Synthese eines künstlichen Gens.

Die im Zentrum des Gens angesiedelten revers - komplementären Oligonukleotide 0fw und 0rev wurden bei 55°C aneinandergelagert um doppelsträngige DNA zu erhalten, welche dann als Templat für die erste PCR - Reaktion eingesetzt wurde. Diese wurde mit den Primern 1fw/1rev durchgeführt. Das Produkt dieser Reaktion wurde aufgereinigt und in der nächsten PCR - Reaktion wiederum mit den Primern 2fw und 2rev als Templat eingesetzt. Zur Synthese des konservierten CalB-Außenbereichs und des optimierten degenerierten Genbankfragments wurde eine leicht abgewandelte Strategie eingesetzt. Hierbei wurden die Primer 0fw und 0rev so gewählt, dass sie ebenfalls nur eine überlappende Region von 20 - 25 bp zeigten. Beide Primer wurden dann für die erste PCR eingesetzt, wobei sie hier sowohl als Templat als auch als Primer dienten. Nach jedem PCR - Schritt wurden die Produkte mittels Gelextraktion aufgereinigt, um das alte Templat, Produkte unspezifischer Primerbindungen und die eingesetzten Oligonukleotide zu entfernen. Das so gereinigte Produkt wurde als Templat für die nachfolgende PCR eingesetzt.

8.2.1.3.5 DNA Sequenzierung

Sequenzierungs-PCR

Die DNA Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger [255, 256] durchgeführt. Dabei wird die DNA ausgehend von nur einem eingesetzten Primer von 5' nach 3' mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase synthetisiert. Im Gegensatz zur PCR werden hierbei neben dNTPs auch Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) im Überschuss zugegeben, die bei Einbau in den DNA - Strang einen Kettenabbruch zur Folge haben. Somit entsteht ein Gemisch von unterschiedlich langen DNA - Strängen, welche auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Da jeder Typ ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, kann festgestellt werden, mit welcher Base ein DNA - Fragment endet. Der Lesekopf des DNA - Sequenzierers detektiert die Abfolge der Fluoreszenzfarbstoffe an einer bestimmten Stelle im Gel und bestimmt somit die Abfolge der Basen im sequenzierten DNA - Bereich. Es wurde das Big Dye Terminator Kit (Perkin Elmer) verwendet. In einer vom Hersteller gelieferten Mischung befinden sich bereits Puffersubstanzen, DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide und fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide. Tab. 8.5 zeigt den typischen Ansatz einer Sequenzierreaktion, Tab. 8.6 ein Standardtemperaturprogramm.

Tabelle 8.5: Zusammensetzung eines Sequenzier-PCR Ansatzes.

Komponente	Volumen [μl]
Big Dye Terminator Mix	4
Primer (3,3 pM/ μ l)	1
DNA-Matrize (20-200 ng/ μ l)	5
H ₂ O (für die Molekularbiologie)	10

Tabelle 8.6: Temperaturprogramm einer Sequenzier-PCR.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	95	6	1
Denaturierung	95	1	} 25
Anlagerung	55	1	
Synthese	60	5	
Synthese	60	5	1

Sequenziergel und Probenaufbereitung

Die Lösung für das Polyacrylamidgel (s.u.) wurde vor Zugabe von APS und TEMED durch eine Membran (0,2µm) abfiltriert und 5 min entgast. Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Lösung zwischen die vorher sorgfältig gereinigten Glasplatten gegossen, der Vorkamm gesteckt, eventuell entstandene Luftblasen entfernt und das Gel 2 h bei RT auspolymerisiert. Nach nochmaliger sorgsamer äußerer Reinigung der Glasplatten wurde das Gel in den DNA - Sequenzierer ABI-Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) eingebaut und mit 1x TBE-Puffer befüllt.

10x TBE-Puffer

Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA	7,4 g
adH ₂ O _{HPLCrein}	1 l

Polyacrylamidgel Lösung

Rotiphorese NF-Harnstoff	18,0 g
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid Lösung	6,6 ml
10 x TBE-Puffer	5,0 ml
H ₂ O	25,0 ml
APS	250 µl
TEMED	25 µl

Zur Fällung der Sequenzierproben wurde eine mit einer Portionierplatte abgemessene Menge an Sephadex™ G-50 Superfine (Amersham Biosciences) in eine Millipore MultiScreen® Assay System Platte (Nucleic A, Mananly 10, 50) gefüllt, in 320 µl H₂O (HPLC-rein) aufgenommen und ü.N. bei 4°C quellen gelassen. Überschüssiges H₂O wurde abzentrifugiert (8 min 910 g 15°C) und die Sequenzierproben aus der PCR auf die Matrix pipettiert. Durch Zentrifugation (8 min 910 g 15°C) wurde die DNA über die Matrix filtriert und im Folgenden bei 70°C getrocknet. Die DNA wurde in 3,5 µl Probenpuffer aufgenommen, 3 min bei 92°C denaturiert und in die Probenaschen des Gels aufgetragen (0,7 µl/Probe). Die Elektrophorese erfolgte 14 h bei 2400 V. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ABI-Prism™ 377-96.

Sequenzierprobenpuffer

Formamid	80% (v/v)
EDTA 25 mM pH 8,0	20% (v/v)
Dextranblau 2000	50 mg/ml

8.2.2 Arbeiten mit Mikroorganismen

8.2.2.1 Kultivierung von Mikroorganismen

8.2.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Sämtliche *E.coli* - Stämme wurden in Luria - Bertani (LB) Medium kultiviert. Zur Selektion rekombinanter Zellen wurde je nach verwendetem Plasmid Ampizillin (Endkonzentration: 100 µg/ml Ampizillin-Natriumsalz) oder Zeozin™ (Endkonzentration: 25 µg/ml) zugesetzt. Für Übernachtskulturen wurden 5 ml LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt, mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder aus einem Glycerolstock angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Zur Stammhaltung wurde die Kultur im Verhältnis 1:1 mit Glycerol versetzt und bei – 80°C gelagert.

8.2.2.1.2 Kultivierung von *Pichia pastoris*

Die Kultivierung von *P.pastoris* erfolgte in YPD Medium. Dazu wurden 10 ml YPD-Medium mit einer Kolonie einer YPDS - Agarplatte inokuliert und bei 30°C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Selektion rekombinanter Zellen wurde Zeozin™ in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Die Stammhaltung erfolgte nach Zugabe von Glycerol im Verhältnis 1:1 bei – 80°C.

8.2.2.1.3 Kultivierung von *Candida antarctica* und *Pseudozyma tsukubaensis*

Die Kultivierung der Hefen erfolgte in YM - Medium bei 25°C und 180 rpm im Schüttelinkubator. Zur Stammhaltung wurde Hefekultur mit Glycerol im Verhältnis 1:1 versetzt und bei – 80°C gelagert.

8.2.2.2 Transformation von Mikroorganismen

8.2.2.2.1 Transformation von *E. coli*

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Zellen mit der Rubidiumchlorid - Methode wurden 100 ml Medium mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Nach Inkubation auf Eis für 15 min wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min 4000 rpm 4°C) und in 40 ml TfbI - Puffer resuspendiert. Nach weiteren 15 min Inkubation auf Eis wurde wiederum abzentrifugiert (10 min 4000 rpm 4°C) und das Pellet in 4 ml TfbII - Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden nach weiteren 15 min Inkubation auf Eis in Aliquots zu je 200 µl in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei – 80°C aufbewahrt.

TfbI-Puffer:

Kaliumacetat	30 mM
Rubidiumchlorid	100 mM
Calciumchlorid	10 mM
Mangan(II)chlorid	50 mM
Glycerin	15 % (v/v)
verdünnte Essigsäure	auf pH 5,8 einstellen

TfbII-Puffer:

MOPS	10 mM
Rubidiumchlorid	10 mM
Calciumchlorid	75 mM
Glycerin	15 % (v/v)
verdünnte Natronlauge	auf pH 6,5 einstellen

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der DNA wurde für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 1 min wurden die Zellen wiederum 2 min auf Eis gestellt und dann mit 1 ml LB-Medium versetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen abzentrifugiert (2 min, 5000 rpm, RT), 900 µl Medium abgenommen, die Zellen in dem verbleibenden Medium resuspendiert und auf LB-Agar mit geeignetem Selektionsmarker ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, bei 37°C über Nacht.

8.2.2.2 Transformation von *P. pastoris*

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 100ml YPD - Medium mit einer Vorkultur *Pichia pastoris* X33 Zellen in YPD angeimpft und bei 30°C und 180 rpm bis zu Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 1,3 - 1,5 kultiviert. 85 ml der Kultur wurden abzentrifugiert (10 min, 1500 g, 4°C) und das Pellet in 100 ml eiskaltem H₂O resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert (5 min, 3500 rpm, 4°C) und nochmals in 50 ml eiskaltem H₂O gewaschen. Das Pellet wurde in 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert, die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1500 g, 4°C) und schließlich in 250 µl 1 M Sorbitol resuspendiert. Bis zur Transformation wurden die Zellen auf Eis, aliquotiert zu je 100 µl, aufbewahrt.

Das zu transformierende Plasmid wurde durch Restriktionsverdau mit *SacI* linearisiert und mit dem QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt. Zur Transformation wurden 100 µl der resuspendierten Zellen mit 10 - 15 µl (5 - 10 µg) des linearisierten Plasmids versetzt. Das Gemisch wurde in eine eiskalte Elektroporationsküvette überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Elektroporation (1500 V, 25 µF, 200Ω) wurde der Ansatz mit 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol versetzt und 1 h bei 30°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf YPDS - Zeozin™ Agarplatten ausplattiert und für mindestens 4 Tage bei 30°C inkubiert.

8.2.2.3 Expression rekombinanter Proteine

8.2.2.3.1 Expression rekombinanter Hydrolasen in *E. coli*

400 ml LB-Medium wurde mit 400 µl Ampizillin-Stammlösung versetzt und mit 1 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert bis eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 erreicht war. Die heterologe Proteinexpression wurde durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 42°C (pCYTEX-P1-Vektor), durch Zugabe von 4 ml Rhamnose-Stammlösung (pJOE-Vektor) oder durch Zugabe von 0,4 ml IPTG-Stammlösung (pUC18-Vektor) induziert. Während der weiteren Inkubation für 4 - 6 h bei 30° bzw. 37°C wurden jede Stunde Proben zur Analyse der Expression gezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (15 min 8000 rpm 4°C) und dann in 20 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5 bzw. 100 mM Tris-HCl Puffer pH 8.0 (im Falle von pCYTEX-P1-LipA) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min 4000 rpm 4°C) und Resuspension in 5 ml des oben genannten Puffers wurden die Zellen unter Eiskühlung mittels Ultraschall aufgeschlossen (3x je 30 sec Ultraschall, unterbrochen von jeweils 30 sec Abkühlung auf Eis). Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 15000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde zum direkten Einsatz bei 4°C

aufbewahrt. Zur längeren Lagerung wurde er bei -20°C eingefroren oder nach 1 h Einfrieren bei -80°C lyophilisiert.

8.2.2.3.2 Expression rekombinanter Lipasen in *P. pastoris* im Schüttelkolbenmaßstab

Rekombinante *P.pastoris* Zellen wurden bei 30°C und 180 rpm in 10 ml BMGY - ZeozinTM Medium bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 5 - 15 kultiviert. Zur Induktion wurde das Medium abzentrifugiert (5 min 2500 g 4°C) und die Zellen in 50 ml BMMY - Medium resuspendiert, wobei eine optische Dichte OD_{600} von 0,5 eingestellt wurde. Während der 4 Tage dauernden Expression wurde zur Aufrechterhaltung der Induktion alle 24 h 100 % Methanol bis zu einem Volumenanteil von 0,5 % zugegeben. Nach abgeschlossener Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min 4000 rpm 4°C) und die Überstände zur Analyse eingesetzt.

