

# **Expressionsoptimierung und Produktion von Haloalkan Dehalogenasen zur Umsetzung von 1,2,3-Trichlorpropan**

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

vorgelegt von  
**Christina Fritz**  
aus UHINGEN

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. Dr. h. c. M. Reuss

Mitberichter: Prof. Dr. R. D. Schmid

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2007

Institut für Bioverfahrenstechnik  
Universität Stuttgart  
2007

---

---

---

## Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT) der Universität Stuttgart bei meiner Mitarbeit an einem Industrieprojekt der Firma DOW Chemical. Im Laufe meiner Promotion habe ich von vielen Menschen Unterstützung und Anregungen erhalten, denen ich auf diesem Wege Danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Reuss für die akademischen Freiheiten, die Unterstützung meiner Ideen, sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am IBVT. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Professor Schmid für sein Interesse an dieser Arbeit, sowie für die Übernahme des Mitberichts.

Bei Herrn Dr. Martin Siemann-Herzberg möchte ich mich für sein stetiges Interesse an dem Fortgang meiner Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und für die gute Betreuung ganz herzlich bedanken. Seine Anteilnahme hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Das Entstehen dieser Arbeit war entscheidend geprägt durch die angenehme Arbeitsatmosphäre am Institut und die damit verbundenen anregenden fachlichen und nicht fachlichen Gespräche. Dafür bedanke ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen am Institut ganz herzlich. Insbesondere möchte ich mich bei Sandra Baumann, Andreas Freund, Alexander Müller, Petra Schlack und Martina Schweikert für die aufmunternden Worte, sowie für die schöne Zeit am und außerhalb des Instituts bedanken.

Nicht unerwähnt bleiben sollen auch meine studentischen Mitarbeiter Michael Dieterle, Alexander Faude, Vanessa Walter und Anne Steinkämper, die durch ihre Unterstützung bei der praktischen Umsetzung von Versuchen einen maßgeblichen Anteil am Erfolg dieser Arbeit hatten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mich während meines Ausbildungswegs stets unterstützt haben und mir immer Verständnis entgegengebracht haben. Schließlich möchte ich mich bei meinem Freund Matthias Mehner bedanken für seine große Geduld und Anteilnahme.

---

*Für meine Eltern*

---

## Inhaltsverzeichnis:

<b>Vorwort</b> .....	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Kurzfassung</b> .....	<b>1-1</b>
<b>Abstract</b>	
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1-3</b>
1.1. Haloalkan Dehalogenase.....	1-6
1.2. Heterologe Genexpression - „Inclusion bodies“ .....	1-10
1.3. Proteinaufreinigung.....	1-14
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	1-17
<b>2. Material</b> .....	<b>2-21</b>
2.1. Mikroorganismen und Vektoren .....	2-21
2.1.1. Eingesetzte Bakterienstämme .....	2-21
2.1.2. Plasmide.....	2-22
2.1.3. Primer.....	2-23
2.2. Nährmedien .....	2-24
2.2.1. Medien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	2-24
2.2.2. Medien zur Kultivierung von <i>Pseudomonas putida</i> .....	2-25
2.2.3. Antibiotika und Medienzusätze .....	2-25
2.3. Chemikalien und Enzyme .....	2-26
2.3.1. Chemikalien.....	2-26
2.3.2. Kits .....	2-26
2.3.3. Enzyme .....	2-26
2.4. Puffer und Lösungen .....	2-27
2.5. Magnetpartikel zur Proteinaufreinigung .....	2-29
<b>3. Methoden</b> .....	<b>3-30</b>
3.1. Mikrobiologische Methoden .....	3-30
3.1.1. Stammhaltung .....	3-30
3.1.2. Kultivierung im Schüttelkolben .....	3-30
3.1.3. Kultivierung im 30 l- Bioreaktor .....	3-30
3.1.4. Zellaufschlussmethoden .....	3-30
3.1.5. Zentrifugation .....	3-31

---

3.2. Proteinbiochemische Methoden.....	3-31
3.2.1. <i>In vitro</i> Biosynthese .....	3-31
3.2.2. Aktivitätstest .....	3-32
3.2.3. Analytik .....	3-33
3.2.4. Proteinaufreinigungsmethoden .....	3-35
3.2.5. SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	3-39
3.2.6. Densimetrische Auswertung von SDS-Proteingelen.....	3-40
3.3. Molekularbiologische Methoden .....	3-40
3.3.1. Isolierung und Reinigung von DNA.....	3-40
3.3.2. Charakterisierung der DNA .....	3-40
3.3.3. Gen- Amplifikation .....	3-40
3.3.4. Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren.....	3-41
3.3.5. Agarosegelelektrophorese .....	3-41
3.3.6. Herstellung kompetenter Zellen .....	3-42
3.3.7. Transformation mit der TSS Methode .....	3-42
3.3.8. Konjugation .....	3-42
3.3.9. Quick Change Mutagenese.....	3-42
3.4. Software.....	3-43
3.4.1. <i>mfold</i> - "folding index"-Berechnung .....	3-43
<b>4. <i>In vivo</i> Proteinfaltung heterologer Proteine .....</b>	<b>4-44</b>
4.1. Grundlagen für die Expressionsoptimierung von DhaA, DSD4 und DSD49 .....	4-44
4.1.1. Haloalkan Dehalogenase DhaA.....	4-46
4.1.2. Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49.....	4-48
4.2. Experimentelle Ansätze zur Optimierung der Proteinexpression .....	4-50
4.2.1. Verringerung der Proteinbiosyntheserate .....	4-50
4.2.2. Mediumszusätze während der Kultivierung von Mikroorganismen.....	4-53
4.2.3. Einsatz von unterschiedlichen Wirtsorganismen .....	4-55
4.2.3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	4-55
4.2.3.2. <i>Pseudomonas putida</i> .....	4-59
4.2.4. Einsatz von Fusionsproteinen .....	4-60
4.2.5. Zusammenfassung experimenteller Ansätze zur Optimierung der heterologen Proteinexpression von Haloalkan Dehalogenasen .....	4-64
4.3. Modellgestützte Ansätze der Expressionsoptimierung .....	4-70
4.3.1. "Codon usage".....	4-70
4.3.2. Löslichkeitsmodell nach Wilkinson und Harrison .....	4-74
4.3.3. Änderungen des Translationsprofils innerhalb der Haloalkan Dehalogenase DSD4.....	4-79

---

4.3.4.	Auswirkungen von Punktmutationen auf die <i>in vivo</i> Proteinfaltung .....	4-87
4.3.5.	Zusammenfassung der modellgestützten Ansätze zur Optimierung der heterologen Genexpression von Haloalkan Dehalogenasen .....	4-96
4.4.	Experimentelle Methoden versus modellgestützte Ansätze.....	4-100
<b>5.</b>	<b>Produktion und Aufreinigung von Haloalkan Dehalogenasen .....</b>	<b>5-105</b>
5.1.	Grundlagen für die Produktion und den Downstream Prozess der Haloalkan Dehalogenasen.....	5-105
5.1.1.	Haloalkan Dehalogenase DhaA und DhaA <sup>CYYF</sup> .....	5-105
5.1.2.	Kriterien für den Produktions- und Downstream Prozess .....	5-106
5.1.3.	Integrierte Verfahren .....	5-108
5.2.	Enzymproduktion mittels Hochzell-dichte- Fermentation .....	5-110
5.2.1.	Expressionssystem .....	5-110
5.2.2.	Hochzell-dichte- Fermentation .....	5-112
5.3.	Proteinaufreinigung.....	5-118
5.3.1.	Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle .....	5-119
5.3.2.	Proteinaufreinigung mittels Magnettrenntechnik.....	5-121
5.3.2.1.	Versuche im Labormaßstab .....	5-122
5.3.2.2.	Versuche im technischen Maßstab .....	5-125
5.3.3.	Konditionierung des rekombinanten Proteins .....	5-135
5.4.	Fazit aus den Ergebnissen des Produktions- und Downstream-Prozesses .....	5-138
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>6-142</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>7-149</b>
7.1.	DNA-Sequenzen.....	7-149
7.2.	Plasmidkarten .....	7-155
7.3.	Abkürzungen.....	7-159
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>8-161</b>

---

---



## Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Herstellung von Haloalkan Dehalogenasen zur biokatalytischen Umsetzung des prochiralen 1,2,3-Trichlorpropan zu dem (R) oder (S) Enantiomer des 2,3-Dichlor-1-propanol. Die Bereitstellung dieser Enzyme schließt sowohl eine Optimierung der heterologen Proteinexpression im jeweiligen Wirtsorganismus, als auch die Produktion und Aufreinigung des Biokatalysators ein.

Die von der Firma DOW Chemicals bereitgestellten Haloalkan Dehalogenasen unterscheiden sich im Wesentlichen hinsichtlich ihrer ee-Werte bezüglich des Produkts 2,3-Dichlor-1-propanol und im Hinblick auf ihr Expressionsverhalten in *Escherichia coli*. Für die aus einem Bodenscreening stammenden Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 wird auf Grundlage von experimentellen Ansätzen das intrazelluläre Expressionsniveau dieser Proteine signifikant erhöht. Weiterhin werden auf Grundlage von modellgestützten Ansätzen Ursachen für die Bildung von „Inclusion bodies“ während der heterologen Expression dieser Haloalkan Dehalogenasen herausgearbeitet.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der fermentativen Produktion von Haloalkan Dehalogenasen in *E. coli* über eine Hochzelldichte-Kultivierung im 30 l-Maßstab und dem anschließenden Downstream-Prozess der Biokatalysatoren. Das Ziel dieses Arbeitsschwerpunkts liegt darin, den Biokatalysator im halbtechnischen Maßstab möglichst kostengünstig und innerhalb kurzer Zeit herzustellen. Für die Etablierung des Gesamtprozesses wird eine Haloalkan Dehalogenase aus *Rhodococcus rhodochrous* (DhaA) eingesetzt. DhaA weist gegenüber den DSD Varianten bezüglich des Produkts eine geringere Enantioselektivität auf, zeichnet sich aber bereits zu Beginn der Arbeit durch ein hohes Expressionsniveau in dem Wirtsorganismus *E. coli* aus. Innerhalb des Downstream-Prozesses wird die „High Gradient Magnetic Fishing“-Technik eingesetzt. Dieses Verfahren ermöglicht, wesentliche Schritte eines klassischen Chromatographie-Aufreinigungsverfahrens zu umgehen, was zu einer Kosten- und Zeitersparnis führt. Mit Hilfe der Magnettrenntechnik lässt sich der Downstream-Prozess für Haloalkan Dehalogenasen auf die drei Arbeitsschritte des Zellaufschlusses, der Affinitätsaufreinigung mittels HGMF und der Konditionierung des Biokatalysators über eine Ultrafiltration reduzieren.

## Schlagwörter

Haloalkan Dehalogenasen, 1,2,3-Trichlorpropan, heterologe Proteinexpression, Hochzelldichte Fermentation (HCD), High Gradient Magnetic Fishing (HGMF)

## Abstract

The work presented here focuses on the production of haloalkane dehalogenases for the conversion of prochiral 1,2,3-trichloropropan into the (R) or (S) enantiomere of 2,3-dichloro-1-propanol. This includes the optimization of the heterologous protein expression for the haloalkane dehalogenases in different host organisms as well as the production and downstream process of the biocatalysts.

Haloalkane dehalogenases provided by DOW Chemicals differ mainly in their ee-values towards the product 2,3-dichloro-1-propanol and in their expression behaviour in the host organism *Escherichia coli*. The intracellulare expression level of two of these haloalkane dehalogenases DSD4 and DSD49, derived from a soil based screening, was significantly improved by experimental approaches during cultivation. More causes for inclusion-body-formation during heterologous protein expression are pointed out by model based methods.

The second part of this work deals with the production of haloalkane dehalogenases in *E. coli* by high cell density (HCD) cultivation in a 30 l scale followed by downstream processing of the biocatalysts. The aim of this workscope is the production of the enzyme in large scale in a cost- and time- saving manner. The whole process is established by a haloalkane dehalogenase from *Rhodococcus rhodochrous* (DhaA). In comparison with DSD variants DhaA has a lower enantioselectivity towards the product 2,3-dichloro-1-propanol, but the enzyme shows a high expression level as well as little inclusion body formation in *E. coli* right from the beginning of this work. Along with downstream processing a method called "high gradient magnetic fishing" (HGFM) separation is integrated. The HGFM operation allows reduction of purification steps necessary when fixed bed columns are used for protein purification. In this way saving of costs and time can be achieved. By including the magnetic separation technique, the downstream process of haloalkane dehalogenases can be reduced into three purification steps: (1) Cell disruption by glass bead mill, (2) affinity protein purification via the HGFM technique and (3) conditioning of the biocatalyst by ultrafiltration.

## Keywords

Haloalkane dehalogenase, 1,2,3-trichloropropane, heterologous protein expression, high cell density fermentation (HCD), high gradient magnetic fishing (HGFM)

---

## 1. Einleitung

Die Weiße Biotechnologie umfasst sowohl die Verfahrensentwicklung zur Herstellung neuer Produkte als auch den Ersatz von klassisch-chemischen Produktionsverfahren durch die Biokatalyse (Jaworski et al. 2001; Frazzetto 2003). Der Anteil an biotechnischen Verfahren zur Generierung von chemischen Produkten wird derzeit auf etwa 5 % geschätzt, wobei dieser bis 2010 nach einer Studie von Festel (Festel et al. 2004) auf etwa 20 % steigen soll (Abbildung 1-1).

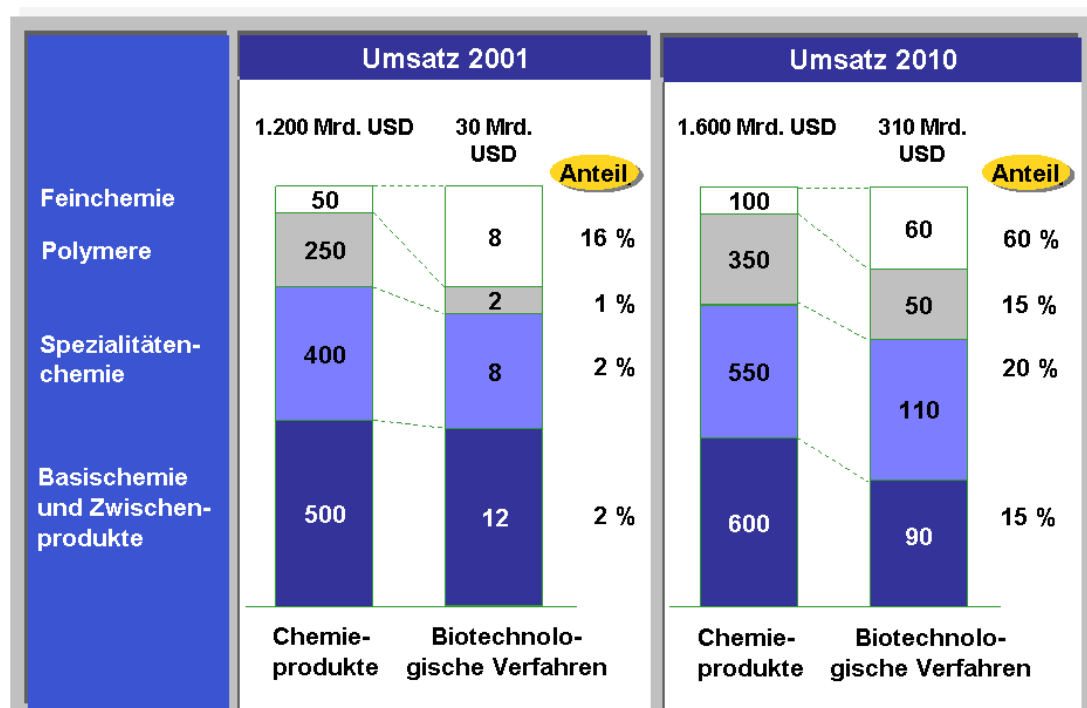


Abbildung 1-1: **Entwicklung des Anteils biotechnologischer Verfahren an dem Gesamtumsatz chemischer Produkte.** Die Unterteilung erfolgt nach Produktgruppen (Festel et al. 2004).