8.2.2.3.3 Expression rekombinanter CalB in *P.pastoris* im Fermentationsmaßstab

Die Fermentation wurde im 5l - Fermenter (Labfors) durchgeführt. Die in der Fermentation konstant gehaltenen Parameter sind in Tab. 8.7 aufgeführt. Während der in der Kultur gelöste Sauerstoff und der pH-Wert permanent überwacht wurde, wurde die optische Dichte OD_{600} , die Biofeucht- und Biotrockenmasse, die Gesamtproteinkonzentration sowie die Aktivität des Überstands stichprobenartig gemessen. Das entsprechende Volumen einer BMGY - ZeozinTM Vorkultur wurde zum Animpfen der 5 l BMMY - Medium eingesetzt, wobei eine anfängliche OD_{600} von 0,5 verwendet wurde. Während der 13 Tage dauernden Fermentation wurde die Methanolkonzentration im Medium durch Zufütterung von 0,5 % (w/v) Methanol, welches durch 1,25 % PTM-1 Spurensalzlösung ergänzt wurde, aufrechterhalten. Der Impuls zur Methanolzugabe wurde dabei durch ein Ansteigen der relativen Sauerstoffkonzentration auf 40 % ausgelöst. Der pH - Wert wurde durch Zugabe von NH_4OH bzw. H_3PO_4 konstant gehalten.

Tabelle 8.7: Fermentations-Parameter.

Parameter	
Rührertyp	Scheibenrührer
Rührgeschwindigkeit	600 rpm
Belüftung	10 l Luft / min
pH-Wert	6,0
Temperatur	30°C
Medium	BMMY + 0,1% Antischaum + 0,00625 % PTM-1 Spurensalzlösung

8.2.3 Proteinchemische Methoden

8.2.3.1 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Aufreinigung der rekombinanten Lipase A aus *Archaeoglobus fulgidus* wurde eine zweistufige Strategie angewandt. Der Zellrohextrakt wurde zunächst mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung gefällt. Die Lipase enthaltende Fraktion wurde dann mittels des an die Lipase klonierten His-Tags durch Affinitätschromatographie zur Homogenität gereinigt.

8.2.3.1.1 Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

10 ml Zellrohextrakt (in 100 mM Tris-HCl pH 8.0) wurde mit 100 mM Tris-HCl pH 8.0 auf 20 ml aufgefüllt. Bei RT wurde unter Rühren 3,52 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingerieselt und 30 min gerührt. Die bei diesem Schritt ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30 % gesättigt) ausgefällten Proteine wurden abzentrifugiert (10 min, 10000 g, 20°C) und verworfen. Der Überstand wurde wiederum unter Rühren bei RT mit 1,28 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt und 30 min gerührt ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 40 % gesättigt). Nach Zentrifugation (10 min, 10000 g, 20°C) wurde das Proteinpellet mit 40 % gesättigtem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gewaschen und in 1 ml 50 mM Natriumphosphat Puffer pH 7.2 aufgenommen.

8.2.3.1.2 Affinitätschromatographie mittels His-Tag

Die Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) wurde nach der Methode von Porath *et al.* mit dem Äkta Explorer (Pharmacia Biotech) durchgeführt [257]. Verwendet wurde eine Pharmacia C10/10 Säule (Säulenvolumen 5 ml) mit Säulenmaterial NiNTA Resin. Die Flussrate während des gesamten Reinigungsprotokolls betrug 1 ml/min. Das Säulenmaterial wurde mit zwei Säulenvolumen (10 ml) 100 mM NiCl_2 beladen. Nach Equilibrierung mit drei Säulenvolumen Equilibrierungspuffer wurde die Säule mit 1 ml Proteinlösung (s. 8.2.3.1.1) beladen. Durch Waschen mit drei Säulenvolumen Equilibrierungspuffer wurde ungebundenes Protein entfernt. Nach dem Auswaschen unspezifisch gebundenen Proteins mit drei Säulenvolumen Waschpuffer wurde LipA mit vier Säulenvolumen Elutionspuffer von der Säule eluiert. Überschüssiges Imidazol wurde durch Spülen mit drei Säulenvolumen MES-Puffer entfernt und die Säule durch Waschen mit drei Säulenvolumen Equilibrierungspuffer reequilibriert. Die Fraktionen des Elutionsschritts wurden auf Lipaseaktivität untersucht und die Fraktionen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten mit einer 10 kD Centricon-Membran konzentriert.

Equilibrierungspuffer:	300 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat, pH 7.2
Waschpuffer:	300 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat, 20 mM Imidazol pH 7.2
Elutionspuffer:	300 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat, 100 mM Imidazol pH 7.2
MES-Puffer:	300 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat, 20 mM MES pH 5.0

8.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts wässriger Lösungen wurde nach der Methode von Bradford mit dem Protein Assay Kit von Biorad durchgeführt [258]. Diese Nachweismethode beruht auf der Bindung von Coomassie *brilliant blue* G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum der Lösung von 465 nm (ohne Protein) nach 595 nm (mit Protein) verschiebt. Die Zunahme der Absorption der Messlösung ist proportional zum Proteingehalt. Durch eine externe Kalibrierung mit BSA als Referenz lässt sich eine quantitative Aussage des Proteingehalts treffen.

Zur Messung wurden 800 µl einer entsprechend verdünnten Proteinlösung mit 200 µl Bradfordlösung gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde in einer 1,5 ml Küvette am Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 Spektrophotometer gemessen.

8.2.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Der Nachweis und die Analyse von rekombinant hergestellten Proteinen in Zellrohextrakten und Reinheitskontrollen von Proteinaufreinigungen erfolgte durch Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE [259]. Dazu wurde ein 12,5 %iges Trenngel hergestellt, das nach dem Auspolymerisieren mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet wurde. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 bis 5:1 versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Zentrifugation der Proben (2 min, 14000 rpm, 4°C) zur Präzipitation der ausgefallenen DNA wurde das Gel beladen und in SDS-Laufpuffer gestartet. Die Elektrophorese erfolgte zunächst 10 min bei 10 mA pro Gel, anschließend 1 Stunde bei 25 mA pro Gel. Als Größenmarker der Elektrophorese dienten die Proteinstandards 10 kd

Proteinmarker (Gibco, Eggenstein) und *Low molecular weight marker* (Roth GmbH, Karlsruhe).

4x Sammelgelpuffer

Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4 % (m/v)

4x Trenngelpuffer

Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4 % (m/v)

Sammelgel (4% Acrylamid)

Rotiphorese® Gel 30	0,53 ml
4x Sammelgelpuffer	1,00 ml
dH ₂ O	2,47 ml
10 % (m/v) APS	40 µl
TEMED	4 µl

Trenngel (12,5% Acrylamid)

Rotiphorese® Gel 30	3,33 ml
4x Trenngelpuffer	2,00 ml
dH ₂ O	2,67 ml
10 % (m/v) APS	40 µl
TEMED	4 µl

SDS-Probenpuffer

MgCl ₂	0,1 M
SDS	4 % (g/v)
Glycerol	10 % (v/v)
2-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (g/v)
Tris-HCl pH 6,8	100 mM

SDS-Laufpuffer

Tris	3 g/l
Glycin	14,4 g/l
SDS	1 g/l

8.2.3.3.1 Coomassiefärbung

SDS-Polyacrylamidgele wurden standardmäßig mit Coomassie Brilliant Blue (0,1 % (w/v), 30 % Methanol, 10 % Essigsäure) gefärbt. Nach 2 - 12 h Inkubation in der Färbelösung wurde in Entfärbelösung (30 % Methanol, 10 % Essigsäure) entfärbt, bis der Gelhintergrund weitgehend farblos wurde. Die Nachweisgrenze für diese Färbemethode lag bei 0,3 - 1 µg/Bande. Das Gel wurde in einem BIO-RAD Gelrockner-583 2h bei 80°C im Vakuum getrocknet.

8.2.3.3.2 Silberfärbung

Zum Nachweis geringer Proteinmengen auf SDS-Gelen wurde die sensitivere Methode der Silberfärbung angewandt. Die Nachweisgrenze lag hierbei bei 0,001 - 0,01 µg/Bande. Die Silberfärbung eignet sich auch besonders zur Färbung von Proteinen mit geringerem Molekulargewicht, welche durch Coomassie oft nur unzureichend detektiert werden können. Das Gel wurde 2 - 12 h in Fixierlösung inkubiert und dann 2 x je 30 min in 30 % Ethanol gewaschen. Dann wurde 3 x je 10 min in H₂O gewaschen und 30 min in 0,1 % (w/v) Silbernitratlösung inkubiert. Das Gel wurde nun in Entwicklerlösung inkubiert, bis die gewünschte Farbentwicklung sichtbar war; dann wurde der Entwickler abgekippt und das Gel in 1 % Essigsäure fixiert.

Fixierlösung: 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure in H₂O

20 % Silbernitrat-Stammlösung: 20 % AgNO₃ (w/v) in H₂O, bei 4°C lagern

0,1 % Silbernitrat-Arbeitslösung: direkt vor Gebrauch aus Stammlösung in H₂O verdünnt

Entwicklerlösung: 2,5 % (w/v) Na₂CO₃, 0,02 % (v/v) Formaldehyd in H₂O

8.2.3.3.3 Aktivitätsfärbung (Zymogramm)

Zur direkten Identifizierung von Lipasen auf SDS-Gelen wurden Aktivitätsfärbungen durchgeführt [260]. Zur Renaturierung der Proteine wurde das Gel mindestens 2 Stunden in Renaturierungslösung inkubiert. Dabei wurde das SDS aus dem Gel ausgewaschen, wobei die Renaturierung der Proteine stattfand. Dann wurde dem Gel ein Gemisch der Lösungen A und B zu gleichen Volumenanteilen zugegeben und 1 - 3 Stunden inkubiert. Bereiche auf dem Gel, welche gegenüber dem in Lösung A befindlichen α -Naphthylacetat hydrolytisch aktive

Enzyme enthielten, traten als rot - braune Banden hervor. Zur Fixierung der Gele wurde 10 min in 10 % (v/v) Glycerin inkubiert.

Renaturierungslösung: 100 mM Tris/HCl pH 7.5, 0,5 % (v/v) Triton-X-100

Lösung A: 100 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 % (v/v) Aceton,
0,04 % (w/v) α -Naphthylacetat

Lösung B: 100 mM Tris/HCl pH 7.5, 0,1 % (w/v) Fast Red TR

8.2.4 Assay-Systeme

8.2.4.1 Photometrische Aktivitätsbestimmung von Hydrolasen mittels *p*-Nitrophenylestern

Die hydrolytische Aktivität von Enzymlösungen konnte durch Spaltung von *p*-Nitrophenylestern bestimmt werden. Das hierbei freiwerdende *p*-Nitrophenol kann photometrisch bei 410 nm bestimmt werden [261]. Eine Einheit (U) Hydrolaseaktivität entspricht dabei der Menge an Enzym, die 1 μ mol *p*-Nitrophenol pro Minute unter gewählten Reaktionsbedingungen freisetzt.

Es gilt:
$$A = \frac{\Delta E}{\varepsilon \times d \times c_{\text{Enzym}}}$$

A	[U \times mg ⁻¹]	spezifische Aktivität
ΔE	[min ⁻¹]	Steigung bei 410 nm
ε	[M ⁻¹ \times cm ⁻¹]	molarer Extinktionskoeffizient
d	[cm]	Schichtdicke der Messküvette
c_{Enzym}	[mg/ml]	Enzymkonzentration der Assaylösung

Der molare Extinktionskoeffizient ε des *p*-Nitrophenols ist pH-abhängig. Der jeweilige Wert wurde mit Hilfe einer Kalibrierkurve bestimmt (Abb. 8.2).

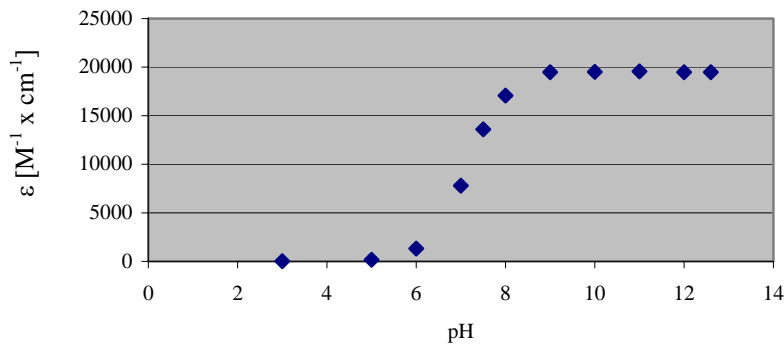


Abbildung 8.2: pH-Abhängigkeit des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ

Zur Aktivitätsbestimmung wurden 0,1-100 μg Enzym in 900 μl 50 mM Puffer des gewünschten pH-Werts aufgenommen und mit 100 μl pNPP-Lösung (2,5 mM in DMSO) bzw. pNPA-Lösung (10 mM in DMSO) gemischt. Die Zunahme der Absorption bei 410 nm wurde in einer 1,5 ml Küvette am Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 Spektrophotometer gemessen.

8.2.4.2 Aktivitätsbestimmung von Hydrolasen mittels pH-Stat Titration

Grundlage für die Bestimmung der Hydrolaseaktivität im pH-stat Assay ist die enzymatische Spaltung von Carbonsäureestern. Die dabei freiwerdenden Säuren dissoziieren in wässriger Lösung, die Protonen führen zu einem Absinken des pH-Werts. Durch automatische Titration mit NaOH kann im Assay der pH-Wert konstant gehalten werden; der Verbrauch an NaOH ist dabei direkt proportional zu freigesetzter Carbonsäure [262]. Eine Einheit (U) Hydrolase-Aktivität entspricht der Menge an Enzym, die 1 μmol Fettsäure pro Minute unter gewählten Reaktionsbedingungen freisetzt.

Es gilt:

$$A = \frac{f_x \times f_y \times c_{\text{NaOH}}}{M_{\text{Enzym}}} \times \left(\frac{\Delta x}{\Delta y} \right)$$

A	[U \times mg ⁻¹]	spezifische Aktivität
f_x	[μl \times mm ⁻¹]	Schreiberparameter bez. des NaOH-Verbrauchs
f_y	[mm \times min ⁻¹]	Schreiberparameter bez. der Reaktionszeit
c_{NaOH}	[mol \times l ⁻¹]	Konzentration der Natronlauge
M_{Enzym}	[mg]	Enzymmenge
$\Delta x / \Delta y$	[mm \times mm ⁻¹]	Steigung der Messgeraden

Zur Durchführung wurde H₂O mit 5 % (v/v) Hydrolasesubstrat und 2 % (w/v) Gummi Arabicum versetzt und 5 min am Ultraturrax bei 9500 rpm homogenisiert. Im Reaktionsgefäß wurden 20 ml der Substratemulsion auf die gewünschte Temperatur und den Assay-pH-Wert eingestellt; die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 – 100 µl Enzymlösung gestartet. Für jede Messung wurden 2 - 3 Aktivitätsbestimmungen durchgeführt.

8.2.4.3 Aktivitäts- und Selektivitätsbestimmung von Hydrolasen mittels Gaschromatographie

Zur Bestimmung der Enantioselektivität von Hydrolasen gegen das Substrat MP in der Umesterung wie auch gegen MPA in der Hydrolyse wurden Umsetzungen im 1,5 ml Maßstab durchgeführt; die Produkte der Reaktionen wurden gaschromatographisch mit einem Varian CP-3800 Gaschromatographen analysiert.

8.2.4.3.1 Umsetzungen im 1,5 ml Maßstab

Hydrolyse

0,01 – 1 mg Enzym wurden in 1,5 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5, 500 mM MPA aufgenommen. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln zwischen einer Stunde und sieben Tagen bei der dem jeweiligen Enzym entsprechender Temperatur.

Umesterung

0,01 – 1 mg Enzym wurden in lyophilisierter Form oder als wässriges Konzentrat von bis zu 50 µl Gesamtvolumen zu 1,5 ml einer 1:1 Mischung von Vinylacetat in MP gegeben. Die Inkubation erfolgte wiederum unter Schütteln zwischen zwölf Stunden und sieben Tagen bei 30°C.

8.2.4.3.2 Gaschromatographische Analytik

Hydrolyse

10 – 100 µl des Reaktionsansatzes wurden in 1 ml Acetonitril und 25 mM Pentanon als internen Standard aufgenommen und Enzymreste durch zweiminütige Zentrifugation bei 14000 rpm abgetrennt. Die Auftrennung der Produktenantiomere *R*-MP und *S*-MP erfolgte an der chiralen α -Dex 120 Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm ID 0,25 µm Filmdicke) von Supelco.

Umesterung

1 –10 µl des Reaktionsansatzes wurden in 1 ml Acetonitril und 25 mM Pentanon als internen Standard aufgenommen und Enzymreste durch 2 min Zentrifugation bei 14000 rpm abgetrennt. Die Trennung der Produktenantimere *R*-MPA und *S*-MPA erfolgte an der chiralen β -Dex 325 Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm ID 0,25 µm Filmdicke) von Supelco.

Sowohl die Produktenantimere der Hydrolyse als auch die der Umesterung wurden mit dem in Tab. 8.8 dargestellten Temperaturprogramm aufgetrennt:

Tabelle 8.8: Temperaturprogramm der gaschromatographischen Trennung der Produktenantimere.

Temperatur [°C]	Heizung [°C/min]	Konstante Temperatur [min]	Gesamtzeit [min]
40	/	1	1
75	5	/	8
100	10	/	10,5
200	80	2	13,7

Dabei wurde eine vordere Injektortemperatur von 200°C, eine vordere Detektionstemperatur von 250°C und eine Flussrate von 1,3 ml/min gewählt.

8.2.4.4 Screening nach Lipaseaktivität mit dem Tributyrin Plattenassay

Nach erfolgter Transformation eines Plasmids mit einkloniertem Lipasegen in *E.coli* wurden die Zellen auf Tributyrin-Agarplatten ausplattiert und ü.N. bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Nachdem die Kolonien deutlich zu erkennen waren wurden die Platten noch 12 - 24h bei RT inkubiert. Kolonien mit Lipaseaktivität waren deutlich an der Ausbildung eines klaren Hofes („halo“) zu erkennen. Im Falle der Genbank wurde der Assay auf rechteckigen Petrischalen (20 x 20 cm) durchgeführt.

9 Literatur

1. Manco, G., Giosue, E., D'Auria, S., Herman, P., Carrea, G., Rossi, M., *Cloning, overexpression, and properties of a new thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily from the archaeon Archaeoglobus fulgidus*. Arch Biochem Biophys, 2000. **373**(1): p. 182-92.
2. Pleiss, J., Fischer, M., *Lipase engineering database*. 2002, Institute of technical biochemistry, University of Stuttgart: Stuttgart.
3. Ness, J.E., Kim, S., Gottman, A., Pak, R., Krebber, A., Borchert, T.V., Govindarajan, S., Mundorff, E.C., Minshull, J., *Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(12): p. 1251-5.
4. Borgström, B., Brockman, G.L., *Lipases*. 1984, Amsterdam: Elsevier.
5. Lazar, G., Schröder, F.R., *Degradation of lipids by fungi.*, in *Microbial Degradation of Natural Products.*, G. Winkelmann, Editor. 1992, Verlag Chemie: Weinheim.
6. Eijkman, C., *Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen*. Centralbi. f. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr., 1901. **29**: p. 841-848.
7. Jaeger, K.E., *Bakterielle Lipasen: Biochemie, Molekulargenetik und biotechnologische Bedeutung*. Bioeng., 1994. **2**: p. 39-46.
8. Jaeger, K.E., Kharazmi, A., Hoiby, N., *Extracellular lipase of Pseudomonas aeruginosa: biochemical characterization and effects on human neutrophil and monocyte function in vitro*. Microb. Pathogen., 1991a. **10**: p. 173-182.
9. Khalameyzer, V., und Bornscheuer, U.T., *Overexpression and characterization of an esterase from Streptomyces diastatochromogenes*. Biotechnol. Lett., 1999. **21**: p. 101.
10. Blackman, R.L., Spence, J.M., Field, L.M., Devonshire, A.L., *Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in Mycus persicae (Homoptera: Aphidae)*. Heredity, 1995. **75**: p. 297-302.
11. Wie, Y., Swenson, L., Kneusel, R.E., Matern, U., Derewenda, Z.S., *Crystallisation of a novel esterase which inactivates the macrolide toxin Brefeldin A*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1996. **52**: p. 1194-1195.
12. Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.M., Silman, L., Schrag, J.D., et. al., *The alpha/beta hydrolase fold*. Protein Eng, 1992. **5**: p. 197-211.
13. Henke, E., *Untersuchungen zur Erweiterung der Substratspezifität von Carboxylester-Hydrolasen*. 2001, Dissertation, Ernst-Moritz-Arndt Universität: Greifswald. p. 180.
14. Holmquist, M., *Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms*. Curr Protein Pept Sci, 2000. **1**(2): p. 209-35.
15. Fischer, M., Pleiss, J., *The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**: p. 319-321.
16. Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C., Schmid, R.D., *Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence-structure-function relationships*. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2000. **10**: p. 491-508.
17. Carter, P. and J.A. Wells, *Dissecting the catalytic triad of a serine protease*. Nature, 1988. **332**(6164): p. 564-8.
18. Sarda, L. and P. Desnuelle, *[Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions.]*. Biochim Biophys Acta, 1958. **30**(3): p. 513-21.
19. Ransac, S., Carriere, F., Rogalska, E., Verger, R., Marguet, F., *The kinetics, specificities and structural features of lipases*. Molecular Dynamics of

- Biomembranes., ed. J.A.F.o.d. In Kamp. Vol. H96. 1996, Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag. 254-304.
20. Verger, R., "Interfacial activation" of lipases: facts and artefacts. Trends Biotechnol, 1997. **15**: p. 32-38.
 21. Martinelle, M., M. Holmquist, and K. Hult, *On the interfacial activation of Candida antarctica lipase A and B as compared with Humicola lanuginosa lipase*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1258**(3): p. 272-6.
 22. Schmid, R.D., *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*. 2002, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH. 342.
 23. Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J., *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*. 1999, Weinheim: Wiley-VCH,.
 24. Faber, K., ed. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 1999, Springer-Verlag: Berlin.
 25. Schmid, R.D., und Verger, R., *Lipasen: Grenzflächen-Enzyme mit attraktiven Anwendungen*. Angew Chem Int Ed, 1998. **37**: p. 1608-33.
 26. Stinson, S.C., *Chiral drugs*. Chem. & Eng. News, 2000. **23**: p. 55-78.
 27. Tombo, G.M.R., Blaser, H.U., *Pesticide chemistry and bioscience, the food-environment challenge.*, ed. G.T. Brooks, Roberts, T.R. 1999, Cambridge: Royal Society of Chemistry. 33-54.
 28. Caldwell, J., *Modern Drug Discovery*, 1999(July/August): p. 51-60.
 29. Pasteur, L., *Researches on molecular asymmetry*. 1860.
 30. Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C.J., *Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers*. J. Am. Chem. Soc., 1982. **104**: p. 7294-99.
 31. Chen, C.S., Wu, S.H., Girdaukas, G., Sih, C.J., *Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers 2: Enzyme catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems*. J. Am. Chem. Soc., 1987. **109**: p. 2812-2817.
 32. Baumann, M., Hauer, B.H., Bornscheuer, U.T., *Rapid screening of hydrolases for the enantioselective conversion of "difficult-to-resolve" substrates*. Tetrahedron: Asymmetry, 2000. **11**: p. 4781-4790.
 33. Donate, F.A., *Chiral solvents from DOWANOL* Glycol Ethers*. 2002, DOW.
 34. DOW, *Product information*. <http://www.dow.com>, 2004.
 35. Berendsen, W., *Persönliche Mitteilung*. 2002: Stuttgart.
 36. Carrea, G., Riva, S., *Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese*. Angew. Chem., 2000. **112**: p. 2312-2341.
 37. Baumann, M., Stürmer, R., Bornscheuer, U.T., *Eine Hochdurchsatz-Screening-Methode zur Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen*. Angewandte Chemie, 2001. **113**(22): p. 4329-4333.
 38. Baumann, M., *Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen für den industriellen Einsatz.*, in *Institut für technische Biochemie*. 2002, Dissertation, Universität Stuttgart: Stuttgart. p. 168.
 39. Resnick, S., *Enzymatic resolution of propylene glycol alkyl (and aryl) ethers*. 2002, DOW: San Diego. p. 1-38.
 40. Kim, M.J.C., C.K., Choi, M.Y., Kim, M.J., Park, J., *Lipase/Ruthenium-catalyzed dynamic kinetic resolution of hydroxy acids, diols, and hydroxy aldehydes protected with a bulky group*. J. Org. Chem., 2001. **66**: p. 4736-4738.
 41. Theil, F., Tetrahedron, 2000. **56**: p. 2905-2919.
 42. Fernandez-Lorente, G.I., Terreni, M., Mateo, C., Bastida, A., Fernandez-Lafuente, R., Dalmases, P., Hugué, J., Guisan, J.M., *Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of*