Die der Weißen Biotechnologie entstammenden Produkte sind den Gruppen der Feinchemikalien und den so genannten Bulkprodukten zuzuordnen. Unter Feinchemikalien sind Substanzen einzuordnen, die einen hohen Funktionalisierungsgrad besitzen und von denen weniger als 10.000 Tonnen pro Jahr weltweit benötigt werden. Bulkprodukte hingegen liegen oberhalb dieser jährlichen Produktionsrate. Der Marktanteil biotechnologisch hergestellter Feinchemikalien wird derzeit auf ca. 50 Mrd US-\$ geschätzt, wobei sich das Volumen innerhalb der nächsten 10 bis 20 Jahre auf ca. 250 Mrd US-\$ vergrößern soll (Bott et al. 2004).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von Epichlorhydrin. Dieses wird bislang mittels chemischer Verfahren, ausgehend von Propylen, hergestellt. Bei dieser Synthese wird das Nebenprodukt 1,2,3-Trichlorpropan (TCP) zu etwa 5-7 % gebildet (Abbildung 1-2) (Swanson 1999; Gray et al. 2003). Durch die biokatalytische Umsetzung des TCP zu Dichlorpropanol (DCH) über einen Biokatalysator könnte bei diesem Prozess eine signifikante Verbesserung der Wirtschaftlichkeit erreicht werden. Hierbei geht es nicht allein um die Rückführung dieses Nebenprodukts in den Hauptprozess, vielmehr kann das TCP alternativ dazu in das ökonomisch weit- aus interessantere chirale Produkt Epichlorhydrin umgewandelt werden (Dravis 2001; Gray et al. 2003). Diese chirale Verbindung kann bei der Synthese von Fein- chemikalien als Ausgangssubstanz eingesetzt werden. Neben dem wirtschaftlichen Aspekt bietet die Rückführung des 1,2,3-Trichlorpropan auch einen ökologischen Vorteil. Findet keine Rückführung des TCP statt, so fällt dieses als Abfallprodukt bei der chemischen Synthese an. Die Problematik von halogenierten Kohlenwasserstof- fen besteht darin, dass sie auf mikrobiellem Weg nur sehr schwer abgebaut werden können und somit meist lange Halbwertszeiten besitzen (Fetzner 1998). Halogenier- te Kohlenwasserstoffe sind zwar in der natürlichen Umgebung weit verbreitet, da sie im Zuge von biotischen oder abiotischen Prozessen, die in der Atmosphäre ablauf- en, gebildet werden (Swanson 1999). Zudem wurden im Laufe vieler Jahre zusätz- liche halogenierte Kohlenwasserstoffe aus Prozessen der chemischen Industrie in die Umwelt eingebracht (Pries et al. 1994). In diesem Zusammenhang sind vor al- lem Chemikalien für die Agrarwirtschaft (Masunaga et al. 2001), Flammschutzmittel (Hale et al. 2001), Lösungsmittel (Ukai et al. 1997) und Intermediate aus chemi- schen Synthesen zu nennen. Ein Beispiel hierfür ist das 1,2-Dichlorethan, das welt- weit im Tonnen-Maßstab für die Synthese von Vinylchlorid sowie als Lösungsmittel hergestellt wird (Schlottmann 2002) und teilweise in die Umwelt gelangt (Holloway et al. 1998). Aufgrund dieser Situation besteht ein wachsendes Interesse an deha- logenierenden Enzymen in der Biotechnologie. Im Vordergrund stehen im Wesentli- chen drei Enzymklassen, in die große Erwartungen gesetzt werden, nämlich die Hydrogen-Halid Lyasen (EC 4.5.1), die 2-Haloacid Dehalogenasen (EC 3.8.1.2.) und die Haloalkan Dehalogenasen (EC 3.8.1.5) (Swanson 1999). Trotzdem gibt es bislang nur wenige Bemühungen, diese Enzyme bis zur industriellen Anwendungs- reife zu entwickeln.

Zur Erzeugung des chiralen Epichlorhydrins kann auf chemischen Weg prinzipiell eine asymmetrische Epoxidierung des Propylens mittels chiraler Persäuren durch- geführt werden. Allerdings sind hierbei die erzielten Enantiomerenüberschüsse in der Regel < 20 % ee. Deutlich höhere Enantiomerenüberschüsse werden durch effi-

ziente chirale Katalysatoren bei der „Sharpless-“ und „Jacobsen-Epoxidierung“ erhalten (Katsuki and Sharpless 1980; Zhang and Jacobsen 1991). Diese klassischen Synthesen bedienen sich teurer Edelmetall- oder Schwermetallkatalysatoren und drastischer Reaktionsbedingungen, wobei Enantiomerenüberschüsse > 98 % möglich sind.

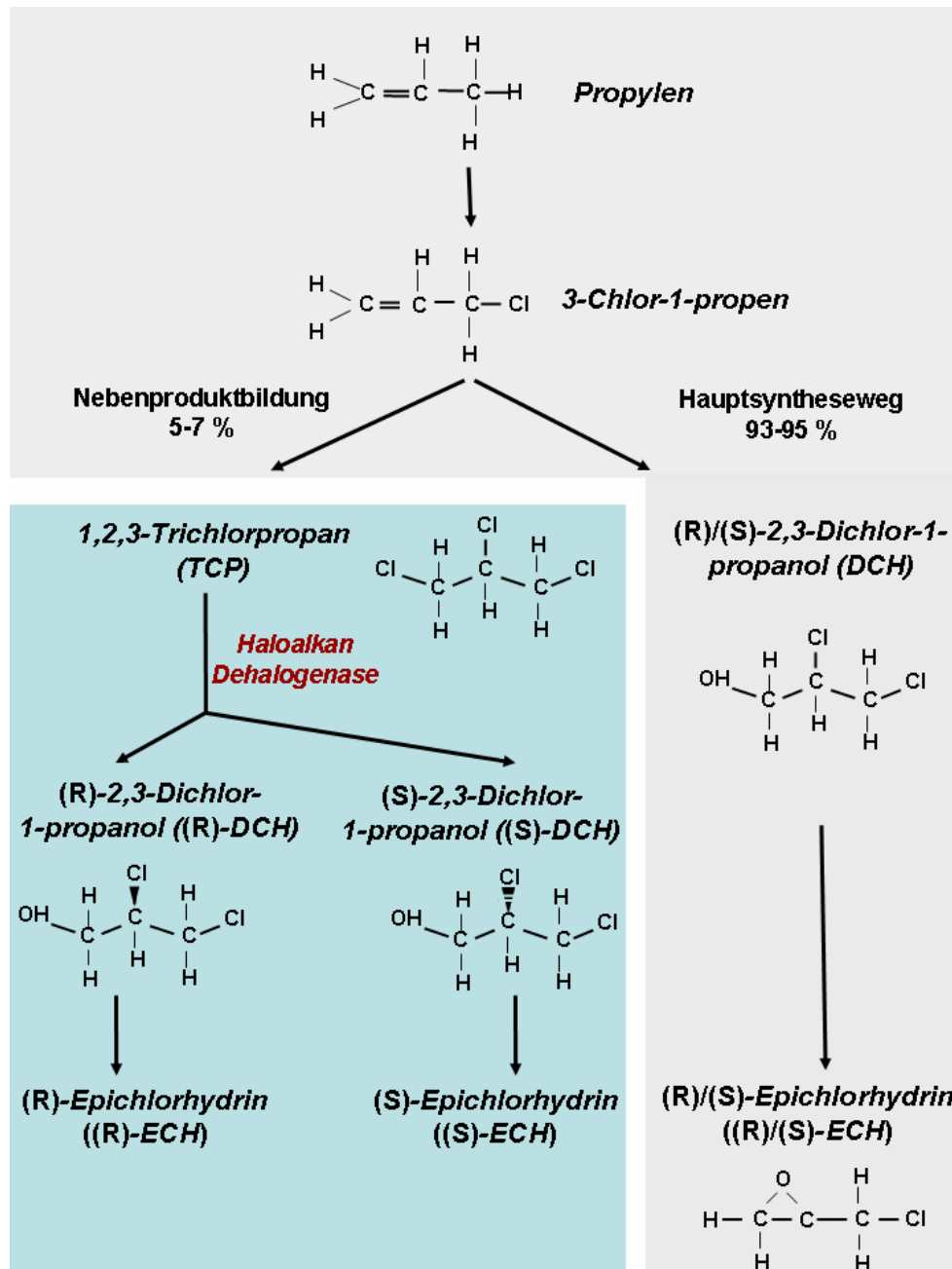


Abbildung 1-2: Syntheseweg von Epichlorhydrin ausgehend von Propylen. Das als Nebenprodukt entstehende TCP kann biokatalytisch über eine Haloalkan Dehalogenase zu (R) oder (S)-DCH umgewandelt werden. Anschließend erfolgt die Umsetzung zu (R) oder (S)-ECH auf chemischem Weg oder mittels Halohydrin Dehalogenasen (modifiziert nach (Gray et al. 2003)).

Gegenüber den chemischen Verfahren bedient sich die Weiße Biotechnologie der Biokatalysatoren, die entweder intakte Zellen oder isolierte Enzyme darstellen. Biokatalysatoren bieten den Vorteil, dass sie die Umsetzung von Substraten in die gewünschten Produkte chemo-, regio- und stereoselektiv katalysieren. Zudem arbeiten sie unter milden Reaktionsbedingungen, die oftmals eine kostengünstigere und umweltschonendere Produktion gegenüber den chemischen Verfahren ermöglichen.

Die biokatalytische Synthese des chiralen Epichlorhydrins erfolgt ausgehend vom 1,2,3-Trichlorpropan (TCP) in zwei Schritten: (1) Die hydrolytische Spaltung des TCP zu 2,3-Dichlor-1-halohydrin (DCH) über das Enzym Haloalkan Dehalogenase und (2) die anschließende Umsetzung des DCH zu Epichlorhydrin (ECH) über das Enzym Halohydrin Dehalogenase (Abbildung 1-2). Die Synthese eines chiralen Endprodukts erfordert, dass eines der beiden eingesetzten Enzyme eine sehr hohe Enantioselektivität aufweist. Das Hauptaugenmerk in dem Kooperationsprojekt, in das die vorliegende Arbeit eingebunden war, lag auf Seiten des ersten Enzyms, der Haloalkan Dehalogenase. Grund dafür ist, dass der zweite Schritt dieser Reaktion, die enzymatische Umsetzung über Halohydrin Dehalogenasen, auch auf chemischem Weg erfolgen kann, wobei die Chiralität des DCH im Endprodukt ECH erhalten bleibt.

### 1.1. Haloalkan Dehalogenase

Die Haloalkan Dehalogenasen (EC 3.8.1.5) werden in der Enzymnomenklatur allgemein den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen (EC 3) (Ollis et al. 1992) zugeordnet, die die Spaltung von Halogenkohlenwasserstoff-Verbindungen katalysieren. Die Familie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen ist eine der größten Enzymfamilien, die unter anderem die Acetylcholinesterasen, Lipasen, Thioesterasen, Epoxidhydrolasen einschließt (Holmquist 2000).  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen besitzen im Wesentlichen die selbe Grundstruktur, welche in Abbildung 1-3 dargestellt ist.

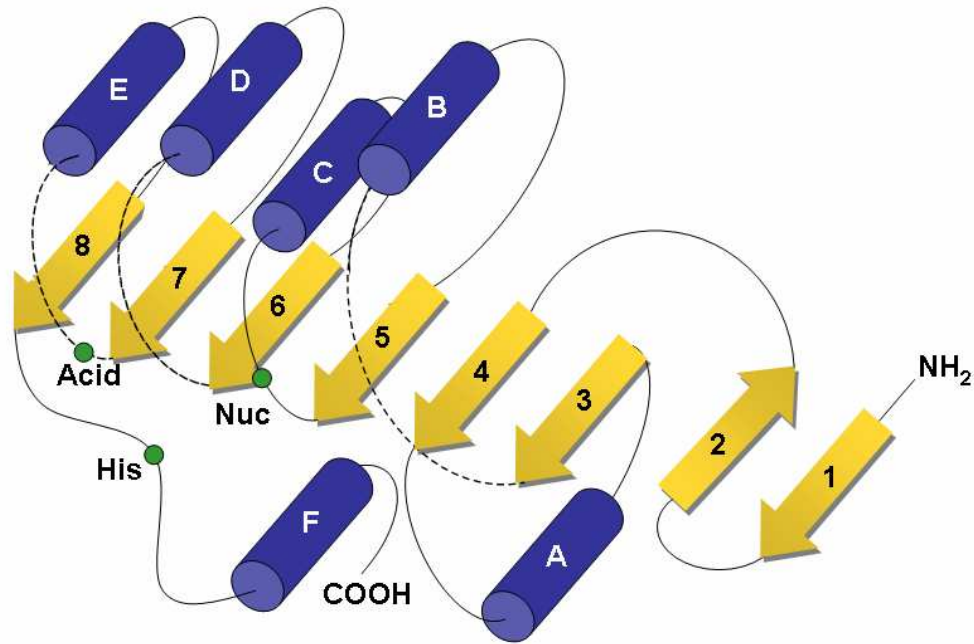


Abbildung 1-3: **Schematische Darstellung der Grundstruktur von  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen.**  $\alpha$ -Helices sind als blaue Zylinder (A-F),  $\beta$ -Faltblätter als gelbe Pfeile (1-8) dargestellt. Die gestrichelten Linien deuten variable Bereiche an. Der nukleophile „Elbow“ ist zwischen  $\beta$ -Faltblatt  $\beta_5$  und  $\alpha$ -Helix  $\alpha_C$  angedeutet. Die Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triade sind als grüne Punkte dargestellt (Ollis et al. 1992).

Eine der ersten Haloalkan Dehalogenasen (DhlA) wurde aus dem Mikroorganismus *Xanthobacter autotrophicus* isoliert (Janssen et al. 1985) und in den 90 er Jahren in der Grundwasseraufarbeitung zum Abbau von 1,2-Dichlorethan eingesetzt (Stucki and Thüer 1995). Haloalkan Dehalogenasen besitzen ein sehr breit gefächertes Substratspektrum, das verschiedene chlorierte und bromierte Kohlenwasserstoffe einschließt. Aufgrund ihres Substratspektrums und aufgrund von Sequenzhomologien werden die Haloalkan Dehalogenasen in zwei Gruppen eingeteilt. Hierbei werden Enzyme, die spezifisch kurzkettige halogenierte Alkane (C2-C4) umzusetzen vermögen von jenen unterschieden, die einfach-, doppelt- und mehrfach halogenierte C2-C9 Verbindungen spalten können (Nagata et al. 1997). Haloalkan Dehalogenasen bestehen aus einer Hauptdomäne, sowie einer so genannten Cap- Domäne. Die Hauptdomäne setzt sich aus acht  $\beta$ -Faltblättern zusammen, die von sechs  $\alpha$ -Helices umgeben sind. Die Cap- Domäne wird aus fünf  $\alpha$ -Helices gebildet, und ist zwischen  $\beta$ -Faltblatt  $\beta_6$  und  $\beta_7$  lokalisiert. Während der katalytische Kernbereich konserviert ist, unterscheiden sich die verschiedenen Haloalkan Dehalogenasen in

ihrer Sequenz und in der Struktur ihrer jeweiligen Cap- Domäne, die unter anderem für die Substratspezifität verantwortlich ist (Pries et al. 1994; Schanstra et al. 1996; Holloway et al. 1998). Kristallographische Röntgenstrukturanalysen von unterschiedlichen Haloalkan Dehalogenasen aus *Xanthobacter autotrophicus*, *Rhodococcus sp.* und *Sphingomonas paucimobilis* zeigen, dass die Enzym/Substrat Interaktion in dem hydrophoben Raum zwischen der Haupt- und der Cap- Domäne stattfindet (Verschueren et al. 1993; Newman et al. 1999; Marek et al. 2000). Die dreidimensionale Struktur der Haloalkan Dehalogenase aus *Rhodococcus sp.* ist in Abbildung 1-4 dargestellt.