- a chiral ester by immobilized Pseudomonas lipase*. Enzyme Microb Technol, 2001. **28**: p. 389-396.
43. Watanabe, K., Koshia, T., Yasufuku, Y., Miyazawa, T., Ueji, S., *Effects of substituent and temperature on enantioselectivity for lipase-catalyzed esterification of 2-(4-substituted phenoxy) propionic acids in organic solvents*. Bioorg Chem, 2001. **29**: p. 65-76.
 44. Klibanov, A.M., *Improving enzymes by using them in organic solvents*. Nature, 2001. **409**: p. 241-246.
 45. Yang, H., Henke, E., Bornscheuer, U.T., *The Use of Vinyl Esters Significantly Enhanced Enantioselectivities and Reaction Rates in Lipase-Catalyzed Resolutions of Arylaliphatic Carbocyclic Acids*. J. Org. Chem., 1999. **64**: p. 1709-1712.
 46. Berglund, P., *Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis*. Biomol. Eng., 2001. **18**: p. 13-22.
 47. Rotticci, D., *Understanding and Engineering the Enantioselectivity of Candida antarctica Lipase B towards sec-Alcohols.*, in Department of Chemistry, Organic Chemistry. 2000, Royal institute of Technology: Stockholm. p. 61.
 48. Wescott, C.R., Klibanov, A.M., *The solvent dependence of enzyme specificity*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1206**: p. 1-9.
 49. Secundo, F., Riva, S., Carrea, G., *Effects of medium and of reaction conditions on the enantioselectivity of lipases in organic solvents and possible rationales*. Tetrahedron: Asymmetry, 1992. **3**: p. 267-280.
 50. Tawaki, S., Klibanov, A.M., *Inversion of enzyme enantioselectivity mediated by the solvent*. J. Am. Chem. Soc., 1992. **114**: p. 1882-1884.
 51. Quiros, M., Parker, M.-C., Turner, N.J., *Tuning Lipase Enantioselectivity in Organic media Using Solid-State Buffers*. J Org Chem, 2001. **66**: p. 5074-5079.
 52. Govardhan, C.P., Margolin, A.L., *Extremozymes for industry - from nature and by design*. Chem. Ind., 1995: p. 689-693.
 53. Cardenas, F., Alvarez, E., de Casto-Alvarez, M.-D., Sanchez-Montero, J.-M., Valmaseda, M., Elson, S.W., Sinisterra, J.-V., *Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001. **14**: p. 111-123.
 54. Bull, A.T., Goodfellow, M., Slater, J.H., *Biodiversity as a source of innovation in biotechnology*. Annu. Rev. Microbiol., 1992. **46**: p. 219-252.
 55. Hough, D.W., Danson, M.J., *Extremozymes*. Curr Opin Chem Biol, 1999. **3**: p. 39-46.
 56. Rondon, M.R., Goodman, R.M., Handelsman, J., *The earth's bounty: assessing and accessing the microbial diversity*. Trends Biotechnol, 1999. **17**: p. 403-409.
 57. Rouhi, A.M., *Chemistry from unknown microbes*. Chem. & Eng. News, 1999. **77**: p. 21-23.
 58. Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiol. Rev., 1995. **59**: p. 143-169.
 59. Miller, C.A., *Advances in enzyme discovery technology: capturing diversity*. Inform., 2000. **11**: p. 489-495.
 60. Schlegel, H.G., *Allgemeine Mikrobiologie*. Vol. 7. 1992, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
 61. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51**: p. 263-73.
 62. Bull, A.T., A.W. Bunch, and G.K. Robinson, *Biocatalysts for clean industrial products and processes*. Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(3): p. 246-51.

63. Bornscheuer, U.T. and M. Pohl, *Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design*. *Curr Opin Chem Biol*, 2001. **5**(2): p. 137-43.
64. Arnold, F.H., *Enzyme engineering reaches the boiling point*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(5): p. 2035-6.
65. Arnold, F.H. and J.C. Moore, *Optimizing industrial enzymes by directed evolution*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1997. **58**: p. 1-14.
66. Arnold, F.H. and A.A. Volkov, *Directed evolution of biocatalysts*. *Curr Opin Chem Biol*, 1999. **3**(1): p. 54-9.
67. Chen, R., *Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution*. *Trends Biotechnol*, 2001. **19**(1): p. 13-4.
68. Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A., Reetz, M.T., *Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001. **55**(5): p. 519-30.
69. Jaeger, K.E. and M.T. Reetz, *Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry*. *Curr Opin Chem Biol*, 2000. **4**(1): p. 68-73.
70. Kazlauskas, R.J. and H.K. Weber, *Improving hydrolases for organic synthesis*. *Curr Opin Chem Biol*, 1998. **2**(1): p. 121-6.
71. Kuchner, O. and F.H. Arnold, *Directed evolution of enzyme catalyts*. *Trends Biotechnol*, 1997. **15**(12): p. 523-30.
72. Lassner, M. and J. Bedbrook, *Directed molecular evolution in plant improvement*. *Curr Opin Plant Biol*, 2001. **4**(2): p. 152-6.
73. Ling, M.M. and B.H. Robinson, *Approaches to DNA mutagenesis: an overview*. *Anal Biochem*, 1997. **254**(2): p. 157-78.
74. Pedersen, H., Holder, S., Sutherlin, D.P., Schwitter, U., King, D.S., Schultz, P.G., *A method for directed evolution and functional cloning of enzymes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(18): p. 10523-8.
75. Reetz, M.T. and K.E. Jaeger, *Enantioselective enzymes for organic synthesis created by directed evolution*. *Chemistry*, 2000. **6**(3): p. 407-12.
76. Reetz, M.T., *Kombinatorische und evolutionsgesteuerte Methoden zur Bildung enantioselektiver Katalysatoren*. *Angewandte Chemie*, 2001. **113**: p. 292-320.
77. Leung, D.W., Chen, E., Goeddel, D.V., *A Method for Random Mutagenesis of a Defined DNA Segment Using a Modified Polymerase Chain Reaction*. *Technique*, 1989. **1**: p. 11-15.
78. Moore, J.C., Arnold, F.H., *Directed evolution of a para-nitobenzyl esterase for aqueous-organic solvents*. *Nat Biotechnol*, 1996. **14**: p. 458-467.
79. Giordano, A., Cannio, R., La Cara, F., Bartolucci, S., Rossi, M., Raia, C.A., *Asn249Tyr substitution at the coenzyme binding domain activates *Sulfolobus solfataricus* alcohol dehydrogenase and increases its thermal stability*. *Biochemistry*, 1999. **38**: p. 3043-54.
80. Rellos, P., Scopes, R.K., *Polymerase chain reaction-based random mutagenesis: production and characterization of thermostable mutants of *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase-2*. *Protein Expr Purif*, 1994. **5**: p. 270-277.
81. Saab-Rincon, G., Juarez, V.R., Osuna, J., Sanchez, F., Soberon, X., *Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution*. *Protein Eng*, 2001. **14**: p. 149-55.
82. Chen, K., Arnold, F.H., *Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**: p. 5618-5622.
83. You, L. and F.H. Arnold, *Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide*. *Protein Eng*, 1996. **9**(1): p. 77-83.

84. Zhang, N., Suen W.C., Windsor, W., Xiao, L., Madison, V., Zaks, A., *Improving tolerance of Candida antarctica lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution*. Protein Eng, 2003. **16**(8): p. 599-605.
85. Selifonova, O., F. Valle, and V. Schellenberger, *Rapid evolution of novel traits in microorganisms*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(8): p. 3645-9.
86. Henke, E. and U.T. Bornscheuer, *Directed evolution of an esterase from Pseudomonas fluorescens. Random mutagenesis by error-prone PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay*. Biol Chem, 1999. **380**(7-8): p. 1029-33.
87. Bornscheuer, U.T., J. Altenbuchner, and H.H. Meyer, *Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of ephedrine*. Biotechnol Bioeng, 1998. **58**(5): p. 554-9.
88. Boder, E.T., K.S. Midelfort, and K.D. Wittrup, *Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 10701-5.
89. Lebbink, J.H., Kaper, T., Bron, P., van Der Oost, J., de Vos, W.M., *Improving Low-Temperature Catalysis in the Hyperthermostable Pyrococcus furiosus beta-Glucosidase CelB by Directed Evolution*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 3656-3665.
90. Wang, C.-W., Liao, J.C., *Alteration of product specificity of rhodospirillum rubrum phytoene desaturase by directed evolution*. J Biol Chem, 2001. **28**: p. 28.
91. Stemmer, W.P., *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10747-51.
92. Stemmer, W.P., *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*. Nature, 1994. **370**(6488): p. 389-91.
93. Stemmer, W.P., Cramer, A., Ha, K.D., Brennan, T.M., Heyneker, H.L., *Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxynucleotides*. Gene, 1995. **164**(1): p. 49-53.
94. Chang, C.C., Chen, T.T., Cox, B.W., Dawes, G.N., Stemmer, W.P., Punnonen, J., Patten, P.A., *Evolution of a cytokine using DNA family shuffling*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(8): p. 793-7.
95. Christians, F.C., Scapozza, L., Cramer, A., Folkers, G., Stemmer, W.P., *Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(3): p. 259-64.
96. Cramer, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., Stemmer, W.P., *DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution*. Nature, 1998. **391**(6664): p. 288-91.
97. Zhou, Z., Zhang, A.H. Wang, J.R., Chen, M.L., Li, R.B., Yang, S., Yuan, Z.Y., *Improving the specific synthetic activity of a penicillin G acylase using DNA family shuffling*. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 2003. **35**(6): p. 573-9.
98. Ness, J.E., Welch, M., Giver, L., Bueno, M., Cherry, J.R., Borchert, T.V., Stemmer, W.P., Minshull, J., *DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(9): p. 893-6.
99. Suen, W.C., Zhang, N., Xiao, L., Madison, V., Zaks, A., *Improved activity and thermostability of Candida antarctica lipase B by DNA family shuffling*. Protein Eng Des Sel, 2004. **17**(2): p. 133-40.
100. Patkar, S., Vind, J., Kelstrup, E., Christensen, M.W., Svendsen, A., Borch, K., Kirk, O., *Effect of mutations in Candida antarctica B lipase*. Chem Phys Lipids, 1998. **93**(1-2): p. 95-101.

101. Shoichet, B.K., Baase, W.A., Kuroki, R., Matthews, B.W., *A relationship between protein stability and protein function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**: p. 452-456.
102. Mann, C.C., *Crop scientists seek a new revolution*. Science, 1999. **283**: p. 310-314.
103. Darwin, C., *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. 1859, London: John Murray.
104. Moore, G.L., Maranas, C.D., Lutz, S., Benkovic, S.J., *Predicting crossover generation in DNA shuffling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3226-31.
105. Ostermeier, M., *Synthetic gene libraries: in search of the optimal diversity*. Trends Biotechnol, 2003. **21**(6): p. 244-7.
106. Zhao, H., Giver, L., Shao, ZU., Affholter, J.A., Arnold, F.H., *Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(3): p. 258-61.
107. Shao, Z., Zhao, H., Giver, L., Arnold, F.H., *Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(2): p. 681-3.
108. Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C.H., Monticello, D.J., *DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(4): p. 354-9.
109. Coco, W.M., *RACHITT: Gene family shuffling by Random Chimeragenesis on Transient Templates*. Methods Mol Biol, 2003. **231**: p. 111-27.
110. Ostermeier, M., J.H. Shim, and S.J. Benkovic, *A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(12): p. 1205-9.
111. Ostermeier, M., A.E. Nixon, and S.J. Benkovic, *Incremental truncation as a strategy in the engineering of novel biocatalysts*. Bioorg Med Chem, 1999. **7**(10): p. 2139-44.
112. Ostermeier, M., Nixon, A.E., Shim, J.H., Benkovic, S.J., *Combinatorial protein engineering by incremental truncation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3562-7.
113. Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G.L., Maranas, C.D., Benkovic, S.J., *Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11248-53.
114. Coco, W.M., et al., *Growth factor engineering by degenerate homoduplex gene family recombination*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(12): p. 1246-50.
115. Coco, W.M. *Decision points and alternatives in DNA shuffling*. in *Gordon Research Conference in Applied and Environmental Microbiology*. 2001. Connecticut College, New Haven, CT.
116. Zha, D., A. Eipper, and M.T. Reetz, *Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: a new tool in directed evolution*. Chembiochem, 2003. **4**(1): p. 34-9.
117. Khosla, C., Harbury, P.B., *Modular enzymes*. Nature, 2001. **409**: p. 247-252.
118. Low, N.M., P.H. Holliger, and G. Winter, *Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain*. J Mol Biol, 1996. **260**(3): p. 359-68.
119. Shafikhani, S., et al., *Generation of large libraries of random mutants in Bacillus subtilis by PCR-based plasmid multimerization*. Biotechniques, 1997. **23**(2): p. 304-10.
120. Schellenberger, V., *Method of Increasing Efficiency of Directed Evolution of a Gene Using Phagemid*. 1999, GENencor International, Inc.: Rochester, N.Y., World Patent.
121. Schellenberger, V., *Molecular Cloning by Multimerization of Plasmids*. 1998, Rochester N.Y., U.S.: GENencor International, Inc.
122. Itakura, K., et al., *Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin*. Science, 1977. **198**(4321): p. 1056-63.

123. Ballou, C., *Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope*. Adv Microb Physiol, 1976. **14**(11): p. 93-158.
124. Hayette, M.P., et al., *Presence of human antibodies reacting with Candida albicans O-linked oligomannosides revealed by using an enzyme-linked immunosorbent assay and neoglycolipids*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(2): p. 411-7.
125. Bennetzen, J.L., Hall, B.D., *Codon selection in yeast*. J Biol Chem, 1982. **257**: p. 3026-3031.
126. Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., *Codon frequencies in 119 individual genes confirm consistent choices of degenerate bases according to genome type*. Nucleic Acids Res, 1980. **8**: p. 1893-1912.
127. Hale, R.S., Thompson, G., *Codon optimization of the gene encoding a domain from human type I neurofibromin protein results in a threefold improvement in expression level in Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 1998. **12**: p. 185-188.
128. Hernan, R.A., Hui, H.L., Andracki, M.E., Noble, R.W., Sligar, S.G., Walder, J.A., Walder, R.Y., *Human hemoglobin expression in Escherichia coli: importance of optimal codon usage*. Biochemistry, 1992. **31**: p. 8619-8628.
129. Makoff, A.J., Oxer, M.D., Romanos, M.A., Fairweather, N.F., Ballantine, S., *Expression of tetanus toxin fragment C in E.coli: high level expression by removing rare codons*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**: p. 10191-10202.
130. Martin, S.L., Vrhaovski, B., Weiss, A.S., *Total synthesis and expression in Escherichia coli of a gene encoding human tropoelastin*. Gene, 1995. **154**: p. 159-166.
131. Romanos, M.A., Makoff, A.J., Fairweather, N.F., Beesley, K.M., Slater, D.E., Rayment, F.B., Payne, M.M., Clare, J.J., *Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**: p. 1461-1467.
132. Sreekrishna, K., et al., *Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Gene, 1997. **190**(1): p. 55-62.
133. Rotticci, D., Rotticci-Mulder, J.C., Denman, S., Norin, T., Hult, K., *Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering*. ChemBioChem, 2001. **2**: p. 766-770.
134. Ikemura, T., *Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms*. Mol Biol Evol, 1985. **2**: p. 13-34.
135. Ikemura, T., *Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective condons in its protein genes*. J Mol Biol, 1981. **146**: p. 1-21.
136. Sorensen, M.A., C.G. Kurland, and S. Pedersen, *Codon usage determines translation rate in Escherichia coli*. J Mol Biol, 1989. **207**(2): p. 365-77.
137. Kawaguchi, Y., et al., *The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast Candida cylindracea*. Nature, 1989. **341**(6238): p. 164-6.
138. Alberghina, L., Lotti, M., *The evolution of a non universal codon as detected in Candida rugosa lipase*. Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic, 1997. **3**: p. 37-41.
139. Roth, J., *Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions*. Chem Rev, 2002. **102**(2): p. 285-303.
140. Strahl-Bolsinger, S., M. Gentzsch, and W. Tanner, *Protein O-mannosylation*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1426**(2): p. 297-307.
141. Brocca, S., Persson, M., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Alberghina, L., Lotti, M., *Mutants provide evidence of the importance of glycosydic chains in the activation of lipase I from Candida rugosa*. Protein Sci, 2000. **9**(5): p. 985-90.
142. Walsh, G., *Proteins Biochemistry and Biotechnology*. 2002: Wiley UK.

143. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., *Molecular biology of the cell*. Vol. 3. 1994, New York, USA: Garland Publishing.
144. Li, A., *Protein phosphorylation and ion transport; a case study in guard cells*. *Advances in Botanical Research*, 2000. **32**: p. 459-479.
145. Bayle, J.H. and G.R. Crabtree, *Protein acetylation: more than chromatin modification to regulate transcription*. *Chem Biol*, 1997. **4**(12): p. 885-8.
146. Carrio, M.M. and A. Villaverde, *Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies*. *J Biotechnol*, 2002. **96**(1): p. 3-12.
147. Lilie, H., E. Schwarz, and R. Rudolph, *Advances in refolding of proteins produced in E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1998. **9**(5): p. 497-501.
148. Kopito, R.R., *Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation*. *Trends Cell Biol*, 2000. **10**(12): p. 524-30.
149. Bowden, G.A., A.M. Paredes, and G. Georgiou, *Structure and morphology of protein inclusion bodies in Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*, 1991. **9**(8): p. 725-30.
150. Georgiou, G. and P. Valax, *Expression of correctly folded proteins in Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1996. **7**(2): p. 190-7.
151. Villaverde, A. and M.M. Carrio, *Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies*. *Biotechnol Lett*, 2003. **25**(17): p. 1385-95.
152. Wulfig, C. and A. Pluckthun, *Protein folding in the periplasm of Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1994. **12**(5): p. 685-92.
153. Rotticci-Mulder, J.C., *Expression and mutagenesis studies of Candida antarctica lipase B*, in *Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology*. 2003, AlbaNova University Centre: Stockholm. p. 74.
154. Joerger, R.D. and M.J. Haas, *Overexpression of a Rhizopus delemar lipase gene in Escherichia coli*. *Lipids*, 1993. **28**(2): p. 81-8.
155. Holmquist, M., Tessier, D.C., Cygler, M., *High-level production of recombinant Geotrichum candidum lipases in yeast Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 1997. **11**: p. 35-40.
156. Minning, S., C. Schmidt-Dannert, and R.D. Schmid, *Functional expression of Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris: high-level production and some properties*. *J Biotechnol*, 1998. **66**(2-3): p. 147-56.
157. Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Lotti, M., Alberghina, L., Schmid, R.D., *Design, total synthesis, and functional overexpression of the Candida rugosa lip1 gene coding for a major industrial lipase*. *Protein Sci*, 1998. **7**(6): p. 1415-22.
158. Yang, Y., Lowe, M.E., *Human pancreatic triglyceride lipase expressed in yeast cells: Purification and characterization*. *Protein Expr Purif*, 1998. **13**: p. 36-40.
159. Rotticci-Mulder, J.C., Gustavsson, M., Holmquist, M., Hult, K., Martinelle, M., *Expression in Pichia pastoris of Candida antarctica lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain*. *Protein Expr Purif*, 2001. **21**(3): p. 386-92.
160. de Vos, W.M., M. Kleerebezem, and O.P. Kuipers, *Expression systems for industrial Gram-positive bacteria with low guanine and cytosine content*. *Curr Opin Biotechnol*, 1997. **8**(5): p. 547-53.
161. Pichuantes, S., Tien Nguyen, A., Franzusoff, A., *Expression of heterologous gene products in yeast.*, in *Protein engineering, principles and practice.*, J.L. Cleland, Craik, C.S., Editor. 1996, Wiley: New York, USA. p. 129-161.
162. Wegner, E.H., *Biochemical conversion by yeast fermentation at high cell densities*. 1983, Phillips Petroleum Company.
163. Bretthauer, R.K. and F.J. Castellino, *Glycosylation of Pichia pastoris-derived proteins*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999. **30 (Pt 3)**: p. 193-200.
164. Cregg, J.M., et al., *Recombinant protein expression in Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000. **16**(1): p. 23-52.

165. Gellissen, G., *Heterologous protein production in methylotrophic yeasts*. Appl Microbiol Biotechnol, 2000. **54**(6): p. 741-50.
166. Sreekrishna, K., Kropp, K.E., in *Pichia pastoris. Nonconventional yeasts in Biotechnology - a handbook.*, K. Wolf, Editor. 1996, Springer-Verlag: Berlin. p. 203-250.
167. Cregg, J.M., Madden, D.R., Barringer, K.J., Thill, G.P., Stillman, C.A., *Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast Pichia pastoris*. Mol Cell Biol, 1989. **9**: p. 1316-1323.
168. Tschopp, J.F., et al., *Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in Pichia pastoris*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(9): p. 3859-76.
169. Minning, S., *Die Lipase aus Rhizopus oryzae: Klonierung, Expression Reinigung und Mutagenese eines industriell relevanten Enzyms für die Biokatalyse und die Strukturbestimmung.*, 1999, Diplomarbeit, Universität Stuttgart: Stuttgart.
170. Antranikian, G., Grote, R., *Die biotechnologische Bedeutung extremophiler Mikroorganismen und ihrer Enzyme*. Biokonversion nachwachsender Rohstoffe. Vol. 10. 1997, Münster: Landwirtschaftsverlag. 25-31.
171. Demirjian, D.C., Moris-Varas, F., Cassidy, C.S., *Enzymes from extremophiles*. Curr. Opin. Chem. Biol., 2001. **5**: p. 144-151.
172. Hough, D.W., Danson, M.J., *Extremozymes*. Curr. Opin. Chem. Biol., 1999. **3**: p. 39-46.
173. Schumacher, K., Heine, E., Höcker, H., *Extremozymes for improving wool properties*. J. Biotechnol, 2001. **89**: p. 281-288.
174. Jaeger, K.E., et al., *Bacterial lipases*. FEMS Microbiol Rev, 1994. **15**(1): p. 29-63.
175. Herbert, R.A., *A perspective on the biotechnological potential of extremophiles*. TIBTECH, 1992. **10**: p. 395-402.
176. Cowan, D.A., *Enzymes from thermophilic archaeobacteria: current and future applications in biotechnology*. Biochem Soc Symp, 1992. **58**: p. 149-69.
177. Rua, M.L., Atomi, H., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R.D., *High-level expression of the thermoalkalophilic lipase from Bacillus thermocatenulatus in Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 1998. **49**(4): p. 405-10.
178. Rua, M.L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A., Schmid, R.D., *Thermoalkalophilic lipase of Bacillus thermocatenulatus large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity*. J Biotechnol, 1997. **56**(2): p. 89-102.
179. Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U., Schmid, R.D., *Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from Bacillus thermocatenulatus*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1301**: p. 105-114.
180. Schmidt-Dannert, C., Rua, M.L., Atomi, H., Schmid, R.D., *Thermoalkalophilic lipase of Bacillus thermocatenulatus. I. molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1301**(1-2): p. 105-14.
181. Schmidt-Dannert, C., Rua, M.L., Wahl, S., Schmid, R.D., *Bacillus thermocatenulatus lipase: a thermoalkalophilic lipase with interesting properties*. Biochem Soc Trans, 1997. **25**(1): p. 178-82.
182. Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Pan, F.M., Chen, S.T., *Optimization of a thermostable lipase from Bacillus stearothermophilus P1: overexpression, purification, and characterization*. Protein Expr Purif, 2001. **22**(3): p. 388-98.
183. Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Wu, Y.T., Pan, F.M., Chen, S.T et al., *Structural modeling and characterization of a thermostable lipase from Bacillus stearothermophilus P1*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(4): p. 868-75.