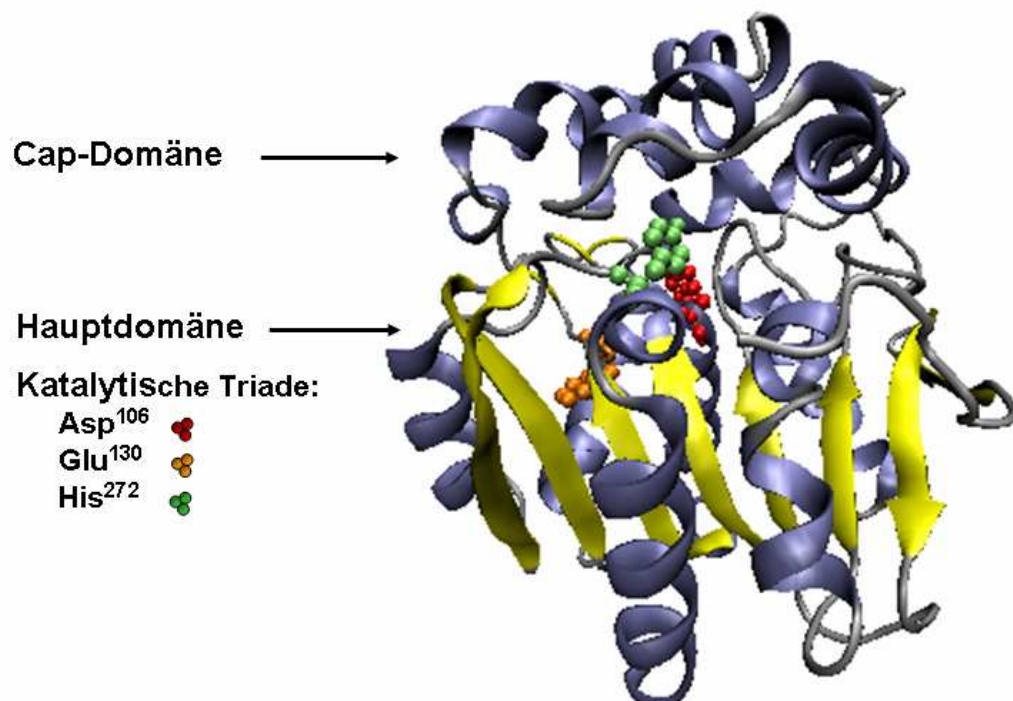


Abbildung 1-4: **Dreidimensionale Struktur der Haloalkan Dehalogenase aus *Rhodococcus sp.*** (PDB id: 1bn7; (Newman et al. 1999).

Haloalkan Dehalogenasen sind monomere Enzyme, die Co- Faktor unabhängig sind. Bei der Umsetzung von Substraten durch Haloalkan Dehalogenasen findet zunächst ein nukleophiler Angriff der katalytischen Aminosäure Aspartat auf die Kohlenstoff- Halogen- Bindung des Substrats mit einer anschließenden Spaltung der Halogenkohlenwasserstoff- Verbindung statt. Hierbei bildet sich ein Enzym- Alkyl- Zwischenprodukt, wobei das Halid über Aminosäuren im aktiven Zentrum stabilisiert wird. Als letzter Schritt erfolgt eine Hydrolyse des Alkyl-Enzym-Komplexes und die Freisetzung des gebildeten Alkohols sowie des Halids (Abbildung 1-5) (Pries et al. 1994; Janssen 2004).



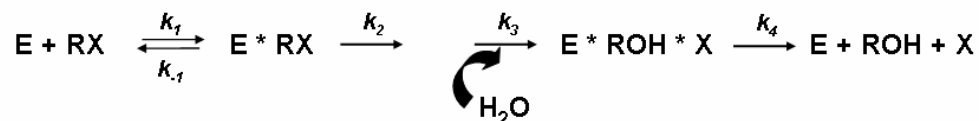


Abbildung 1-5: **Reaktionsschema von Haloalkan Dehalogenasen.** Das Enzym ist in diesem Schema mit E abgekürzt, die Chlorkohlenwasserstoffverbindung mit RX.  $k_1$  bis  $k_x$  sind die Reaktionskonstanten des Systems (Janssen 2004).

Von dem Kooperationspartner DOW Chemicals wurden drei unterschiedliche Haloalkan Dehalogenasen DhaA, DSD4 und DSD49 zur Verfügung gestellt. Die Haloalkan Dehalogenase DhaA stammt aus dem Organismus *Rhodococcus rhodochrous* und besitzt bezüglich des Produkts DCH einen ee-Wert von 40 %. Dieses Enzym wurde am Institut für Technische Biochemie mutagenisiert. Dabei tauschte man an den Positionen 176 und 273 die Aminosäuren Cystein und Tyrosin gegen Tyrosin bzw. Phenylalanin aus. Diese Mutationen für die Haloalkan Dehalogenase DhaA wurden erstmals von Bosma durchgeführt (Bosma 2002) und sollen zu einer 8-fachen Erhöhung der Enzymaktivität führen. Die Haloalkan Dehalogenase DhaA<sup>CYYF</sup> zeigte im Versuch lediglich eine 2-fache Erhöhung der Enzymaktivität. Zudem wurde durch die eingeführten Mutationen die Enantioselektivität des Wildtyp Enzyms bezüglich des Produkts DCH von 40 % auf 15 % herabgesetzt. Die anderen beiden Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 stammen aus einem Bodenscreening, das von der Firma Diversa (San Diego, USA) durchgeführt wurde (Parales et al. 2002; Gray et al. 2003). Da aus den Bodenproben lediglich DNA isoliert wurde, ist nicht bekannt, aus welchen Organismen die beiden letztgenannten Haloalkan Dehalogenasen stammen. Die Enantioselektivitätswerte (ee) für diese Enzyme sind mit 55 % für DSD4 und mit 70 % für DSD49 angegeben (Abbildung 1-6). Darüber hinaus unterscheiden sich diese drei Enzyme hinsichtlich ihrer Produktinhibierung. Die Haloalkan Dehalogenase DSD4 weist zum Beispiel mit einem  $k_i$ -Wert von >100 mM eine viel geringere Produktinhibierung auf als DhaA mit einem  $k_i$ -Wert von 1,5 mM (Transfer-Information von DOW Chemical). Dies ist unter prozesstechnischen Aspekten von Vorteil, da während der Umsetzung des Substrats in einem Festbettreaktor keine Produktabtrennung durchgeführt werden kann. Die kinetischen Daten der eingesetzten Enzyme sind in Abbildung 1-6 zusammengestellt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Expressionsoptimierung für diese Haloalkan Dehalogenasen durchzuführen, um sie anschließend daran in einem größeren Maßstab zu produzieren und nachfolgend aufzureinigen.

Ausgehend von der Haloalkan Dehalogenase DSD4 wurden am Institut für Technische Biochemie (ITB) der Universität Stuttgart weitere Mutanten generiert, die eine verbesserte Enantioselektivität bezüglich DCH aufweisen. Eine dieser Mutanten, bei der an Position 107 Histidin gegen Valin ausgetauscht wurde (DSD4<sup>H107V</sup>), soll ebenfalls hinsichtlich der Expression in *E. coli* optimiert werden.

Haloalkan Dehalogenasen (3.8.1.5)			
<b>Organismus</b>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	nicht bekannt	nicht bekannt
<b>Protein</b>	DhaA	DSD4	DSD49
<b>Gen</b>	<i>dhaA</i>	<i>dsd4</i>	<i>dsd49</i>
<b>ee-Wert (%) DCH</b>	40	55	70
<b>k<sub>i</sub> (mM)</b>	1,5 **	>100	13

	↓ Institut für Technische Biochemie	↓ Institut für Technische Biochemie
<b>Protein</b>	DhaA <sup>CYYF</sup>	DSD4 <sup>H107V</sup>
<b>Gen</b>	<i>dhaA</i> <sup>CYYF</sup>	<i>dsd4</i> <sup>H107V</sup>
<b>ee-Wert (%) DCH</b>	15 **	70 ***
<b>k<sub>i</sub> (mM)</b>	1,44 **	nb

Abbildung 1-6: **Kinetische Parameter der Haloalkan Dehalogenasen.** Übersicht über die zur Verfügung gestellten Haloalkan Dehalogenasen DhaA, DSD4 und DSD49 der Firma DOW Chemicals, einschließlich der Haloalkan Dehalogenase DhaA<sup>CYYF</sup> und DSD4<sup>H107V</sup> aus dem Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart. Die kinetischen Daten stammen von DOW Chemicals, \*\* dem Institut für Bioverfahrenstechnik bzw. \*\*\* aus dem Institut für Technische Biochemie; nb nicht bestimmt.

## 1.2. Heterologe Genexpression - „Inclusion bodies“

Die Methoden der rekombinanten DNA-Technologie und des Gentransfers ermöglichen die heterologe Genexpression in Wirtsorganismen, die mit der Produktion von Insulin in *Escherichia coli* 1982 erstmals kommerziell realisiert wurde (Chan et al. 1981). In Abhängigkeit von dem zu produzierenden Protein sind derzeit neben *E. coli* vor allem Säugerzellsysteme Produktionsstandard. Beispielsweise ermöglichen erst CHO-Zellen (chinese hamster ovarian) die Produktion von therapeutischen Proteinen und rekombinanten monoklonalen Antikörpern, deren Aktivität von einer korrekten posttranslationalen Modifikation abhängt (Wurm 2004). Andere Expressi-

onssysteme nutzen Gram-positive Bakterien, Hefen, Insektenzellen oder transgene Pflanzen als Wirtsorganismen.

Das Enterobakterium *E. coli* ist aufgrund seiner sehr gut untersuchten Genetik, seiner kurzen Generationszeiten und der einfachen Handhabung für die Expression von rekombinanten Proteinen der am häufigsten eingesetzte Wirtsorganismus. Zwar können in *E. coli* sehr hohe intrazelluläre Konzentrationen des rekombinanten Proteins erreicht werden, allerdings ist dieses oftmals nicht aktiv. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Proteine keine posttranslationalen Modifikationen erhalten, zum anderen lagert sich Fremdprotein mit größeren hydrophoben Regionen oder komplexen Disulfidbrücken in so genannten „Inclusion bodies“ im Zytoplasma von *E. coli* ab. Diese Einschlusskörper setzen sich vornehmlich aus vollständig synthetisierten rekombinanten Proteinmolekülen zusammen. Sie besitzen einen Durchmesser von 0,2 bis 1,5 µm, wobei in der Regel lediglich ein Einschlusskörper pro Bakterienzelle vorhanden ist (Bowden et al. 1991). Die Bildung von „Inclusion bodies“ macht eine vollständige Denaturierung und Rückfaltung des Proteins *in vitro* nötig, worunter die Ausbeute an funktionellem Enzym leidet und die Kosten für die Produktion drastisch erhöht werden (Ho and Middelberg 2004).

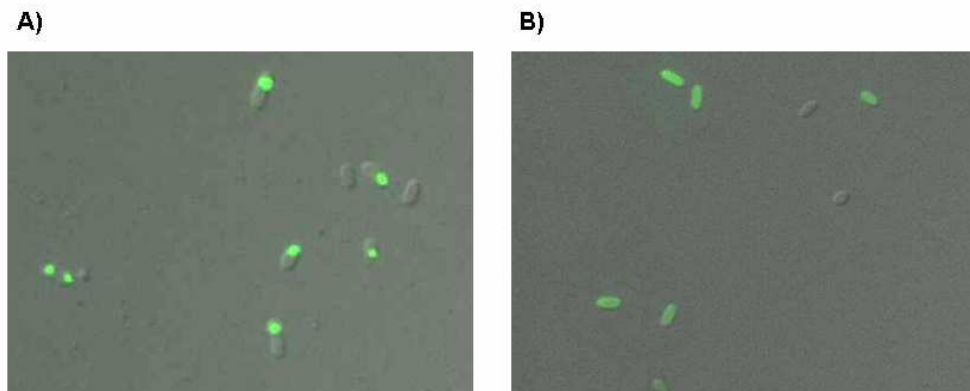


Abbildung 1-7: **Heterologe Expression von GFP-DSD4 in *E. coli* BW3110 bei A) 30 °C und B) 22 °C in LB-Medium.** Das Fusionsprotein liegt überwiegend als Einschlusskörper vor. Im Zytosol der einzelnen Zellen ist lediglich ein „Inclusion body“ zu sehen, wobei bei 22 °C der lösliche Anteil des rekombinanten Proteins im Zytoplasma deutlich zunimmt.

Eine Alternative zu den prokaryotischen Wirtsorganismen stellen Hefen dar. Sie vereinen kurze Generationszeiten, geringe Medienansprüche und die posttranslationalen Modifikationen des eukaryotischen Faltungs- und Sekretionsapparats. Industriell relevante Hefen sind z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* und *Pichia pastoris*.

*pastoris* (Cereghino and Cregg 2000). Mit kommerziellen Vektorsystemen, wie z.B. das pPIC Z System von Invitrogen ist sowohl eine intrazelluläre als auch eine extrazelluläre Proteinexpression möglich.

Bei der heterologen Genexpression sind in Abhängigkeit von dem rekombinanten Protein eine Reihe von Faktoren zu berücksichtigen, wenn dieses in aktiver Form exprimiert werden soll. Beispielsweise werden, wie oben beschrieben, für die Expression von eukaryotischen Proteinen hinsichtlich der posttranslationalen Modifikationen meist Säugerzellsysteme oder Hefen herangezogen. Für Proteine mit Disulfidbrücken gibt es bereits kommerziell erhältliche *E. coli* Stämme, welche innerhalb der Thioredoxinreduktase (*trxB*) und der Glutathionreduktase (*gor*) mutiert sind, was eine Bildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma erlaubt (Ohnuma et al. 2002). Werden all diese Faktoren berücksichtigt, so stellt man in vielen Fällen dennoch fest, dass in dem Wirtsorganismus inaktives Protein in Form von Inclusions bodies gebildet wird.

Tabelle 1-1: **Ansatzmöglichkeiten für die Optimierung der heterologen Genexpression auf experimenteller Ebene.**

<b>Ansatz</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Literatur</b>
Wirtsorganismus	Die Wahl des Wirtsorganismus beeinflusst die Expression und Modifikation des rekombinanten Proteins.	(Jana and Deb 2005)
Plasmidkopienzahl	Die Gendosis hat einen Einfluss auf die Proteinexpression, die über die Anzahl der Plasmide innerhalb des Organismus gesteuert werden kann.	(Jones et al. 1987)
Promoter	Die Promotorstärke sowie die Regulierbarkeit des Promotors haben einen Einfluss auf die Proteinexpression.	(Goldstein and Doi 1995)
Transkriptionstermination	Die Effektivität der Transkriptionstermination geht in die Proteinexpression mit ein.	(Etchegaray and Inouye 1999)
Temperatur	Die Wachstumstemperatur hat einen großen Einfluss auf die Proteinstabilität sowie auf die Proteinfaltung.	(Kube et al. 2006)
Wachstumsbedingungen/ Medium	Zusätze innerhalb des Kultivierungsmediums können Einfluss auf die Proteinfaltung und Ausbeute an rekombinatem Protein nehmen.	(Corisdeo and Wang 2004)

Es sind in der Literatur eine Vielzahl von Korrelationen und Methoden beschrieben, um den löslichen Anteil des rekombinant hergestellten Proteins im Zytoplasma zu erhöhen (Hannig and Makrides 1998; Jana and Deb 2005). In Tabelle 1-1 sind experimentelle Ansätze für die Optimierung der heterologen Proteinexpression zusammenfassend dargestellt. Oftmals wird auch durch das Einstellen, der in der Tabelle genannten Faktoren, kein optimales Expressionsergebnis, bezogen auf die Menge und Löslichkeit des rekombinanten Proteins, erreicht. Die Missfaltung des Proteins wird in diesen Fällen häufig durch die Aminosäure- oder Nukleinsäuresequenz beeinflusst. Einige der in der Literatur beschriebenen Einflüsse der Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz auf die Proteinfaltung sind in Tabelle 1-2 festgehalten.

Tabelle 1-2: **Literaturquellen über die Einflüsse der Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz auf die Proteinfaltung in *E. coli*.**

<b>Ansatz</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Literatur</b>
<b>Einfluss der Aminosäuresequenz</b>		
Sekundärstruktur	In der Aminosäuresequenz liegt zu einem Großteil die Information für die Struktur des Proteins.	(Tanford et al. 1973; Jaenicke 1993)
Disulfidbrücken	Die Ausbildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma von <i>E. coli</i> ist nicht möglich.	(Anfinsen 1973; Derman et al. 1993)
<b>Einfluss der Nukleinsäuresequenz</b>		
„codon usage“	Die Optimierung der „codon usage“ erhöht oftmals die Ausbeute an rekombinantem Protein.	(Yadava and Ockenhouse 2003; Ito and Wagner 2004)
mRNA Stabilität	Die mRNA ist ausschlaggebend für die Proteinausbeute während der Expression.	(Hall et al. 1982; Nierlich and Murakawa 1996)
m-RNA Sekundärstruktur	mRNA Sekundärstruktur bedingte Translationspausen nehmen Einfluss auf die Proteinfaltung.	(Guisez et al. 1993)
Räumliche Anordnung seltener Codons	Vorkommen seltener Codons in bestimmten Proteinstrukturen.	(Krasheninnikov et al. 1989; Xie and Ding 1998; Gu et al. 2004)
Translationsraten/synonyme Codons	Einfluss von synonymen Codons auf die Proteinfaltung.	(Purvis et al. 1987; Komar et al. 1999; Cortazzo et al. 2002)

Auf Seiten der Aminosäuresequenz spielen, sowohl einzelne Aminosäuren, als auch ganze Domänen des Proteins eine wichtige Rolle. Beispielsweise fanden Wilkinson

und Harrison (Wilkinson and Harrison 1991; Davis et al. 1999) heraus, dass die Tendenz zur Bildung von „Inclusion bodies“ bei (1) Proteinen mit einem hohen Anteil an Cystein und Prolin bzw. bei (2) stark hydrophoben Proteinen ansteigt. Hierfür wurde eine mathematische Gleichung vorgeschlagen, mit der die Löslichkeitswahrscheinlichkeit des rekombinanten Proteins in *E. coli* berechnet werden kann. Auf Seiten der Nukleinsäuresequenz ist oftmals die „codon usage“ des Wirtsstamms bzw. des heterologen Gens entscheidend. Hierbei wurde von Sharp (Sharp and Li 1987) der so genannte „codon adaption index“ (CAI) eingeführt. Der CAI beschreibt, inwieweit ein Gen der „codon usage“ eines bestimmten Organismus angepasst ist. Auf Grundlage dieses Wertes können Vorhersagen über das Expressionsniveau des Gens getroffen werden. Des Weiteren wurden Einflüsse der mRNA Sekundärstruktur (Guisez et al. 1993), der Translationsrate (Purvis et al. 1987; Komar et al. 1999; Cortazzo et al. 2002), sowie der räumlichen Anordnung von seltenen Codons (Krasheninnikov et al. 1989; Xie and Ding 1998; Gu et al. 2004) auf die Proteinfaltung in der Literatur beschrieben. Aus dieser Vielzahl von experimentellen und modellgestützten Ansätzen wird versucht, ein für die Haloalkan Dehalogenase geeignetes Expressionssystem ausfindig zu machen.

Ist die Synthese des rekombinanten Proteins in löslicher Form nicht möglich, so kann in der gezielten Herstellung des rekombinanten Proteins in Form von Einschlusskörpern eine Alternative gesehen werden (Fahnert et al. 2004). Dies hat zunächst den Vorteil, dass sich die Abtrennung des Proteins in Form von „Inclusion bodies“ von Fremdproteinen einfacher gestaltet. Der anschließende Schritt, der die De- und Renaturierung des Proteins einschließt, ist allerdings im Allgemeinen sehr kostenintensiv und lässt sich für industrielle Enzyme aus Kostengründen nicht realisieren (Vallejo and Rinas 2004).

### **1.3. Proteinaufreinigung**

Bei der Herstellung von biotechnologischen Produkten oder Biokatalysatoren spielt nicht nur der eigentliche Produktionsprozess sondern auch die Gewinnung und Aufarbeitung des Produkts eine wichtige Rolle. Das so genannte „Downstream-Processing“ ist ein sehr kostenintensiver Schritt, der bis zu 50- 80 % der eigentlichen Produktkosten ausmachen kann (Spalding 1991). Die Aufarbeitung intrazellulärer Proteine ist besonders aufwendig und mit vielen Problemen behaftet, da vorhandene Feststoffe und Zellfragmente die Aufreinigung erschweren (Hirschbein and Whitesides 1982). Die Folge davon sind viele sequentielle Prozessschritte, die für die Proteinaufarbeitung notwendig werden. In der Regel setzt sich dieser mehrstufi-

ge Aufreinigungsprozess aus aufeinander folgenden Proteinfällungs-, Chromatographie-, Ultrafiltrations-, und Elektrophoreseschritten zusammen (Safarik and Safarikova 2004), was wiederum zu hohen Investitions-, Betriebs- und Produktkosten führt. Allgemein kann das „Downstream-Processing“ von Proteinen in drei Phasen untergliedert werden. Diese sind in Abbildung 1-8 wiedergegeben.

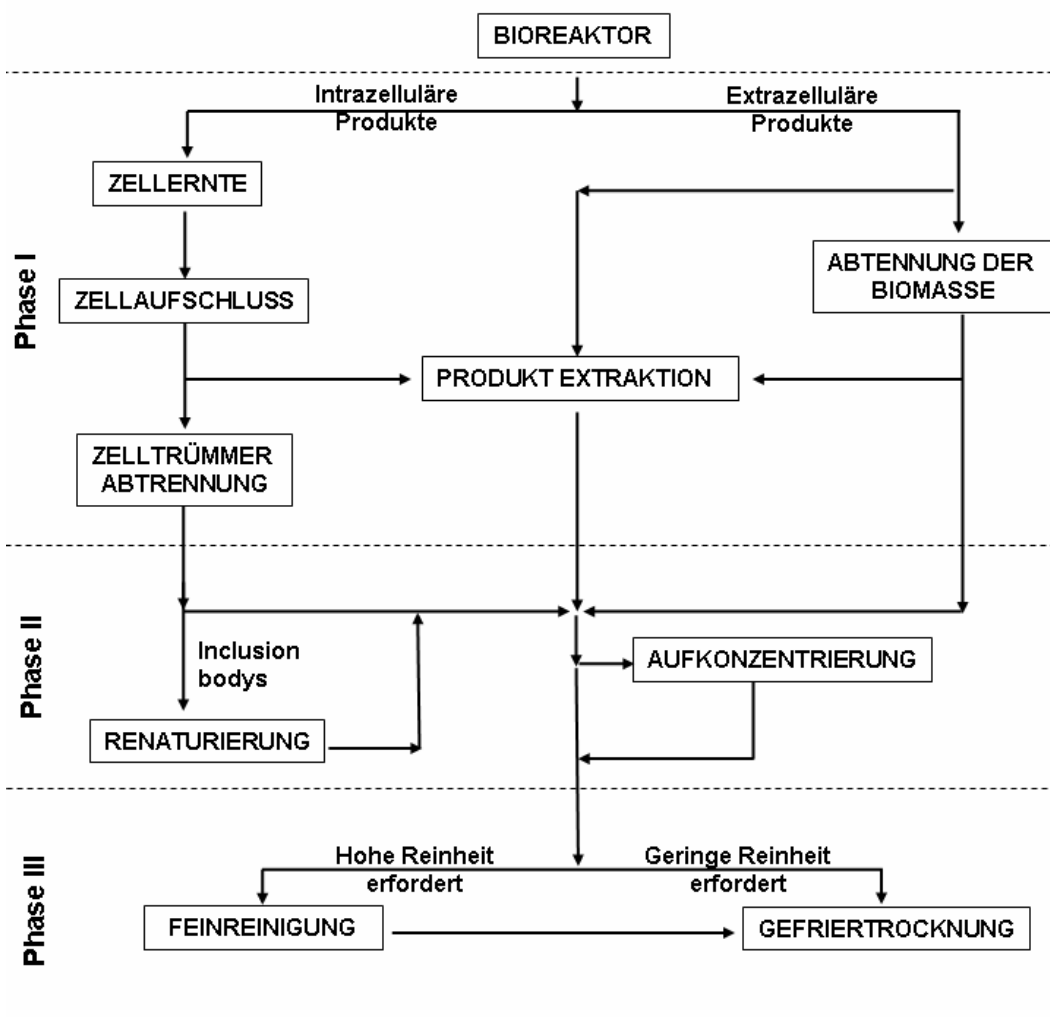


Abbildung 1-8: Allgemeines Schema für das „Downstream-Processing“ von intra- und extrazellulären Proteinen (nach (Petrides 2003)).

Detaillierter betrachtet stehen eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, um in diesen drei Phasen intra- oder extrazelluläre Proteine aufzuarbeiten. Dabei ist zu beachten, dass jeder zusätzliche Aufarbeitungsschritt die Aufreinigungszeit verlängert, die Ausbeute senkt und damit einen kostentreibenden Faktor für das Endprodukt darstellt. Daher muss abhängig von der Art des Produkts eine Aufreinigungsstrategie entwickelt werden, die einen Mittelweg zwischen Produktqualität und Aufarbeitungskosten bildet.

Bei Produkten mit einer hohen Wertschöpfung, wie sie zum Beispiel in der pharmazeutischen Industrie zu finden sind, liegt der prozentuale Anteil der Aufreinigungskosten bei rund 70 % bis 80 % des Endproduktpreises. Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Enzym zur Umsetzung von 1,2,3-Trichlorpropan stellt ein technisches Enzym dar. Deshalb liegt die Priorität nicht auf Seiten der Produktreinheit, sondern vielmehr bei einer Kostenreduktion für den Downstream-Prozess. Eine Kostenreduktion kann durch die Einsparung einzelner Aufreinigungsschritte erfolgen. Der Prozess für die Produktion und Aufreinigung der Haloalkan Dehalogenase ist so auszulegen, dass mit einem möglichst geringen Kostenaufwand das Enzym für die weiterführenden Arbeiten im halbtechnischen Maßstab präpariert werden kann, und gleichzeitig eine möglichst hohe Produktreinheit erreicht wird. Dies erfolgt in der vorliegenden Arbeit durch eine Reduktion der Aufarbeitungsschritte über die Einführung der Magnettrenntechnik innerhalb des „Downstream-Processing“. Dieses Verfahren ermöglicht es, Aufreinigungsschritte aller drei Phasen bereits in der ersten Aufreinigungsstufe zu vereinen. Arbeitsschritte wie die Zelltrümmerabtrennung nach erfolgtem Zellaufschluss, die Grobreinigung des Enzyms sowie die Aufkonzentrierung des Rohextrakts entfallen dadurch.

Die auf Magnetpartikeln basierende „High Gradient Magnetic Fishing“ (HGMF) Technik kommt bislang fast nur im Labormaßstab zum Einsatz. Hierbei spielen vor allem Aufreinigungs-Kits für analytische Zwecke (Chapman 2005), Kits zur Isolierung von DNA oder Anwendungen im Rahmen der mikrobiellen Qualitätskontrollen von Lebensmitteln (Boschke et al. 2005), eine große Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wird das sogenannte ‚High Gradient Magnetic Fishing‘ (HGMF) Verfahren eingesetzt (Hubbuch et al. 2001). Mit dem Terminus HGMF werden Aufreinigungsprozesse bezeichnet, in denen Hochgradienten Magnet Separatoren im Durchfluss- Verfahren zur Aufreinigung von Proteinen eingesetzt werden. Grundlage für dieses HGMF- Verfahren ist die Immobilisierung von Affinitätsliganden an magnetische Partikel. Über die Kopplung der Liganden an die Magnetpartikel kann eine selektive Sorption von Biomolekülen aus feststoffhaltigen Biosuspensionen erzielt werden. Die magnetischen Partikel haben den Vorteil, dass sie auf sehr einfache Weise innerhalb eines magnetischen Felds abgetrennt werden können. Nach der Entfernung von Fremdproteinen und Zelltrümmern kann das Zielprotein in reiner Form von den Partikeln eluiert werden. Auf Seiten der Biotechnologie gibt es kaum Versuche, dieses Verfahren in den industriellen Maßstab umzusetzen, obgleich die Magnetseparation in der Mineralaufarbeitung im Tonnen-Maßstab angewendet wird. Die erst kürzlich veröffentlichte Aufreinigung von Antikörpern über Protein A, das an Magnetpartikel gekoppelt ist, stellt den bislang bedeutendsten An-



satz zur Aufreinigung von Proteinen über die Magnettrenntechnik dar (Holschuh 2005).

Die Grundlagen für die Maßstabsvergrößerung des Magnetseparationsverfahrens wurden in der Dissertation von Hoffmann (Hoffmann 2002) am Forschungszentrum Karlsruhe erarbeitet. In dieser Arbeit wurde eine Beschreibung des Separationsvorgangs mit Hilfe eines umfassenden mathematischen Modells durchgeführt, die Möglichkeiten zur Herstellung von geeigneten Magnetpartikeln untersucht, die Sorptionseigenschaften der Partikel charakterisiert sowie die Leistungsfähigkeit des Gesamtverfahrens bestimmt.

Einer der Kernpunkte bei der Maßstabsvergrößerung der Magnetseparation ist die Herstellung geeigneter magnetischer Mikrosorbentien in einem größeren Maßstab. Diese müssen vielfältigen Anforderungen genügen. So sollen die Partikel z.B. eine hohe Sättigungsmagnetisierung ohne Remanenz, eine hohe Selektivität und Bindekapazität bezüglich des Zielproteins sowie eine geringe Foulinganfälligkeit besitzen. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Partikel wurden im Rahmen eines durch die DBU geförderten Verbundprojekt\* von der Firma Chemagen Biopolymer-Technologie AG (Baesweiler, Deutschland) im Gramm- Maßstab zur Verfügung gestellt. Diese Partikel besaßen bezüglich der genannten Eigenschaften eine zufriedenstellende Qualität. Details über die eingesetzten Partikel sind im Abschnitt 2.5 dieser Arbeit zu finden.