184. Sinchaikul, S., et al., *Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a thermostable lipase from Bacillus stearothermophilus P1*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2002. **58**(Pt 1): p. 182-5.
185. Kim, H.K., et al., *Gene cloning and characterization of thermostable lipase from Bacillus stearothermophilus L1*. Biosci Biotechnol Biochem, 1998. **62**(1): p. 66-71.
186. Kim, M.H., et al., *Thermostable lipase of Bacillus Stearothermophilus: high-level production, purification, and calcium-dependent thermostability*. Biosci Biotechnol Biochem, 2000. **64**(2): p. 280-6.
187. Amaki, Y., Nakano, H., Yamane, T., *Role of cysteine residues in esterase from Bacillus stearothermophilus and increasing its thermostability by the replacement of cysteines*. Appl Microbiol Biotechnol, 1994. **40**: p. 664-668.
188. Tulin, E.E., et al., *A Bacillus stearothermophilus esterase produced by a recombinant Bacillus brevis stabilized by sulfhydryl compounds*. Biosci Biotechnol Biochem, 1993. **57**(5): p. 856-7.
189. D'Auria, S., et al., *The esterase from the thermophilic eubacterium Bacillus acidocaldarius: structural-functional relationship and comparison with the esterase from the hyperthermophilic archaeon Archaeoglobus fulgidus*. Proteins, 2000. **40**(3): p. 473-81.
190. Sugihara, A., et al., *Purification and characterization of a novel thermostable lipase from Pseudomonas cepacia*. J Biochem (Tokyo), 1992. **112**(5): p. 598-603.
191. Ladenstein, R. and G. Antranikian, *Proteins from hyperthermophiles: stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 1998. **61**: p. 37-85.
192. Kempf, B. and E. Bremer, *Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments*. Arch Microbiol, 1998. **170**(5): p. 319-30.
193. Barth, S., et al., *Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(4): p. 1572-9.
194. da Costa, M.S., H. Santos, and E.A. Galinski, *An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 1998. **61**: p. 117-53.
195. Lamosa, P., et al., *Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile Archaeoglobus fulgidus*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(5): p. 1974-9.
196. Klein, A.R., et al., *N5,N10-methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from the extremely thermophilic sulfate reducing Archaeoglobus fulgidus: comparison of its properties with those of the cyclohydrolase from the extremely thermophilic Methanopyrus kandleri*. Arch Microbiol, 1993. **159**(3): p. 213-9.
197. Klein, A.R., et al., *Two N5,N10-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenases in the extreme thermophile Methanopyrus kandleri: characterization of the coenzyme F420-dependent enzyme*. Arch Microbiol, 1993. **160**(3): p. 186-92.
198. Chung, J.H., et al., *Repair activities of 8-oxoguanine DNA glycosylase from Archaeoglobus fulgidus, a hyperthermophilic archaeon*. Mutat Res, 2001. **486**(2): p. 99-111.
199. McIlwraith, M.J., et al., *RadA protein from Archaeoglobus fulgidus forms rings, nucleoprotein filaments and catalyses homologous recombination*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(22): p. 4509-17.
200. Manco, G., Camardella, L., Febbraio, F., Adamo, G., Carratore, V., Rossi, M., *Homology modeling and identification of serine 160 as nucleophile of the active site*

- in a thermostable carboxylesterase from the archaeon Archaeoglobus fulgidus.* Protein Eng, 2000. **13**(3): p. 197-200.
201. Liu, J.W., Verger, D., Carr, P.D., Yang, H., Ollis, D.L., *Expression, purification and preliminary crystallographic studies of a hyperthermophilic esterase from Archaeoglobus fulgidus.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2000. **56**(Pt 7): p. 900-1.
202. D'Auria, S., Herman, P., Lakowicz, J.R., Bertoli, E., Tanfani, F., Rossi, M., Manco, G., *The thermophilic esterase from Archaeoglobus fulgidus: structure and conformational dynamics at high temperature.* Proteins, 2000. **38**(4): p. 351-60.
203. Manco, G., Carrea, G., Giosue, E., Ottolina, G., Adamo, G., Rossi, M., *Modification of the enantioselectivity of two homologous thermophilic carboxylesterases from Alicyclobacillus acidocaldarius and Archaeoglobus fulgidus by random mutagenesis and screening.* Extremophiles, 2002. **6**(4): p. 325-331.
204. Klenk, H.P., et al., *The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon Archaeoglobus fulgidus.* Nature, 1997. **390**(6658): p. 364-70.
205. Hoegh, I., Patkar, S., Halkier, T., Hansen, M.T., *Two lipases from Candida antarctica: cloning and expression in Aspergillus oryzae.* Can J Bot., 1995. **73**: p. 869-875.
206. Uppenberg, J., Ohrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G.J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T., Jones, T.A., *Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from Candida antarctica reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols.* Biochemistry, 1995. **34**(51): p. 16838-51.
207. Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, s., Jones, T.A., *Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from Candida antarctica.* J Mol Biol, 1994. **235**(2): p. 790-2.
208. Fischer, M., *Personal Communication.* 2004: Stuttgart.
209. Anderson, E.M., Larsson, K.M., Kirk, O., *One biocatalyst - Many applications: The use of Candida antarctica B - lipase in organic synthesis.* Biocat. Biotransform., 1998. **16**: p. 181-204.
210. Overbeeke, P.L.A., Ottosson, J., Hult, K., Jongejan, J.A., Duine, J.A., *The temperature dependence of enzymatic kinetic resolutions reveals the relative contribution of enthalpy and entropy to enzymatic enantioselectivity.* Biocat. Biotransform., 1999. **17**: p. 61.
211. Rotticci, D., Orrenius, C., Hult, K., Norin, T., *Enantiomerically enriched bifunctional sec-alcohols prepared by Candida antarctica lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions.* Tetrahedron: Asymmetry, 1997. **8**: p. 359.
212. Orrenius, c., Öhrner, N., Rotticci, D., Mattson, A., Hult, K., Norin, T., *Candida antarctica lipase B catalysed kinetic resolutions: substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols.* Tetrahedron: Asymmetry, 1995. **6**: p. 1217.
213. Orrenius, C., Haeffner, F., Rotticci, D., Öhrner, T., Norin, T., Hult, K., *Chiral recognition of alcohol enantiomers in acyl transfer reactions catalysed by Candida antarctica lipase B.* Biocat. Biotransform., 1998. **16**: p. 1.
214. Rotticci, D., Haeffner, F., Orrenius, C., Norin, T., Hult, K., *Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by Candida antarctica lipase B.* J Mol Catal B: Enzym, 1998. **5**: p. 267.
215. Rotticci-Mulder, J.C., Hult, K., *Mapping the stereoselectivity pocket of Candida antarctica lipase variants using symmetrical sec-alcohols.* 2003.
216. Suen, W.-C., Daubaras, D.L., Zhang, N., Zaks, A. *Expression of Lipase B from Candida antarctica in Saccharomyces, Aspergillus, and Pichia.*
217. Ishii, M. 1993: USA.
218. Feller, G., Thiry, M., Arpigny, J.L., Mergeay, M., Gerday, C., *Lipases from psychrotrophic antarctic bacteria.* FEMS Microbiol Lett, 1990. **66**: p. 239-244.

219. Feller, G., Thiry, M., Arpigny, J.L., Gerday, C., *Cloning and expression in Escherichia coli of three lipase-encoding genes from the psychrotrophic antarctic strain Moraxella TA144*. Gene, 1991. **102**(1): p. 111-5.
220. Feller, G., M. Thiry, and C. Gerday, *Sequence of a lipase gene from the antarctic psychrotroph Moraxella TA144*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(21): p. 6431.
221. Feller, G., M. Thiry, and C. Gerday, *Nucleotide sequence of the lipase gene lip2 from the antarctic psychrotroph Moraxella TA144 and site-specific mutagenesis of the conserved serine and histidine residues*. DNA Cell Biol, 1991. **10**(5): p. 381-8.
222. Feller, G., M. Thiry, and C. Gerday, *Nucleotide sequence of the lipase gene lip3 from the antarctic psychrotroph Moraxella TA144*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1088**(2): p. 323-4.
223. Cruz, H., Perez, C., Wellington, E., Castro, C., Servin-Gonzalez, L., *Sequence of the Streptomyces albus G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family*. Gene, 1994. **144**: p. 141-142.
224. Breuil, C. and D.J. Kushner, *Partial purification and characterization of the lipase of a facultatively psychrophilic bacterium (Acinetobacter O16)*. Can J Microbiol, 1975. **21**(4): p. 434-41.
225. Arpigny, J.L., G. Feller, and C. Gerday, *Cloning, sequence and structural features of a lipase from the antarctic facultative psychrophile Psychrobacter immobilis B10*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1171**(3): p. 331-3.
226. Arpigny, J.L., G. Feller, and C. Gerday, *Corrigendum to "Cloning, sequence and structural features of a lipase from the antarctic facultative psychrophile Psychrobacter immobilis B10" [Biochim. Biophys. Acta 1171 (1993) 331-333]*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1263**(1): p. 103.
227. Choo, D.W., et al., *A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, Pseudomonas sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(2): p. 486-91.
228. Rashid, N., et al., *Low-temperature lipase from psychrotrophic Pseudomonas sp. strain KB700A*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(9): p. 4064-9.
229. Mayordomo, I., F. Randez-Gil, and J.A. Prieto, *Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from Aspergillus nidulans*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(1): p. 105-9.
230. Gerday, C., et al., *Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1342**(2): p. 119-31.
231. Düring, K.-H., *Polyhydroxyalkanoate*. 2001, Forschungspraktikum, Institut für technische Biochemie: Stuttgart. p. 33.
232. Belev, T.N., Singh, M., McCarthy, J.E., *A fully modular vector system for the optimization of gene expression in Escherichia coli*. Plasmid, 1991. **26**: p. 147-150.
233. Fischer, M., Pleiss, J., *The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(1): p. 319-321.
234. Krebsfänger, N., Schierholz, K., Bornscheuer, U.T., *Enantioselectivity of a rekombinant esterase from Pseudomonas fluorescens towards alcohols and carboxylic acids*. J Biotechnol, 1998. **60**(1-2): p. 105-111.
235. Das, A.K., Bellizzi J.J., Tandel, S., Biehl, E., Clardy, J., Hofmann, S.L., *Structural Basis for the Insensitivity of a Serine Enzyme (Palmitoyl-Protein Thioesterase) to Phenylmethylsulfonyl Fluoride*. The Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(31): p. 23847-23851.
236. Liu, J., et al., *A deoxyinosine specific endonuclease from hyperthermophile, Archaeoglobus fulgidus: a homolog of Escherichia coli endonuclease V*. Mutat Res, 2000. **461**(3): p. 169-77.