Eine Maßstabsvergrößerung der Magnettrenntechnik wurde in der Promotion von Ebner (Ebner 2006) erarbeitet. Hierbei ist ein „Scale-up“ vom 2 mg- Maßstab bis hin zu einer automatisierten Anlage mit einer Partikelkapazität von 100 g für das Modellprotein GFP durchgeführt worden. Parallel zu diesen Maßstabsvergrößerungen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Magnettrenntechnik für die Aufreinigung eines industriell relevanten Enzyms, der Haloalkan Dehalogenase, genutzt. Hierbei lassen sich Möglichkeiten und Grenzen des auf der Magnettrenntechnik basierenden Affinitätsverfahrens in der automatisierten Anlage aufzeigen.

#### **1.4. Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist die Bereitstellung einer Haloalkan Dehalogenase für einen biokatalytischen Prozess, in dem die Umsetzung von 1,2,3-Trichlorpropan zu dem (R)

---

\* DBU Förderschwerpunkt Biotechnologie: „Einsatz von Magnettrenntechnologie bei der Biokatalyse und Produktaufbereitung zur industriellen Etablierung effizienter und nachhaltiger Bioprozesse“ von 08/2002 bis 10/2004

oder (S)-Enantiomer des 2,3-Dichlor-1-propanol realisiert werden soll. Die von DOW-Chemicals bzw. vom Institut für Technische Biochemie bereitgestellten Haloalkan Dehalogenasen werden hierfür einer Expressionsoptimierung unterzogen. Die Optimierung der heterologen Proteinexpression wird für die Haloalkan Dehalogenasen an Hand von unterschiedlichen experimentellen Ansätzen durchgeführt. Über modellgestützte Methoden wird versucht, Ursachen für die eingeschränkte Proteinfaltung einzelner Haloalkan Dehalogenasen herauszuarbeiten. Parallel zu diesen Studien wird die Etablierung eines Produktions- und Aufreinigungsverfahrens am Beispiel der Haloalkan Dehalogenase DhaA durchgeführt. Innerhalb des Herstellungsprozesses werden die Enzyme zunächst intrazellulär in *E. coli* über eine Hochzell-dichte-Fermentation produziert, um anschließend in einer sequenziellen Verfahrensweise aufgearbeitet zu werden. Der Downstream-Prozess wird in einem direkten Verfahren mittels der Magnettrenntechnik durchgeführt, welches eine Aufarbeitung des rekombinanten Proteins aus dem Zellrohextrakt ermöglicht. Eine Konditionierung des Enzyms am Ende des Prozesses ist für die Immobilisierung und den Einsatz des Proteins in einer „Miniplant“ notwendig. Der Aspekt der Immobilisierung sowie der Einsatz der Haloalkan Dehalogenasen in einer „Miniplant“ wird in der Dissertation von Samorski (Samorski 2006) bearbeitet. Eine detaillierte Darstellung der einzelnen Aspekte und deren Verknüpfung innerhalb des Gesamtvorhabens ist in Abbildung 1-9 wiedergegeben. Im Rahmen der Aufarbeitung ist über die Magnettrenntechnik ein zweites Projekt integriert, das von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) finanziert wurde.

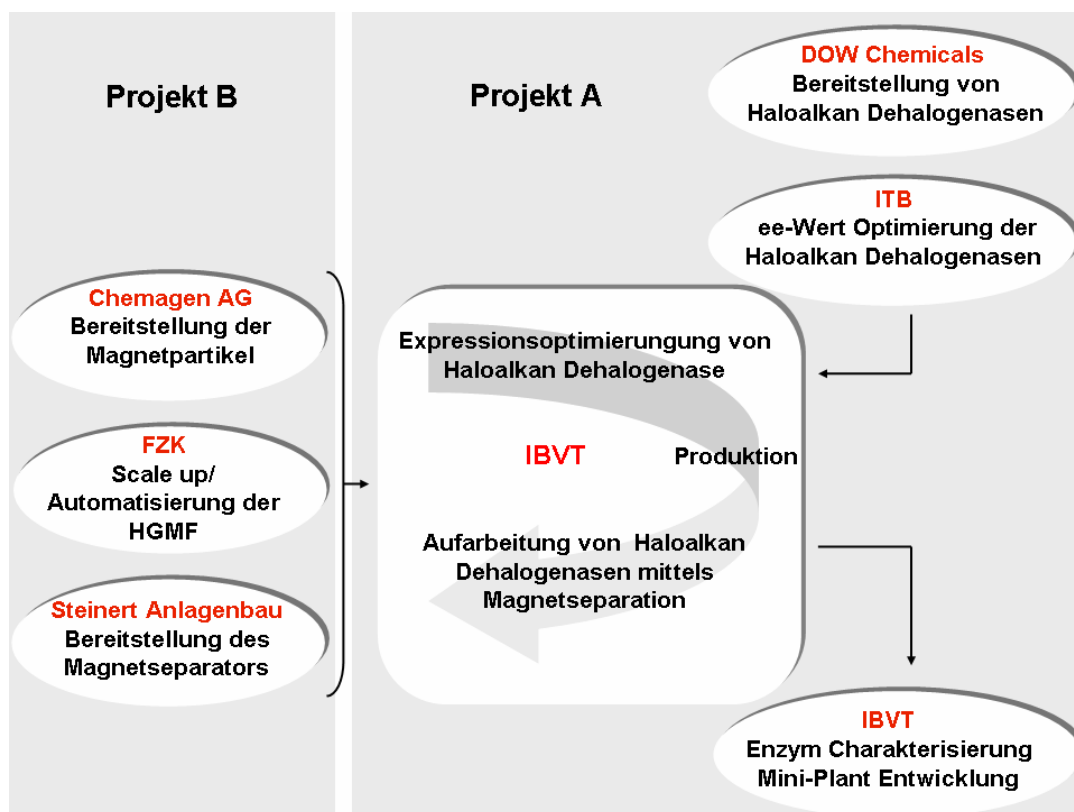


Abbildung 1-9: **Einbettung der vorliegenden Arbeit innerhalb des (A) Industrie und (B) DBU-Projekts.** Projektpartner sind (A) DOW Chemicals (San Diego, USA), Institut für Technische Biochemie (ITB) und Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT) der Universität Stuttgart; (B) Steinert Anlagenbau (Köln), Chemagen Biopolymer Technologie AG (Baesweiler), Institut für Technische Chemie, Bereich Wasser und Geotechnologie (Forschungszentrum Karlsruhe, FZK) und Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT) der Universität Stuttgart.

In dem folgenden Kapitel 2 sind die verwendeten Materialien zusammengestellt. In den einzelnen Unterkapiteln wird näher auf die verwendeten Mikroorganismen und Vektoren eingegangen. Ferner werden die für deren Anzucht eingesetzten Nährmedien beschrieben. Ebenfalls sind in diesem Kapitel die verwendete Chemikalien und Restriktionsenzyme, wie auch Puffer und Lösungen aufgelistet. In Abschnitt 2.5 wird näher auf die für die Proteinaufreinigung genutzten Magnetpartikel eingegangen.

Das dritte Kapitel beschreibt alle Methoden, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden. Hierbei werden in den Abschnitten 3.1, 3.2 und 3.3 mikrobiologische, proteinbiochemische und molekularbiologische Methoden getrennt voneinander aufgeführt. Der Abschluss dieses Kapitels bildet Abschnitt 3.4, in dem die in der Arbeit verwendeten Software Programme wieder zu finden sind.

Das vierte Kapitel geht auf Problemstellungen der *in vivo* Proteinfaltung und auf die Expressionsoptimierung von Haloalkan Dehalogenasen ein. Abschnitt 4.1 beschreibt zunächst die Ausgangssituationen für die Expression von DhaA sowie von DSD4 und DSD49. Anschließend werden in diesem Kapitel die in Abschnitt 4.2 beschriebenen experimentellen Ansätze von denen, in Abschnitt 4.3 aufgezeigten modellgestützten Methoden unterschieden. Abschließend findet sich in dem Unterkapitel 4.4 eine zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse vorangegangener Abschnitte.

In Kapitel 5 geht es um die Produktion und Aufreinigung des Biokatalysators, um diesen in einem Festbettreaktor für die Umsetzung von 1,2,3-Trichlorpropan einsetzen zu können. In Abschnitt 5.1 werden zunächst Grundlagen für den Herstellungsprozess beschrieben. Der nachfolgende Abschnitt 5.2 beschäftigt sich mit der Produktion der Haloalkan Dehalogenase mittels einer Hochzelldichte-Fermentation. Anschließend werden in Abschnitt 5.3 die einzelnen Schritte der Proteinaufreinigung wie Zellaufschluss, Affinitätsaufreinigung sowie Konditionierung des Enzyms diskutiert. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse des gesamten Downstream-Prozesses ist in Unterkapitel 5.4 wieder zu finden.

Das sechste Kapitel dient einer Zusammenfassung aller Ergebnisse, die sich aus der vorliegenden Arbeit ergeben. Zudem wird auf Möglichkeiten eingegangen diese Arbeit fortzuführen.

Abschließend sind in dieser Arbeit in Kapitel 7 Anhänge wie z.B. Sequenzierungsergebnisse oder Plasmidkarten abgelegt, und im achten Kapitel findet sich das vollständige Literaturverzeichnis dieser Arbeit wieder.

## 2. Material

In dem folgenden Kapitel wird auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien eingegangen. In Abschnitt 2.1 sind die eingesetzten Mikroorganismen zusammengestellt sowie die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide und Primer beschrieben. Der nachfolgende Abschnitt 2.2 behandelt die Nährmedien, die für die Kultivierung der Mikroorganismen in Schüttelkolben und bei Fermentationen notwendig sind. In den Abschnitten 2.3 und 2.4 sind sowohl verwendete Chemikalien und Enzyme als auch die eingesetzten Puffer und Lösungen zusammengestellt. Der letzte Abschnitt gibt einen Überblick über die in der Proteinaufreinigung eingesetzten Magnetpartikel.

### 2.1. Mikroorganismen und Vektoren

Im Folgenden sind die in der Arbeit verwendeten Wirtsstämme sowie die eingesetzten Plasmide näher beschrieben.

#### 2.1.1. Eingesetzte Bakterienstämme

##### *Escherichia coli*

Die *E. coli* Stämme JM109 und S17 werden für molekularbiologische Arbeiten herangezogen, *E. coli* BW3110 und BL21 dienen als Produktionsstämme bei Schüttelkolbenversuchen und Fermentationen.

- *E. coli* JM109: *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB)* (Yanisch-Perron et al. 1985).
- *E. coli* S17: RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7) chromosomal integriert; *Tra<sup>+</sup> recA pro thi hsdR* (Simon et al. 1983).
- *E. coli* BW3110: W3110 Derivat; *rhaB* negativ (Wilms et al. 2001).
- *E. coli* BL21(*rha*<sup>-</sup>): BL21 Derivat (Novagen) *lon omp1 rhaB* negativ.

##### *Pseudomonas putida*

- *P. putida* KT2440: *r<sup>-</sup>* Derivat von *P. putida* mt-2 (Bagdasarian et al. 1981).

### 2.1.2. Plasmide

Die in den Tabellen 2-1 und 2-2 aufgelisteten Plasmide wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert.

Tabelle 2-1: **Plasmide für die Expression in *E. coli*.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Primer</b>
pJOE4036 DhaA	Amp	DhaA mit His <sub>6</sub> am C-Terminus	DhaA N1/C4
pJOE4036 DhaA-GFP	Amp	Fusionsprotein mit His <sub>6</sub> am C-Terminus	DhaA N1/C2 GFP N2/C1
pJOE4056 GFP-DhaA	Amp	Fusionsprotein mit His <sub>6</sub> am N-Terminus	GFP N2/ C3 DhaA N3/C4
pJOE4056 DSD49	Amp	DSD49 mit His <sub>6</sub> am N-Terminus	DSD49 N3/C1
pJOE4036 MBP-DSD49	Amp	Fusionsprotein ohne His <sub>6</sub>	DSD49 N3/C1
pJOE4056 GFP-DSD49	Amp	Fusionsprotein mit His <sub>6</sub> am N-Terminus	GFP N2/C3 DSD49 N2/C1
pJOE4036 DSD4	Amp	DSD4 mit His <sub>6</sub> am C-Terminus	DSD4 N4/C2
pJOE4036 MBP-DSD4	Amp	Fusionsprotein mit His <sub>6</sub> am C-Terminus	MBP N1/C2 DSD4 N5/C2
pJOE4056 GFP-DSD4	Amp	Fusionsprotein mit His <sub>6</sub> am N-Terminus	GFP N2/C2 DSD4 N5/C1
pJOE4036 DSD4 <sup>H107V</sup>	Amp	DSD4 <sup>H107V</sup> mit His <sub>6</sub> am C-Terminus	DSD4 N4/C2
pJOE4036 MBP-DSD4 <sup>H107V</sup>	Amp	Fusionsprotein mit His <sub>6</sub> am C-Terminus	MBP N1/C2 DSD4 N5/C2
pJOE4056 GFP-DSD4 <sup>H107V</sup>	Amp	Fusionsprotein mit His <sub>6</sub> am N-Terminus	GFP N2/C2 DSD4 N5/C1

Tabelle 2-2: **Plasmide für die Expression in *P. putida* und *E. coli*.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Primer</b>
pJOE4782 DSD4 <sup>H107V</sup>	Kan/Nal	DSD4 <sup>H107V</sup> mit His <sub>6</sub> am C-Terminus	DSD4 N4/C2
pJOE4782 MBP-DSD4 <sup>H107V</sup>	Kan/Nal	Fusionsprotein mit His <sub>6</sub> am C-Terminus	MBP N1/C1 DSD4 N6/C2
pJOE4782 GFP-DSD4 <sup>H107V</sup>	Kan/Nal	Fusionsprotein mit His <sub>6</sub> am N-Terminus	GFP N3/C2 DSD4 N5/C2

Ergänzend wurden Plasmide, die speziell für die Expression in *P. putida* hergestellt worden sind, parallel dazu in *E. coli* BL21 (rha<sup>-</sup>) transformiert und getestet. Die Ausgangsvektoren, aus denen die jeweiligen Plasmide hervorgehen, sind aus den Plasmid- Bezeichnungen ersichtlich.

### 2.1.3. Primer

Die Restriktionsschnittstellen sind in den aufgelisteten Primer Sequenzen (Tabelle 2-3) unterstrichen, Start- und Stop-Codons fett und Affinitäts-tags kursiv gedruckt.

Tabelle 2-3: **Primer für die Amplifikation von Haloalkan Dehalogenasen, GFP und MBP.**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T <sub>M</sub> (°C)
DhaA N1	GGG AAT <u>TCC ATA TGT</u> CAG AAA TCG GTA CAG GCT TTC C	70,6
DhaA N3	GGG <u>CGA TAT CTC</u> AGA AAT CGG TAC AGG CTT TCC CT	73,7
DhaA C2	CGC <u>GGA TCC</u> GAG TGC GGG GAG CCA G	74,5
DhaA C4	CCC <u>AAG CTT</u> AAT GAT GAT GAT GAT GAT GCT CGA GTG CCG GGA GCC AGC	>75,0
DSD4 N4	GGA ATT <u>CCA TAT GAG</u> CGA AGA AGC GAT CTC GGC C	71,9
DSD4 N5	CCC <u>AAG CTT</u> ATG AGC GAA GAA GCG ATC TCG GCC	73,2
DSD4 N6	CGC <u>GAA TTC</u> AGC GAA GAA GCG ATC TCG GCC CTC	>75,0
DSD4 C1	CCC <u>AAG CTT</u> AGA TTC CTC GGT ACC AGT CTG CG	72,1
DSD4 C2	CCC <u>AAG CTT</u> AAT GAT GAT GAT GAT GAT GGA TTC CTC GGT ACC AGT CTG CG	>75,0
DSD49 N2	GGG <u>CGA TAT CAG</u> CGA GAT CTC CCC GAA AGA GC	73,3
DSD49 N3	GCG <u>GGA TCC</u> AGC GAG ATC TCC CCG AAA GAG C	74,8
DSD49 C1	CCC <u>AAG CTT</u> AGA GAT CCG CGT ACC AGC CTG	72,2
GFP N2	GCG <u>GGA TCC</u> AGC AAG GGC GAG G	69,6
GFP N3	GGA ATT <u>CCA TAT GAC</u> CAT GAT TAC GCA TCA TCA TCA TCA TCA TAG CAA GGG CGA GGA GCT G	>75,0
GFP N4	CCG <u>GAA TTC</u> AGC AAG GGC GAG GAG CTG	69,1
GFP C1	CCC <u>AAG CTT</u> TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG CTT GTA	71,2
GFP C2	CCC <u>AAG CTT</u> CTT GTA CAG CTC GTC CAT G	68,0
GFP C3	GGG CGA TAT CCT TGT ACA GCT CGT CCA TG	69,5

## Fortsetzung Tabelle 2-3

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T <sub>M</sub> (°C)
MalE N1	GAT ATA <u>CAT ATG</u> AAA ACT GAA GAA GGT AAA CTG	56,0
MalE C1	CCG <u>GAA TTC</u> CCT TCC CTC GAT CCC GAG GTT	74,0
MalE C2	CCC <u>AAG CTT</u> CCT TCC CTC GAT CCC GAG GTT	73,0

Tabelle 2-4: Primer für die Modifikation von *dsd4* über die Quick Change Methode nach Stratagene.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T <sub>M</sub> (°C)
DSD4 <sup>H107K AAA</sup> N1	CAG CTT GGT GGT GAA AGA CTG GGG ATC G	69,5
DSD4 <sup>H107K AAA</sup> C1	CGA TCC CCA GTC TTT CAC CAC CAA GCT G	69,5
DSD4 <sup>H107K AAG</sup> N1	CGA TCC CCA GTC CTT CAC CAC CAA GCT G	71,0
DSD4 <sup>H107K AAG</sup> C1	CAG CTT GGT GGT GAA GGA CTG GGG ATC G	71,0
DSD4 <sup>H107R</sup> N1	CAG CTT GGT GGT GCG AGA CTG GGG ATC G	72,4
DSD4 <sup>H107R</sup> C1	CGA TCC CCA GTC TCG CAC CAC CAA GCT G	72,4
DSD4 <sup>H107L</sup> N1	CAG CTT GGT GGT GCT GGA CTG GGG ATC G	72,4
DSD4 <sup>H107L</sup> C1	CGA TCC CCA GTC CAG CAC CAC CAA GCT G	72,4

## 2.2. Nährmedien

Im Folgenden sind die eingesetzten Nährmedien für die Kultivierung von *E. coli* und *P. putida* in tabellarischer Form aufgeführt.

### 2.2.1. Medien zur Kultivierung von *Escherichia coli*

• TSS-Lösung (Chung et al. 1989)	• LB-Medium pH 7,0 (Luria et al. 1960)
LB-Medium (pH 6,5)..... 90 ml	Bacto-Trypton..... 10 g/l
PEG 6000..... 10 g	Hefeextrakt..... 5 g/l
DMSO..... 5 ml	NaCl..... 10 g/l
2 M MgCl <sub>2</sub> ..... 2,5 ml	



- Mineralsalzmedium (Neubauer et al. 1995)

Glucose.....	25	g/l
Salzlösung.....	937,5	g/l
Spurenelementlösung	3,0	ml/l
1 M Magnesiumsulfat- lösung.....	2,0	ml/l
1 % Thiminlösung.....	1,0	ml/l

## Salzlösung

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H-Citrat.....	1,0	g/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *10H <sub>2</sub> O.....	2,0	g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	2,7	g/l
NH <sub>4</sub> Cl.....	0,5	g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	14,6	g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O.....	4,0	g/l

## Spurenelementlösung

CaCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O.....	0,5	g/l
ZnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O.....	0,2	g/l
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O.....	0,1	g/l
Na <sub>2</sub> -EDTA.....	10,1	g/l
FeCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O.....	8,4	g/l
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O.....	0,2	g/l
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O.....	0,2	g/l

## Fed-Batch- Medium

## Feed I

Glucose.....	480	g/l
MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O.....	23,5	g/l
Spurenelementlösung	119	ml/l
Thiamin.....	0,6	ml/l

## Feed II

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	396	g/l
--	-----	-----

### 2.2.2. Medien zur Kultivierung von *Pseudomonas putida*

Für die Kultivierung von *Pseudomonas putida* wird das unter 2.2.1 beschriebene LB- Medium verwendet.

### 2.2.3. Antibiotika und Medienzusätze

Die Antibiotika und Medienzusätze werden nach dem Lösen mittels eines 0,22 µm Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilters der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) sterilfiltriert und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2-5: **Mediumszusätze für die Kultivierung von Mikroorganismen.**

<b>Komponente</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml	100 µg/ml
Nalidixin	50 mg/ml	50 µg/ml
Rhamnose	200 mg/ml	2 mg/ml

## **2.3. Chemikalien und Enzyme**

### **2.3.1. Chemikalien**

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien werden von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merk (Darmstadt), Riedel-deHaen/Sigma-Chemie (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

### **2.3.2. Kits**

#### **Plasmidisolierung**

Für die Plasmidisolierung wird das QIAprep® Spin Miniprep Kit der QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland) eingesetzt.

#### **Agarosegelextraktion**

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wird auf das QIAquick® Gel Extraction Kit der QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland) zurückgegriffen.

### **2.3.3. Enzyme**

Die in den Versuchen verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden mit Ausnahme des Enzyms *PmeI* von der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) bezogen. Die PCR Polymerase wurde von der Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), die T4 Ligase von der Firma New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland) bezogen.

## 2.4. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen werden, wenn nichts anderes vermerkt ist, mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{VE}}$  angesetzt.

- Lösungen für Agarose- und SDS-Gelelektrophoresen

### 50x TAE-Puffer

Tris-Base.....	2,0	M
Essigsäure.....	1,0	M
EDTA pH 8,0.....	0,05	M

### 6x DNA-Probenpuffer

Bromphenolblau.....	0,25	% (w/v)
Sucrose.....	40	%

### Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid.....	10	mg/ml
---------------------	----	-------

(Lösung muss vor Licht geschützt aufbewahrt werden)

### 5x TGS-Puffer

Tris-Base.....	125	mM
Glycin.....	1,25	M
SDS.....	0,5	%

### 5x Probenpuffer

Tris-Base pH. 6,8...	225	mM
Glycerin.....	50	%
SDS.....	5	%
Bromphenolblau.....	0,05	% (w/v)
DTT.....	250	mM

### Coomassie Färbelösung

Coomassie.....	0,25	%
----------------	------	---

ad Coomassie Entfärbelösung

### Coomassie Entfärbelösung

Methanol.....	45	%
$\text{H}_2\text{O}$ .....	45	%
Essigsäure.....	10	%

- Lösungen für den Aktivitätsassay

### Interne Standardlösung

Acetophenon.....	1,58	mM
------------------	------	----

ad Isopropanol

### TCP/DCH Stammlösung

1,2,3-Trichlorpropan....	20	mM
2,3-Dichlor-1-propanol.	20	mM

ad Isopropanol

**Substratlösung pH 8,9**

TAPS.....	50	mM
1,2,3-Trichlorpropan...	10	mM

- Lösungen für die Proteinaufreinigung

**Kupferlösung pH 4,2**

CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O.....	50	mM
NaCl.....	0,2	M

**Equilibrierungs-Puffer pH 6,8**

Natriumphosphatpuffer	20	mM
NaCl.....	0,2	M

**Elutionspuffer pH 7,0**

Imidazol.....	0,2	M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2	M

**EDTA Lösung**

EDTA	0,5	M
------	-----	---

- Lösungen für die *in vitro* Synthese

**S30 Puffer pH 8,2**

Magnesiumacetat.....	14	mM
Kaliumacetat.....	60	mM
DTT.....	1	mM
...		
Tris/Acetat-Puffer.....	100	mM

**„run-off“ Lösung pH 8,2**

Magnesiumacetat.....	9,2	mM
DTT.....	4,4	mM
Tris/Acetat-Puffer.....	433	mM

**Aminosäure Stammlösung**

Aminosäuren (18).....	100	mM
Hepes/KOH pH 7,6.....	0,1	M
Thyrosin.....	10	mM
HCl.....	0,1	M
.		
Methionin.....	20	mM
Hepes/KOH pH 7,6.....	0,1	M

**Nukleotid-Stammlösung**

ATP.....	100	mM
GTP.....	100	mM
CTP.....	100	mM
UTP.....	100	mM
Hepes/KOH pH 7,6.....	0,1	M

**Mastermix**

Hepes/KOH pH 7,6.....	433	mM
Tyrosin in HCl.....	1,7	mM
DTT.....	13	mM
...		
ATP.....	6,7	mM

**Reaktionsmix**

	<b>300</b>	<b>µl</b>
Mastermix (-Met).....	46	µl
40 % Glycerin.....	30	µl
10 % Natriumazid.....	0,9	µl
...		
35x NTP.....	8,5	µl

*Fortsetzung*

CTP.....	3,3	mM	2,5 M Kaliumacetat.....	12	µl
GTP.....	5,2	mM	1 M Magnesiumacetat.	5,4	µl
UTP.....	3,3	mM	20 mM Methionin.....	3,8	µl
Folsäure (3 mg/ml).....	0,1	mg/ml	0,5 M Acethylphosphat	24	µl
EDTA (250 mM).....	6,7	mM	100 mg/ml Rifampicillin	3,0	µl
Aminosäure Mix.....	1,7	mM	40 mg/ml tRNA.....	3,6	µl
(5 mM) (-Met/-Tyr)			40 U/µl RNAsin.....	0,8	µl
			2,5 M Hepes/KOH.....	4,0	µl
			pH 7,6		

**2.5. Magnetpartikel zur Proteinaufreinigung**

Bei der Magnetseparation werden unporöse Magnetpartikel eingesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten emulsionspolymerisierten Magnetpartikel werden von der Firma Chemagen Biopolymer-Technologie AG (Baesweiler, Deutschland) zur Verfügung gestellt und sind vom Typ MPVA-IDA (Magnetit-Polyvinylalkohol) der Charge 28/29/87. Diese Partikel haben eine Größe von 1,2 – 1,6 µm und besitzen eine Remanenz von  $M_R = 0,13 \text{ Am}^2 \text{ kg}^{-1}$ . Die MPVA-IDA Partikel sind mit Iminodiessigsäure (IDA) funktionalisiert, welche für die Aufreinigung von „His<sub>6</sub>-getagten“ Proteinen geeignet ist.

### **3. Methoden**

In diesem Kapitel werden die in der Arbeit verwendeten Methoden dargestellt. Die Abschnitte 3.1, 3.2 und 3.3 befassen sich mit mikrobiologischen und molekularbiologischen bzw. proteinbiochemischen Methoden. Abschließend sind im Unterkapitel 3.4 eingesetzte Software- Programme zusammengestellt.

#### **3.1. Mikrobiologische Methoden**

##### **3.1.1. Stammhaltung**

Die verschiedenen *E. coli* und *P. putida* Stämme werden zur kurzfristigen Lagerung auf Agarplatten ausgestrichen und bei 4 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Mikroorganismen werden Glycerolstocks angelegt. Hierfür wird die Methode, wie von Sambrook (Sambrook and Russell 2001) beschrieben, eingesetzt.

##### **3.1.2. Kultivierung im Schüttelkolben**

Die Kultivierung im Schüttelkolben wird für *E. coli* und *P. putida* ausschließlich in LB- Medium mit den entsprechenden Mediumszusätzen durchgeführt. Hierbei beträgt das maximale Flüssigkeitsvolumen 20 % des Gesamtvolumens des jeweils eingesetzten Schüttelkolbens. Die rekombinante Proteinsynthese wird durch Zugabe des Induktors bei einer OD<sub>500</sub> von 0,3-0,5 induziert. Die Zellernte erfolgt 6 h oder 20 h nach Induktion.

##### **3.1.3. Kultivierung im 30 l- Bioreaktor**

Für die Bereitstellung einer größeren Menge des aufzureinigenden Biokatalysators wird eine Hochzelldichte-Kultivierung in einem 30 l- Edelstahlfermenter der Firma Bioengineering AG (Wald, Schweiz) durchgeführt. Die Fed-Batch-Kultivierung erfolgt mit einer exponentiellen Zufütterungsrate, wie sie bei Wilms (Wilms et al. 2001) beschrieben ist.

##### **3.1.4. Zellaufschlussmethoden**

###### **Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator**

Mit dem Hochdruckhomogenisator werden Zellsuspensionen mit einem Mindestvolumen von 10 ml und einer Konzentration zwischen 10 % und 30 % (w/v) aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgt mit dem EmulsiFlex<sup>®</sup>-C5 Hochdruckhomogenisator der Firma Avestin (Mannheim, Deutschland) bei 18.000 Psi unter Eiskühlung.

### **Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle**

Für den Zellaufschluss von Biosuspensionen, die aus der Hochzelldichte- Fermentation gewonnenen werden, wird eine Rührwerkskugelmühle der Firma Netzsch Feinmahltechnik GmbH (Selb, Deutschland) eingesetzt. Die Zellsuspension wird hierbei kontinuierlich durch die Kugelmühle gepumpt und dabei aufgeschlossen. Eine detaillierte Schemazeichnung der Anlage findet sich in Abschnitt 5.3.1.

Kenndaten der Rührwerkskugelmühle

Volumen der Aufschlusskammer:	4800 ml
Glasperlengröße:	0,75-1,0 mm (Sili beads TypS)
Glasperlenmenge:	3000 ml
Durchflussrate:	700 ml min <sup>-1</sup>
Rührwellendrehzahl:	2100 min <sup>-1</sup>

#### **3.1.5. Zentrifugation**

Volumina bis zu 2 ml werden in einer Eppendorf- Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert. Volumina bis zu 500 ml werden mit einer Zentrifuge des Typs J2-21ME der Firma Beckman zentrifugiert.

### **3.2. Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.2.1. *In vitro* Biosynthese**

##### **S30- Lysat Herstellung nach Pratt (Chen and Zubay 1983)**

Für die S30- Lysat Herstellung wird auf *E. coli* 2MSCC3010 Biomasse zurückgegriffen, die aus der exponentiellen Wachstumsphase einer Batch- Fermentation stammt und bei -70 °C gelagert wurde. Die Zellen werden in S30- Puffer mit 0,05 µl ml<sup>-1</sup> Mercaptoethanol gewaschen und erneut in S30- Puffer aufgenommen, wobei 50 g Zellen in je 64 ml Puffer resuspendiert wurden. Nach 15 minütiger Begasung mit Stickstoff wird die Zellsuspension in einer French Press (Aminco SLM Instruments, Urana Illinois) bei 600 Psi aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wird zweimal bei 18.000 min<sup>-1</sup>, 7 °C 30 Minuten lang zentrifugiert. Jeweils 25 ml des Überstandes werden mit 7,5 ml „run-off“-Mix versetzt, 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend 45 Minuten lang bei 20.000 min<sup>-1</sup> und 7 °C zentrifugiert. Das erhaltene S30- Lysat wird aliquotiert und bei -70 °C schockgefroren.