237. De Simone, G., Menchise, V., Manco, G., Mandrich, L., Sorrentino, N., Lang, D., Rossi, M., Pedone, C., *The crystal structure of a hyper-thermophilic carboxylesterase from the archaeon Archaeoglobus fulgidus*. J Mol Biol, 2001. **314**(3): p. 507-18.
238. Kojima, Y., M. Yokoe, and T. Mase, *Purification and characterization of an alkaline lipase from Pseudomonas fluorescens AK102*. Biosci Biotechnol Biochem, 1994. **58**(9): p. 1564-8.
239. Jahic, M., Rotticci-Mulder J.C., Martinelle, M., Hult, K., Enfors, S.O., *Modeling of growth and energy metabolism of P.pastoris producing a fusion protein*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2002. **24**: p. 385-393.
240. Jahic, M., Wallberg, F., Bollok, M., Garcia, P., Enfors, S.-O., *Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in Pichia pastoris bioreactor cultures*. Microbial cell Factories, 2003. **2**: p. 1-11.
241. Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, A., *The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica*. Structure, 1994. **2**: p. 293-308.
242. De Bernardez Clark, E., Curr. Opin. Biotechnol., 1998. **9**: p. 157-163.
243. Broglia, R.A., Tiana, G., Proc. Int. School Phys. 'Enrico fermi', 2001. **145**: p. 69-101.
244. Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A., Beckwith, J., *The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15661-7.
245. Novagen, *Katalog, Produktinformation*. 2004/2005: p. 114.
246. LaVallie, E.R., et al., *A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(2): p. 187-93.
247. Wittwer, C.T., Garling, D.J., *Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization*. Biotechniques, 1991. **10**: p. 76-83.
248. Petri, R., Imhoff, J.F., *Genetic analysis of sea-ice bacterial communities of the Western Baltic Sea using an improved double gradient method*. Polar Biol., 2001. **24**: p. 252-257.
249. Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, c., Mattes, R., Siemann, M., Altenbuchner, J., *High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the Escherichia coli rhaBAD promotor*. Biotechnol. Bioeng., 2001. **73**: p. 95-103.
250. Traub, P.C., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J., Schmid, R.D., *Gene synthesis, expression in E.coli, and in vitro refolding of Pseudomonas sp. KWI 56 and Chromobacterium viscosum lipases and their chaperones*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001. **55**: p. 198-204.
251. Denner, E.B., et al., *Psychrobacter proteolyticus sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill Euphausia superba Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease*. Syst Appl Microbiol, 2001. **24**(1): p. 44-53.
252. Voigt, C.A., S. Kauffman, and Z.G. Wang, *Rational evolutionary design: the theory of in vitro protein evolution*. Adv Protein Chem, 2000. **55**: p. 79-160.
253. Herzenberg, L.A., et al., *The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford*. Clin Chem, 2002. **48**(10): p. 1819-27.
254. Luria, S.E., Adams, J.N., and Ting, R.C., *Transduction of lactose utilizing ability among strains of E.coli and S.dysenteriae and the properties of transducing phage particle*. Virology, 1960. **12**: p. 348-90.
255. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**: p. 5463-7.

256. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. 1977. *Biotechnology*, 1992. **24**: p. 104-8.
257. Porath, J., et al., *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*. *Nature*, 1975. **258**(5536): p. 598-9.
258. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal. Biochem.*, 1976. **72**: p. 248-254.
259. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**: p. 680-5.
260. Karpushova, A.A., *Screening, Nucleotide Sequencing and Biochemical Characterisation of Novel Lipolytic Enzymes from Bacillus sp. 01-855 associated with Marine Sponge Aplysina aerophoba*, in *Institut für Technische Biochemie*. 2004, Universität Stuttgart: Stuttgart. p. 156.
261. Purdy, R.E., Kolattukudy, P.E., *Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from Fusarium solani f. pisi: isolation and some properties of the enzyme*. *Arch Biochem Biophys*, 1973. **159**: p. 61-69.
262. Peled, N., Krenz, M.C., *A new assay for microbial lipases with emulsified trioleoyl glycerol*. *Anal. Biochem.*, 1981. **112**: p. 219-22.
263. Kim, H.K., Jung, Y.-J., Choi, W.-C., Ryu, H.S., Oh, T.-K., and Lee, J.-K., *Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004. **235**: p. 349-355.
264. Schmidt-Dannert, C., Umeno, D., and Arnold, F.H., *Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways*. *Nature Biotechnology*, 2000. **18**: p.750-753.

10 Lebenslauf

Name	Monika Rusnak, geb. Müller
Geburtsdatum	02. September 1974
Geburtsort	Ludwigsburg
Schulbildung	
1981 - 1985	August Lämmle Grundschule, Ludwigsburg
1985 - 1994	Friedrich Schiller Gymnasium, Ludwigsburg
Schulabschluss	
1994	Abitur; Gesamtnote: befriedigend (2,6)
Freiwilliges Soziales Jahr	
1994 - 1995	Altenpflegeheim am Kappelberg, Fellbach
Wissenschaftliche Ausbildung	
WS 1995 - WS 2001	Studium der Biologie an der Universität Hohenheim Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Zoophysiology, Biochemie, Virologie
Juni 2000 - März 2001	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Angel Alonso, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg Thema: Auswirkungen von Punktmutationen am intrazellulären Teil des EGF-Rezeptors auf die EGF-abhängige Signaltransduktion in CHO-09 Zellen
Hochschulabschluss	
März 2001	Diplom-Biologin; Gesamtnote: sehr gut (1,2)
Promotion	
seit Juni 2001	Promotion bei Prof. Dr. Rolf D. Schmid, Institut für technische Biochemie, Universität Stuttgart Thema: Untersuchungen zur enzymatischen Enantiomerentrennung von Glykolethern und Etablierung neuer Methoden des synthetischen Shufflings

11 Anhang

11.1 Sequenz der Lipase A aus *Archaeoglobus fulgidus*

1	ATGAGAGGGCTTGCCGTGCTGGTGTGCTGGTTTTTGCCTGTCAGGTGGCAGCAGCGGAAGACTTTAGA	69
	M R G L A V L V L L V F A V Q V A A A E D F R	
70	CCGGTAGTGTGGTGACGGTCTTGCGGGTTCTGCTGGACAGTTCGAGAGCCAGGGGATGAGGTTTGCT	138
	P V V F V H G L A G S A G Q F E S Q G M R F A	
139	GCAAACGGATATCCGGCAGAGTATGTCAAACCTTCGAATACGACACGATTTCTGTTGGCTTTGGTTGTG	207
	A N G Y P A E Y V K T F E Y D T I S W A L V V	
208	GAAACTGACATGCTCTTCAGCGGACTTGGGAGCGAATTCGGGCTGAACATCAGCCAGATTATCGACCCT	276
	E T D M L F S G L G S E F G L N I S Q I I D P	
277	GAAACGCTTGACAAGATACTTTCCAAGAGCAGGGAGAGGCTGATTGACGAAACCTTCAGCAGGCTCGAC	345
	E T L D K I L S K S R E R L I D E T F S R L D	
346	AGGGTCATAGACGAAGCTCTCGCTGAAAGCGGAGCGGATAAGGTGGATCTGGTCGGGCACCTCAATGGGG	414
	R V I D E A L A E S G A D K V D L V G H S M G	
415	ACGTTTTTCTGGTTCAGATACGTCAACTCTCTCTGAGAGGGCTGCGAAGGTTGCGCACCTCATTCTT	483
	T F F L V R Y V N S S P E R A A K V A H L I L	
484	CTTGACGGCGTCTGGGGGTTGATGCTCCCGAAGGGATTCCGACGCTTGCAGTGTTCGGAATCCGAAA	552
	L D G V W G V D A P E G I P T L A V F G N P K	
553	GCTCTGCCGGCTCTCGGACTTCCGGAGGAGAAGGTTGTTTACAACGCAACCAACGTTTACTTCAACAAC	621
	A L P A L G L P E E K V V Y N A T N V Y F N N	
622	ATGACGCACGTTTCAGTCTGCACCTTCTCCGAAACTTTTGCGGTGATGTTTGAGTTCATAAACGGCTAC	690
	M T H V Q L C T S P E T F A V M F E F I N G Y	
691	AAGCCAGCAACAACCGACATAGTCCCGCAGGATGGAGATTACGTTGAAGGTTAAGGGGAAGTTTCTGGCC	759
	K P A T T D I V P Q D G D Y V K V K G K F L A	
760	TTTGCACCAATGGTGACGTTTTCGGGATGGCTGTCAATCTATCCGATAGACGAGAACGGCAAGAGGTTG	828
	F A T N G D V S G W L S I Y P I D E N G K R L	
829	ACGAGGTTGCCCGTCAAGTTCATGAGGGTGAAGGGGACTTTGAGGTCAGGCTCAGGAAGGGGCAGCTT	897
	T R L P V K F M R V K G D F E V R L R K G Q L	
898	TACGAGTTCAGTTCGCAAGGACTTCAGCCCCATCAATTTACTACTACCGCGCCCCCTTCGTGAGA	966
	Y E F Q F R K D F S P I I Y H Y Y R A P F V R	
967	GATGACCTGTGGGCGAGGTTTCTGGTATCAAAGCCTCCCCTCGACGTGGAGCTTTTGATACTGCCCGAA	1035
	D D L W A R F L V S K P P L D V E L L I L P E	
1036	AGACTCTCCCAGCAGCAAGGAGACATCGGGACTGCTGCTGATTAGATACAAGGAGATGATAGCGCAG	1104
	R L S P A A K E T S G L L L I R Y K E M I G E	
1105	TATGACGAGGAGATTGGCGGTGTTGATGAGGTTTACGTTGAATGGTGTCAACGTCTGCACTGAGAGAATC	1173
	Y D E E I G G V D E V Y V N G V N V C T E R I	
1174	TGCCCATTTGAGAGACCGTCAACGGGCTATGGGTTCTCGACAGGGGGCTGATGGAAGAGCGATCTT	1242
	C P I E R A V N G L W V F D R G A D G K S D L	
1243	GACAGAGAGGTTGTTAGTACTCCATAATGCCTTTTCATGAGCGCCGCCGACCTTGTGTCCCTGCGGAG	1311
	D R E V V R Y S I M P F M S A A D L V V P A E	
1312	GGGACGATAAGCATAGCTGTGAAGTCGAGAACCCTGGGGAGGAAAGCTTACCATCCCGCATGGTCT	1380
	G T I S I A V K S R T G G E E S F T I P A W S	
1381	GCGGACAGGCACTCGATTATCGTGCAGTTTTTCGATTACATTTAA	1425
	A D R H S I I V Q F S D Y I -	

Abbildung 11.1: Sequenz der Lipase A aus *Archaeoglobus fulgidus*.

Gen und Produkt des Genlokus AF1763, NCBI Zugangsnummer NP_070591. Die in den Mutanten S136C, D163N, D169N, H210N und Y244stop veränderten Positionen sind grau unterlegt.

11.2 Sequenz der Lipase B aus *Pseudozyma tsukubaensis*

1	CTCCCTTCGGGCTCGGACCCCTGCCTTCAGCACCCCGCAGTCCACCCTTGCTGCCGGTCTC L P S G S D P A F S T P Q S T L A A G L	60
61	ACCTGCCAAAGTGGCTCCCCCTCCTCGGTCTCTAACCTATCCTTCTCGTTCCTGGAACA T C Q S G S P S S V S N P I L L V P G T	120
121	GGTACCACCGGTCTCAATCTTTTCTGACTCCAACCTGGATTCCGCTCTCCACAATGCTCGGT G T T G P Q S F D S N W I P L S T M L G	180
181	TACTTCCGTGCTGGGTCTCGCCCCCTCCTTACATGCTCAACGACTCGCAAATCAACGCC Y T P C W V S P P P Y M L N D S Q I N A	240
241	GAATACATTGTCAATGCCGTAAACACACTTTACTCTGGCAGCGGCTCTAAGAAGGTTCCC E Y I V N A V N T L Y S G S G S K K V P	300
301	GTTCTCACATGGTCTCAGGGAGGTTTGGCCACGCAATGGGCATTGACCTTCTTCCCAAGC V L T W S Q G G L A T Q W A L T F F P S	360
361	ATCAGGTCCAAGGTCGACAGGCTGATGGCTTTTCGCTCCGGACTACAAGGCACCATCGAG I R S K V D R L M A F A P D Y K G T I E	420
421	GCCGACTTCTGGATGCTGTCTCGGAGCAAGTGCACCCAGTGTCTGGCAACAGACTGCAGGA A G L L D A V G A S A P S V W Q Q T A G	480
481	TCCGCTTTTCGCTCACTGCCCTTCAAACGCAGGTGGACTCAACGAGATCATTCCCACCACC S A F V T A L Q N A G G L N E I I P T T	540
541	AACCTCTACTCGGCCACTGACGACATCGTTTCAGCCTCAAGTTACCAACTCGCCCCCTCGAT N L Y S A T D D I V Q P Q V T N S P L D	600
601	TCAAGCTACCTTTTCAACGGCAAAAACATCCAGGCTCAGAGCGTCTGCGGACCCCTCTTC S S Y L F N G K N I Q A Q S V C G P L F	660
661	ATCATCGACCACGCTGGCTCCCTCACCTCGCAGTTTCTTACGTCGTTGGTAAATCCGCT I I D H A G S L T S Q F S Y V V G K S A	720
721	CTGGTAAGCTTGACCCGAAAAGGCTCAGAGCAGCGACTACGGCTTGAAGGACTGCAACCCG L V S L T G K A Q S S D Y G L K D C N P	780
781	CTCCCTGCCGACAACCTGACCGCTCAGCAGAAGTTGCAGGCTGAGGGTCTGCTATTGGTT L P A D N L T A Q Q K L Q A E G L L L V	840
841	GCCGGTGCCAACCTCGCTACCGGCCCTAAGCAGAATTGCGAGCCTGACCTCATGCCCTAC A G A N L A T G P K Q N C E P D L M P Y	900
901	GCTAGGAGGTACGCTTTCGGCAAGAAGACCTGCTCGGCATCATCCTCTGA A R R Y A F G K K T C S G I I L -	951

Abbildung 11.2: Sequenz der *Pseudozyma tsukubaensis* Lipase B.