### Radioaktiv markierte *in vitro* Synthese

Die einzusetzende Plasmidmenge für die radioaktiv markierte Proteinsynthese wird anhand der nachfolgenden Formel berechnet:

$$\text{Plasmidmenge} = \frac{\text{Größe des Plasmids (bp)}}{\text{Größe des Plasmids pTST101 (6464bp)}} \cdot 22,3 \mu\text{g ml}^{-1} \quad (3-1)$$

Ein Reaktionsansatz setzt sich aus den in Tabelle 3-1 aufgelisteten Komponenten zusammen. Die Synthese läuft bei 30 °C ab, wobei die Reaktion durch Zugabe der T7-Polymerase gestartet wird. Über einen Zeitraum von 1,5 Stunden werden den Reaktionsansätzen jeweils 20 µl Probe entnommen, die in 500 µl 10 %-iger TCA abgestoppt werden. Die Proben werden 10 Minuten lang bei 95 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit 10 ml 5 %-iger TCA auf „Glass Microfibre“ Filter (Whatman, Dassel) überführt. Die Analyse der Proben erfolgt mit 4 ml Scintillationsflüssigkeit (Amersham Biosciences, Freiburg) in dem Scintillationsmessgerät Liquid Scintillation Analyzer 1900 TR (Packard, Groningen, Niederlande). Nach der letzten Probenahme werden die Ansätze abzentrifugiert und sowohl der Überstand als auch das Pellet auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Tabelle 3-1: **Komponenten des Reaktionsansatzes für die radioaktiv markierte *in vitro* Proteinsynthese.**

Komponenten	Volumen (µl)
Reaktionsmix	142,1
Plasmid (z.B. pTST101 mit 288,6 µg ml <sup>-1</sup> )	23,2
<sup>14</sup> C-Leucin (0,17 mM)	46,1
S30- Lysat (z.B. mit 26 g l <sup>-1</sup> )	68,5
50 U µl <sup>-1</sup> T7- Polymerase	12,0
H <sub>2</sub> O <sub>VE</sub>	8,1

### 3.2.2. Aktivitätstest

#### Haloalkan Dehalogenase Aktivitätstest

Der Aktivitätstest für die Haloalkan Dehalogenase wird in einem temperierten Wasserbad bei 30 °C unter ständigem Rühren durchgeführt. Durch Zugabe des Rohextraktes zu der vortemperierten Substratlösung im Verhältnis 1:1 wird die Umsetzung initiiert. Über einen Zeitraum von drei Stunden werden dem Reaktionsgefäß in einer Dreifachbestimmung je 100 µl Probe entnommen und in 900 µl interner Standardlö-



---

sung abgestoppt. Die Proben werden anschließend mittels Gaschromatographie analysiert.

### 3.2.3. Analytik

#### Protein Bestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteins erfolgt über den Protein Assay der Firma BIO-RAD Laboratories GmbH (München, Deutschland). Dieser wird, wie in der Anleitung beschrieben, durchgeführt. Die Kalibrierung des Assays erfolgt über das Standardprotein Albumin (Fraktion V), das in Konzentrationen von  $0,1 \text{ g l}^{-1}$  bis  $0,5 \text{ g l}^{-1}$  eingesetzt wird.

#### Biomasse Bestimmung

Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration während der Fermentation erfolgt über die Messung der optischen Dichte bei  $500 \text{ nm}$  ( $OD_{500}$ ) und wird über die nachfolgende Formel berechnet:

$$c_x = OD_{500} \cdot k \left( \text{gl}^{-1} \right) \quad (3-2)$$

Der Korrelationsfaktor  $k = 0,3$  wurde für *E. coli* mittels Biotrockenmassebestimmungen bei unterschiedlichen optischen Dichten empirisch ermittelt.

#### Glukose Bestimmung

Die Bestimmung der Glukosekonzentration während der Batch Phase der Fermentation erfolgt offline mittels eines enzymatischen Tests der Firma Boehringer Mannheim. Das Testprinzip beruht auf der Umwandlung der Glukose zu D-Gluconat-6-phosphat unter Bildung der Messgröße NADPH, die äquivalent zu der vorhandenen Glukose gebildet wird. Gegen Ende der Batch Phase und im Verlauf der gesamten Fed-Batch Phase der Kultivierung erfolgt die Glukosemessung online mit dem Glukose Messgerät ProcessTRACE 1.21MT der Firma TRACE Biotech AG, Braunschweig. Das Messprinzip ist hierbei die enzymatische Umsetzung der Glukose zu Glukonolacton bzw. zur Glukonsäure mit paralleler anodischen Oxidation von Wasserstoffperoxid.

#### Fluoreszenzmessung

Die Bestimmung der spezifischen Proteinkonzentration des rekombinanten Proteins erfolgt, sofern es mit GFP fusioniert ist, über eine Fluoreszenzmessung. Diese wird in dem Fluorometer Spectra Fluor der Firma TECAN GmbH (Crailsheim, Deutschland) mit einem Extinktions- und Emissionsfilter von  $485 \text{ nm}$  bzw.  $535 \text{ nm}$  durchgeführt. Mittels eines Korrelationsfaktors, der über eine *in vitro* Synthese (siehe unten)

ermittelt wird, kann die gemessene Fluoreszenz in die jeweilige Proteinkonzentration umgerechnet werden.

Während der Fermentation wird die Bildung des rekombinanten Proteins über eine online Fluoreszenzsonde HPX-2000 der Firma Mikropack (Ostfildern, Deutschland) mit einem Extinktions- und Emissionsfilter von 480 nm bzw. 510 nm verfolgt. Die Detektion erfolgt dabei mit Hilfe des Spektrometers S200 der Firma Ocean Optics, USA. Die über die Fluoreszenzsonde erhaltenen Werte können mit den offline Werten des Spectra Fluor Fluorometers korreliert werden um somit die spezifische Proteinkonzentration des rekombinanten Proteins während der Fermentation zu ermitteln.

Bei der Vermessung von Proben aus Proteinaufreinigungen mittels Magnettrenntechnik, muss darauf geachtet werden, dass diese Proben vor der Messung 1:1 mit einer 0,5 M EDTA Lösung versetzt werden. Die zum Teil in den Aufreinigungsfraktionen enthaltenen  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen wirken sich störend auf die Fluoreszenzmessung aus. Deshalb erfolgt zuvor die Komplexierung der  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen mit EDTA.

### **Kalibrierung Fluoreszenz / Proteinkonzentration**

Der Korrelationsfaktor für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen aus Fluoreszenzmessungen wird mit Hilfe von *in vitro* Synthesen gewonnen. Hierzu wird eine radioaktiv markierte *in vitro* Synthese zunächst für das Protein GFP-DhaA durchgeführt. Aus diesem Ansatz lassen sich über die radioaktive Markierung Rückschlüsse auf die Menge des gebildeten Polypeptids ziehen. Parallel dazu erfolgt unter gleichen Bedingungen eine *in vitro* Synthese, bei der die Zunahme des Proteins GFP-DhaA über Fluoreszenzmessungen aufgenommen wird. Aus der Kopplung der maximal synthetisierten Proteinmenge in der radioaktiv markierten Synthese mit den maximal gemessenen Fluoreszenzwerten erhält man eine Korrelation zwischen der Proteinkonzentration von GFP-DhaA und den Fluoreszenzmesswerten. Die Proteinkonzentration von GFP-DhaA ( $x$  in  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) ergibt sich dabei aus der Formel

$$y (\text{counts}) = 54,5 \cdot x (\text{mg ml}^{-1}). \quad (3-3)$$

### **Gaschromatographie**

Die Auswertung der Proben aus dem Haloalkan Dehalogenase Assay wird mittels Gaschromatographie durchgeführt. Hierzu wird der Gaschromatograph 5890 Series II der Firma Hewlett Packard (Stuttgart, Deutschland) eingesetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgt in einer Trennsäule (Permabond<sup>®</sup> CW20, 25m\*0,32 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland).

### 3.2.4. Proteinaufreinigungsmethoden

#### Hochgradienten-Magnet-Separation

Für die Aufreinigung im 1 ml- Maßstab wird ein vom Forschungszentrum Karlsruhe modifiziertes Magnet-Rack mit zehn Permanentmagneten in der Bauart eines Ependorfständers verwendet. Nach einem Standardprotokoll Tabelle 3-2 des Forschungszentrums Karlsruhe (Hoffmann 2002) werden je Aufreinigungsansatz 2 mg M-PVA-IDA Partikel der Chemagen Biopolymer Technologie AG (Baesweiler, Deutschland) eingesetzt.

Tabelle 3-2: **Aufreinigungsprotokoll von rekombinanten Proteinen im 1 ml-Maßstab mit M-PVA-IDA Partikeln.**

<b>(1) Beladung der Magnetpartikel mit Kupferionen</b>		
1 x	Waschen der Partikel mit 1 ml H <sub>2</sub> O <sub>VE</sub>	- Vortexen - Partikel im Magnet-Rack abtrennen - Überstand abnehmen
1 x	1 ml Kupferlösung zugeben	- Vortexen - 10 min bei 25 °C und 14.000 rpm inkubieren - Partikel im Magnet-Rack abtrennen - Überstand abnehmen
2 x	Waschen der Partikel mit 1 ml EQ-Puffer	- Vortexen - Partikel im Magnet-Rack abtrennen - Überstand abnehmen
<b>(2) Beladung der Partikel mit dem aufzureinigendem Protein</b>		
1 x	1 ml Rohextrakt zugeben	- Vortexen - 10 min bei 25 °C und 14.000 rpm inkubieren - Partikel im Magnet-Rack abtrennen - Überstand abnehmen
<b>(3) Entfernung der Zelltrümmer und des Fremdproteins</b>		
3 x	Waschen der Partikel mit 1 ml EQ-Puffer	- Vortexen - Partikel im Magnet-Rack abtrennen - Überstand abnehmen
<b>(4) Elution des Zielproteins</b>		
2 x	1 ml Elutionspuffer zugeben	- Vortexen - 10 min bei 25 °C und 14.000 rpm inkubieren - Partikel im Magnet-Rack abtrennen - Überstand abnehmen

Die Aufreinigung ähnelt vom Ablauf her einem Affinitätschromatographie-Verfahren. Sie setzt sich aus folgenden vier Arbeitsschritten zusammen:

- (1) Beladung der Magnetpartikel mit Kupferionen,
- (2) Auftragung des Zellrohextraktes mit der spezifischen Bindung des Zielproteins an die Partikel,

- (3) Entfernung von Zelltrümmern und Fremdproteinen über Waschschrirte und
- (4) die Elution des Zielproteins von den Magnetpartikeln mit Imidazo haltigem Puffer.

Die Aufreinigung im technischen Maßstab wird mit einem am Forschungszentrum Karlsruhe entwickelten Hochgradienten-Magnetseparator durchgeführt. Dieser ist in eine Anlage integriert, in der eine vollautomatische Aufreinigung von Proteinen durchgeführt werden kann. Die einzelnen Arbeitsschritte während der Aufreinigung in der HGMF-Anlage gleichen prinzipiell den zuvor beschriebenen Aufreinigungsschritten im Magnet-Rack. Der Anlagenbau wurde von A. Hauck (Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart) durchgeführt, und das rechnergestützte Aufreinigungsprogramm ist von N. Ebner (Forschungszentrum Karlsruhe) im Rahmen seiner Dissertation (Ebner 2006) entwickelt worden. Das Fließschema dieser HGMF-Anlage ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Detailinformationen bezüglich der technischen Daten und Anlagenkomponenten sowie Information zu der verwendeten Software sind der Tabelle 3-3 zu entnehmen. Die für die Aufreinigung notwendigen Puffer und Lösungen werden aus den jeweiligen Vorlagebehältern über die integrierte Schlauchpumpe in die Anlage eingebracht. Die jeweiligen Ventilstellungen innerhalb der Anlage sowie Pumpzeiten und Pumpraten werden über ein rechnergestütztes Aufreinigungsprogramm vorgegeben.

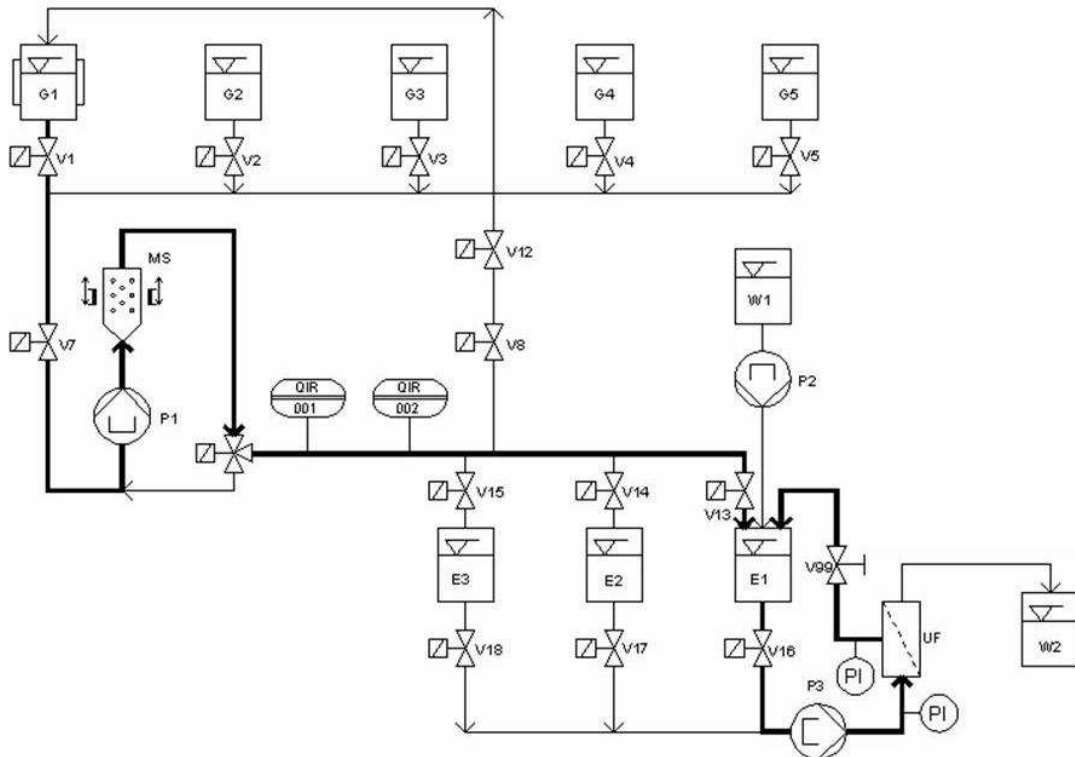


Abbildung 3-1: **Fließschema der HGMF-Anlage im technischen Maßstab zur Aufreinigung von „His<sub>6</sub> getagten“ Proteinen.** G1-G5: Vorlagenbehälter für Magnetpartikel, Equilibrierungs- und Elutionspuffer, Rohextrakt sowie für die Kupferlösung; E1-E3: Vorlagengefäße für das Eluat, Retentat und den Abfall; V<sub>x</sub>: Magnetventil Nr. x; P1-P3: Schlauchpumpen; MS: Separationskassette mit Permanentmagnet; UF: Cross-Flow Filtrationskassette; QIR 001 und 002: Fluoreszenz- und UV-Sonde; W1 und W2: Vorlagenbehälter für Filtrationspuffer und Filtrat PI: Manometer.