Dargestellt ist die Sequenz der aus *Pseudozyma tsukubaensis* amplifizierten *lipb*. Die in blauer Schrift dargestellte Aminosäuresequenz stimmt mit der Referenzsequenz überein [99].

11.3 Sequenz der Lipase B aus *Candida antarctica*

calb_ncbi	CTACCTTCCGGTTCGGACCCCTGCCTTTTCGCAGCCCAAGTCGGTGCTCGATGCGGGTCTG	60
calb_iso	L P S G S D P A F S Q P K S V L D A G L	20
calb_ncbi	ACCTGCCAGGGTGCCTTCGCCATCCTCGGTCTCCAAACCCATCCTTCTCGTCCCCGGAACC	120
calb_iso	T C Q G A S P S S V S K P I L L V P G T	40
calb_ncbi	GGCACCACAGGTCCACAGTCGTTTCGACTCGAACTGGATCCCCCTCTCAACGCAGTTGGGT	180
calb_iso	G G C A C C A C A G G T C C A C A G T C G T T C G A C T C G A A C T G G A T C C C C C T C T C A A C G C A G T T G G G T	60
calb_ncbi	TACACACCCTGCTGGATCTCACCCCGCCGTTTCATGCTCAACGACACCCAGGTCAACACG	240
calb_iso	Y T P C W I S P P P F M L N D T Q V N T	80
calb_ncbi	GAGTACATGGTCAACGCCATCACCCCGCTCTACGCTGGTTCGGGCAACAACAAGCTTCCC	300
calb_iso	E Y M V N A I T T L Y A G S G N N K L P	100
calb_ncbi	GTGCTTACCTGGTCCCAGGGTGGTCTGGTTGCACAGTGGGGTCTGACCTTCTTCCCCAGT	360
calb_iso	V L T W S Q G G L V A Q W G L T F F P S	120
calb_ncbi	ATCAGGTCCAAGGTCGATCGACTTATGGCCTTTGCGCCCGACTACAAGGGCACCGTCTC	420
calb_iso	I R S K V D R L M A F A P D Y K G T V L	140
calb_ncbi	GCCGGCCCTCTCGATGCACTCGCGGTTAGTGCACCTCCGTATGGCAGCAAACCACCGGT	480
calb_iso	A G P L D A L A V S A P S V W Q Q T T G	160
calb_ncbi	TCGGCACTCACACCCGCACTCCGAAACGCAGGTGGTCTGACCCAGATCGTGCCACCACC	540
calb_iso	S A L T T A L R N A G G L T Q I V P C T T	180
calb_ncbi	AACCTTACTCGGCGACCGACGAGATCGTTCAGCCTCAGGTGTCCAACCTCGCCACTCGAC	600
calb_iso	N L Y S A T D E I V Q P Q V S N S P L D	200
calb_ncbi	TCATCTACCTCTTCAACGGAAAGAACGTCCAGGCACAGGCCTGTGTGGGGCCGCTGTTC	660
calb_iso	S S Y L F N G K N V Q A Q A V C G P L F	220
calb_ncbi	GTCATCGACCATGCAGGCTCGCTCACCTCGCAGTTCTCCTACGTCGTCGGTCGATCCGCC	720
calb_iso	V I D H A G S L T S Q F S Y V V G R S A	240
calb_ncbi	CTGCGCTCCACCACGGGCCAGGCTCGTAGTGCAGACTATGGCATTACGGACTGCAACCTT	780
calb_iso	L R S T T G Q A R S A D Y G I T D C N P	260
calb_ncbi	CTTCCCGCCAATGATCTGACTCCCAGCAAAAAGGTCGCGCGGGTGCCTCCTGGCGCCG	840
calb_iso	L P A N D L T P E Q K V A A A A L L A P	280
calb_ncbi	GCAAGTGCAGCCATCGTGGCGGGTCCAAAGCAGAAGTGCAGCCCGACCTCATGCCCTAC	900
calb_iso	A A A A I V A G P K Q N C E P D L M P Y	300
calb_ncbi	GCCGCCCCCTTTGCAGTAGGCAAAAAGGACCTGCTCCGGCATCGTCACCCCTGA	954
calb_iso	A R P F A V G K R T C S G I V T P -	317

Abbildung 11.3: Sequenz des *Candida antarctica* Lipase B.

Dargestellt ist ein Sequenzalignment der veröffentlichten *calB*-Sequenz (calb_ncbi, NCBI Zugangsnummer CAA83122) und der in dieser Arbeit aus *Candida antarctica* amplifizierte *calB* (calb_iso). Stille Mutationen sind gelb unterlegt. Die Positionen der Mutationen T57A und A89T sind rot hervorgehoben. Die Sequenz der amplifizierte CalB ist in blauer Schrift dargestellt. Die Positionen der Mutationen G39A, Q247stop, P260stop, P280stop, A281L, A281V, A281F und P289stop sind grau unterlegt.

11.4 Sequenz der Lipase 1 aus *Moraxella* sp. TA144

lip1_org	ATGTTTATCATGATAAAAAAGTCTGAGCTTGCAAAAAGCTATTATCGTCACGGGCGCGTTG	60
lip1_opt	ATGTTTATCATGATCAAAAAATCTGAACTGGCAAAAAGCTATTATCGTCACGGGCGCGTTG M F I M I K K S E L A K A I I V T G A L	20
lip1_org	GTTTTTTCTATAACCGACTTTAGCTGAAGTTACCTTATCTGAAACCACGGTTAGCTCAATA	120
lip1_opt	GTTTTTTCTATTCGGACCTTAGCTGAAGTTACCTTATCTGAAACCACGGTTAGCTCAATT V F S I P T L A E V T L S E T T V S S I	40
lip1_org	AAATCTGAAGCTACGGTTAGCTCAACAAAAAAGCATTACCAAGCAACGCCGTCAGATTGT	180
lip1_opt	AAATCTGAAGCTACGGTTAGCTCAACAAAAAAGCATTACCGCAACGCCGTCAGATTGT K S E A T V S S T K K A L P A T P S D C	60
lip1_org	ATTGCTGATAGCAAAATTACAGCAGTTGCTCTTTCAGATACTCGTGATAATGGCCCCTTT	240
lip1_opt	ATTGCTGATAGCAAAATTACTGCGAGTTGCTCTGTCAGATACTCCGTGATAATGGCCCCTTT I A D S K I T A V A L S D T R D N G P F	80
lip1_org	TCTATCCGTACCAAACGCATTTTCGCGCCAGTCGGCGAAGGGTTTCGGTGGTGGTACGATT	300
lip1_opt	TCTATCCGTACCAAACGCATTTTCGCGCCAGTCGGCGAAGGGTTTCGGTGGTGGTACGATT S I R T K R I S R Q S A K G F G G G T I	100
lip1_org	CACTACCCAACCAACGCTAGCGGCTGCGGTCTGTTAGGCGCTATTGCCGTGGTTCCGGT	360
lip1_opt	CACTACCCGACCAACGCTAGCGGCTGCGGTCTGTTAGGCGCTATTGCCGTGGTTCCGGT H Y P T N A S G C G L L G A I A V V P G	120
lip1_org	TACGTTTCTTACGAAACTCTATCAAGTGGTGGGGACCGCGTCTGGCTTCTTGGGGCTTT	420
lip1_opt	TACGTTTCTTACGAAACTCTATCAAGTGGTGGGGACCGCGTCTGGCTTCTTGGGGCTTT Y V S Y E N S I K W W G P R L A S W G F	140
lip1_org	GTCGTTATCACTATCAATACCAACTCTATCTATGATGATCCAGATAGTAGAGCCGCACAA	480
lip1_opt	GTCGTTATCACCATCAATACCAACTCTATCTATGATGATCCGGATAGCCGCCGCACAG V V I T I N T N S I Y D D P D S R A A Q	160
lip1_org	TTGAATGCAGCACTAGATAACATGATTGCTGATGACACCGTCGGCAGTATGATAGATCCT	540
lip1_opt	TTGAATGCAGCACTAGATAACATGATTGCTGATGATACCGTCGGCAGTATGATAGATCCT L N A A L D N M I A D D T V G S M I D P	180
lip1_org	AAGCGGTTGGGCGCTATTGGCTGGTCAATGGGTGGCGGGCGCGCTTAAACTGGCAACG	600
lip1_opt	AAACGGTGGGCGCTATTGGCTGGTCAATGGGTGGCGGGCGCGCTGAAACTGGCAACG K R L G A I G W S M G G G G A L K L A T	200
lip1_org	GAGCGCAGCACAGTACGAGCCATTATGCCACTAGCGCCCTATCATGACAAAAGCTATGCC	660
lip1_opt	GAGCGCAGCACAGTACGAGCCATTATGCCCTAGCGCCCTATCATGATAAAAGCTATGCC E R S T V R A I M P L A P Y H D K S Y G	220
lip1_org	GAGGTAAAAACGCCAACCTTGGTCATTGCCTGCGAGGATGACCGGATTGCTGAGACTAAG	720
lip1_opt	GAGGTAAAAACGCCAACCTTGGTCATTGCCTGCGAGGATGATCGGATTGCTGAAACAAA E V K T P T L V I A C E D D R I A E T K	240
lip1_org	AAATATGCCAACGCGTTTTTATAAAAATGCCATTGGCCCCAAGATGAAAGTTGAAGTAAAC	780
lip1_opt	AAATATGCCAACGCGTTTTTATAAAAATGCCATTGGCCCCGAAAATGAAAGTTGAAGTAAAC K Y A N A F Y K N A I G P K M K V E V N	260
lip1_org	AATGGCAGTCACTTTTGTCCAAGCTACCGCTTTAACGAGATACTTTTAAGTAAGCCTGGC	840
lip1_opt	AATGGCAGCCACTTTTGTCCGAGCTACCGCTTTAACGAAATTTCTGTTAAGCAAAACCGGGC N G S H F C P S Y R F N E I L L S K P G	280
lip1_org	ATCGCGTGGATGCAGCGTTATATTAATAATGATACACGCTTTCGATAAAATCTTATGTGCC	900
lip1_opt	ATCGCGTGGATGCAGCGTTATATTAATAATGATACCGCTTTCGATAAAATCTTATGTGCC I A C W M Q R Y I N N D T R F D K F L C A	300
lip1_org	AACGAAAACATAGCAAAAAGCCCCGCGTATCTCAGCTTATGATTATAAAGATTGCCCATAA	960
lip1_opt	AACGAAAACATAGCAAAAAGCCCCGCGTATCTCAGCTTATGATTATAAAGATTGCCCATAA N E N Y S K S P R I S A Y D Y K D C P -	319

Abbildung 11.4: Sequenz von *lip1* bzw. des korrespondierenden Genprodukts.

Lip1_org: Originalsequenz der *Moraxella* sp. TA144 Lipase 1 ([220], NCBI Zugangsnummer X53053), lip1_opt: zur Expression der Lip1 in *E.coli* optimierte Gensequenz. Blaue Schrift: Aminosäuresequenz von Lip1. Gelb hervorgehobene Nukleotide: Änderungen der DNA-Sequenz.