Tabelle 3-3: **Technische Daten und Bauteile der HGMF-Anlage**

Magnetseparator	HGF 300	Steinert Anlagenbau, Köln
Separationsmatrix	Details siehe unten	Steinert Anlagenbau, Köln
Permanentmagnet	0,45 Tesla	Steinert Anlagenbau, Köln
Schlauchpumpe	704U IP55 Washdown	Watson Marlow, Rommersbach
Vorlagenbehälter	Edelstahl, rostfrei 20-100 l	CMF Swiety, Dänemark
Magnetventile	24V, DC, 10W	Fluid automation systems, Versoix, Schweiz
Leitungen	Z130A, V24, 13W Teflon	Sirai, Bussero, Italien Rehau AG, Mainz
Programmierung	Visual Designer 4.0	Intelligent Instrumentation, Filderstadt

Die Separationskassette selbst besteht aus einer Abscheidematrix, einem Gehäuse und einem auf das Gehäuse aufgesetzten Kugelvibrator (Abbildung 3-2). Die Sepa-

rationsmatrix ist aus einer Folge von magnetischen (m) und nicht magnetischen (n) Stahlnetzen zusammengesetzt, deren Drahtdicke 0,1 (m), 0,5 (n) bzw. 1 (n) mm mißt, wobei der Drahtabstand 1 (m), 2 (n) und 5 (n) mm beträgt. Der Kugelvibrator, der über Druckluft betrieben wird, soll die Ablösung der Partikel von der Matrix erleichtern.



Abbildung 3-2: **Separationskassette der HGMF Anlage.** Die Abbildung zeigt sowohl das Gehäuse der Separationskassette mit aufgesetztem Kugelvibrator, als auch die Separationsmatrix bestehend aus einer Folge von magnetischen und nicht magnetischen Stahlnetzen.

Wie aus Abbildung 3-1 hervorgeht, ist innerhalb der HGMF-Anlage eine Ultrafiltrationseinheit (Amersham Biosciences, Freiburg) am Ende der Aufreinigung integriert. Diese dient zum einen zur Aufkonzentrierung des Endprodukts, zum anderen aber auch zur Entfernung von Kupferverunreinigungen oder zur Umpufferung des Eluats. Die Ausschlussgröße der zwei Kwick Lab Filterkassetten (UFELA 0010 010 ST 01) beträgt 10 kDa.

### **Bestimmung der Magnetpartikelkonzentration**

Die Bestimmung der Partikelkonzentration erfolgt über Trockengewichtsbestimmungen. Hierzu wird die Partikelsuspension mehrmals mit  $H_2O_{VE}$  gewaschen. Anschließend werden jeweils 3 x 1 ml der Partikelsuspension in einem vorgetrockneten und gewogenen HPLC Vial eingebracht. Nach einer Trocknungszeit von einem Tag bei 90 °C wird die Trockensubstanz ermittelt.

### **Regeneration der Magnetpartikel**

Nach den einzelnen Aufreinigungsversuchen werden die Magnetpartikel mit 0,5 M EDTA-Lösung (pH 7,5) behandelt, um die IDA-Gruppen vollständig von restlichen Kupfer-Ionen und von gebundenem Protein zu befreien. Das EDTA wird anschließend durch mehrmaliges Waschen der Partikel mit  $H_2O_{VE}$  entfernt. Die Magnetpartikel werden im Anschluss daran bei 4 °C in 20 % Etha nol gelagert.

### Rechnergestütztes Aufreinigungsprogramm

Das Programm für die Steuerung des Aufreinigungsprozess wurde mit Visual Designer 4.0 (Intelligent Instrumentation, Filderstadt) geschrieben. Das Programm gliedert sich in fünf Module (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: **Einzelne Module des rechnergestützten Aufreinigungsprogramms und deren Funktion.**

	Modul Nr.	Programm-Funktion
	HP_0	- Befüllen der Anlage mit Equilibrierungspuffer - Separation der eingebrachten Magnetpartikel
Aufreinigungszyklus	HP_1	- Beladen der M-PVA-IDA Partikel mit Kupfer-Ionen einschließlich zweier Waschschrte mit Equilibrierungspuffer - Beladung der Partikel mit Rohextrakt
	HP_2	- dreimaliges Waschen der Partikel mit Equilibrierungspuffer, um Fremdprotein zu entfernen - zweimalige Elution des Zielproteins von den Magnetpartikeln mit Imidazol haltigem Puffer
	HP_3	- Waschen der Magnetpartikel mit Equilibrierungspuffer
	HP_4	- Waschen der Magnetpartikel nach dem gesamten Aufreinigungsprozess und Rückführung dieser in das Vorlagengefäß

Die Programm-Module HP\_0 und HP\_4 werden lediglich zu Beginn bzw. am Ende des gesamten Aufreinigungsprozesses benötigt, so dass beim Durchlaufen eines Aufreinigungszyklus die Module HP\_1 bis HP\_3 durchfahren werden.

#### 3.2.5. SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrem Molekulargewicht in 10 bis 12,5 %-igen Acrylamidgelen. Die Zusammensetzung der Acrylamidgele, sowie die Durchführung der Gelelektrophorese ist in „Molecular cloning – A Laboratory Manual“ (Sambrook and Russell 2001) beschrieben. Von den Proben für die SDS-PAGE werden jeweils 20 µg Protein mit 5x Probenpuffer versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 25 µl eingestellt. Die Denaturierung der Proben erfolgt bei 95 °C während einer Zeitdauer von 10 min. Anschließend werden sie auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgt über Coomassie Färbung (Sambrook and Russell 2001).

Für radioaktiv markierte Proben wird die SDS-Gelelektrophorese in entsprechender Weise durchgeführt. Anschließend wird das Gel 60 min lang in einem Fixierer und

weiter 30 min lang in Amplify Lösung (Amersham Biosciences, Freiburg) inkubiert. Nach dem Vakuumtrocknen des Gels wird dieses bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf einem Hyperfilm MP (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert. Die Expositionsdauer beträgt je nach Effektivität der radioaktiven Markierung 72 bis 96 Stunden.

### **3.2.6. Densiometrische Auswertung von SDS-Proteingelen**

Die qualitative Auswertung einzelner Proteinbanden zur Bestimmung des prozentualen Anteils am Gesamtprotein erfolgt über das Programm Image Master<sup>®</sup> der Firma Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland).

## **3.3. Molekularbiologische Methoden**

### **3.3.1. Isolierung und Reinigung von DNA**

Die Plasmid-DNA wird mit Hilfe des QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit isoliert. Die Isolierung wird wie in der Anleitung beschrieben durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA von der Säule erfolgt mit  $32\text{ }\mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{np}}$ .

### **3.3.2. Charakterisierung der DNA**

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration, sowie deren Reinheitsgrad, wird die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen. Reine DNA zeigt ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, wobei der Quotient aus  $E_{260}/E_{280}$  bei 1,8 liegt.

### **3.3.3. Gen- Amplifikation**

Die Amplifikation der Haloalkan Dehalogenase Gene erfolgt über PCR mit den in den Tabellen 2-3 und 2-4 aufgeführten Primern. Die Annealing Temperatur wird abhängig von der Schmelztemperatur  $T_M$  der Primer für jede Amplifikation festgelegt. Eingesetzt wird ein PCR- Cyclyer der Firma Progene. Die einzelnen Komponenten der Reaktionsansätze sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.



Tabelle 3-5: **Komponenten eines PCR Ansatzes zur DNA Amplifikation.**

Komponente	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
10 x PCR Puffer + $\text{Mg}^{2+}$	5,0
10 mM dNTPs	1,0
100 pmol $\mu\text{l}^{-1}$ N Primer	1,0
100 pmol $\mu\text{l}^{-1}$ C Primer	1,0
DNA ( $\sim 100 \mu\text{g ml}^{-1}$ )	10,0
5 U $\mu\text{l}^{-1}$ Polymerase	0,5
$\text{H}_2\text{O}_{\text{np}}$	31,5

### 3.3.4. Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

#### Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA-Fragmenten oder Plasmid-DNA wird zur Klonierung von Plasmiden oder für Kontrollanalysen durchgeführt. Die Restriktionsansätze werden bei 37 °C 60 bis 90 Minuten lang inkubiert. Die Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes ist dem beiliegenden Produktblatt des jeweiligen Restriktionsenzym zu entnehmen. Im Allgemeinen werden je Restriktionsansatz 5 bis 10  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt.

#### Ligation

Bei der Ligation von Inserts und Vektoren werden, die aus dem Agarosegel eluierten DNA-Fragmente in äquimolaren Verhältnissen oder im Verhältnis 1:3 (Insert:Vektor) eingesetzt. Daher variiert die einzusetzende Menge der einzelnen Komponenten abhängig von der vorliegenden Insert- bzw. Vektorkonzentration. Für die Ligation wird die T4 Ligase der Firma New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) eingesetzt. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes, sowie die Inkubationsbedingungen sind dem beiliegenden Produktblatt der T4 Ligase zu entnehmen.

### 3.3.5. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird zur Längenbestimmung von Nukleinsäuren und zur Reinigung von Restriktions- oder PCR-Fragmenten eingesetzt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente werden 1 bis 2 %-ige Gele eingesetzt. Hierbei wird die Agarose durch Erhitzen in 1x TAE Puffer gelöst und auf den Gelträger gegossen. Die DNA-Proben werden vor dem Lauf mit 6x Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt bei einer Feldstärke von bis zu 5  $\text{V cm}^{-1}$ . Als Längenstandard wird der Molekulargewichtsmarker MWM VII der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) eingesetzt.

### 3.3.6. Herstellung kompetenter Zellen

Mit einer *E. coli* Übernachtskultur werden 50 ml LB-Medium 1:100 angeimpft und bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen eine OD<sub>500</sub> von 0,4 erreichen. Die Zellsuspension wird in sterilen Zentrifugenbechern bei 4 °C 10 min bei 4.000 min<sup>-1</sup> abzentrifugiert. Das Pellet wird in 2 ml TSS Lösung resuspendiert und auf Eis gelagert.

### 3.3.7. Transformation mit der TSS Methode

Für die Transformation werden 100 bis 200 ng Plasmid-DNA oder Ligationsansatz zu 200 µl der kompetenten Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt eine Inkubation über 90 Sekunden bei 42 °C und dann anschließend ein sofortiges Kühlen auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium werden die Ansätze für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Transformationsansätze werden auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert.

### 3.3.8. Konjugation

Konjugationen werden durchgeführt, um Rhamnose induzierbare Vektorsysteme aus dem Wirtstamm *E. coli* S17 in den Expressionsstamm *P. putida* KT2440 zu übertragen. Hierfür sind zunächst Kulturen von *E. coli* und *P. putida* in 10 bzw. 5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angesetzt worden, die bei 37 °C bzw. 30 °C über Nacht inkubiert werden. Anschließend erfolgt die Zentrifugation der Übernachtskulturen bei 4.000 min<sup>-1</sup> und 20°C für 10 min. Nach Resuspension der Zellen in 10 bzw. 5 ml LB-Medium werden diese im Verhältnis 1:3 (*E. coli* : *P. putida*) gemischt und 1:25 mit LB-Medium verdünnt. 100 µl der Mischkultur werden auf eine LB-Platte gegeben und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen werden am darauf folgenden Tag mit 5 ml LB-Medium von der Platte abgeschwemmt, gevortext und auf Selektionsplatten mit den Antibiotika Kanamycin und Nalidixin vereinzelt.

### 3.3.9. Quick Change Mutagenese

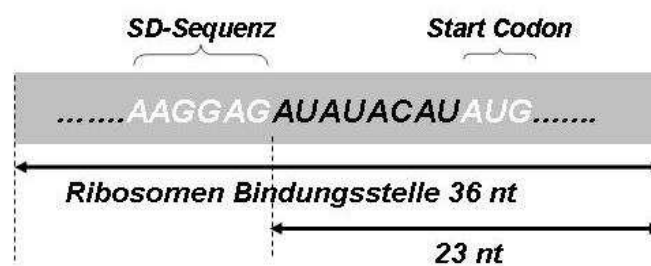
Die DSD4 Varianten DSD4<sup>H107R</sup>, DSD4<sup>H107L</sup>, DSD4<sup>H107K AAA</sup> und DSD4<sup>H107K AAG</sup> wurden über die Quick Change Methode erzeugt. Hierbei wurde nach dem Protokoll des Quick Change® Site- Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene vorgegangen. Die Primer für die Gen- Amplifikation sind der Tabelle 2-4 zu entnehmen.

### 3.4. Software

#### 3.4.1. *mfold* - „folding index“-Berechnung

Eine Vorausberechnung der RNA Sekundärstrukturen wird in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit dem von Zuker entwickelten Programm *mfold* (Mathews et al. 1999; Zuker 2003) durchgeführt. Das Programm errechnet ausgehend von der mRNA Sequenz des betrachteten Gens, welche wahlweise von der *T7* Promotorregion bzw. der *rha*<sub>BAD</sub>-Promotorregion bis zur Terminationsregion reicht, die Sekundärstruktur mit der geringsten freien Energie. Neben dieser Lösung wird eine Vielzahl weiterer suboptimaler Lösungen errechnet, wobei innerhalb des Programms maximal 50 Lösungen generiert werden. Aus der Anzahl der Lösungen kann für jede einzelne Position die Wahrscheinlichkeit einer Basenpaarbildung angegeben werden.

Der so genannte „folding index“  $f$  wurde von Arnold (Arnold 2003) eingeführt. Die Definition des „folding index“ ist über den Anteil der ungepaarten Basen innerhalb der auf die Shine-Dalgarno Sequenz folgenden 23 Basen gegeben (Abbildung 3-3). Wie Arnold (Arnold 2003) zeigen konnte, lässt sich die Translationseffizienz von Plasmid codierten Proteinen in *in vitro* und *in vivo* Versuchen mit dem folding index korrelieren. Hierbei gilt, dass für folding indices  $f \geq 0,5$  eine hohe Translationseffizienz erwartet wird.



$$\text{Definition : } f = \frac{\text{Anzahl der ungepaarten Basen } x \text{ (nt)}}{23 \text{ (nt)}}$$

Abbildung 3-3: **Definition des „folding index“  $f$ .**  $f$  ist über den Anteil der ungepaarten Basen innerhalb der auf die Shine-Dalgarno (SD) Sequenz folgenden 23 Basen (nt) definiert. Die SD Sequenz und das Start Codon der Translation sind weiß unterlegt.

## 4. ***In vivo* Proteinfaltung heterologer Proteine**

Die korrekte *in vivo* Proteinfaltung ist eines der häufigsten Probleme bei der heterologen Proteinsynthese. Viele Proteine enthalten allein innerhalb ihrer Aminosäuresequenz die gesamte Information über ihre Tertiärstruktur. Diese Proteine erlangen in *in vitro* Versuchen nach ihrer Denaturierung relativ leicht ihre native Konformation (Anfinsen 1973; Tanford et al. 1973). Da die *in vivo* Proteinfaltung in Mikroorganismen ein co-translatinaler Prozess ist, wird diese aber von weiteren Faktoren beeinflusst. Diese Faktoren können nicht auf einfachem Wege in einer zellfreien Umgebung nachgestellt werden. Hierbei kommen Einflüsse, wie die physiko-chemischen Eigenschaften des Zytoplasmas, die Interaktion mit anderen Proteinen wie z.B. molekularen Chaperonen oder die Proteinbiosyntheserate, zum tragen. Molekulare Chaperone verhindern dabei beispielsweise durch Interaktion mit den neu synthetisierten Polypeptiden deren Aggregation, die auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen auftreten kann (Cole 1996; Feldman and Frydman 2000).

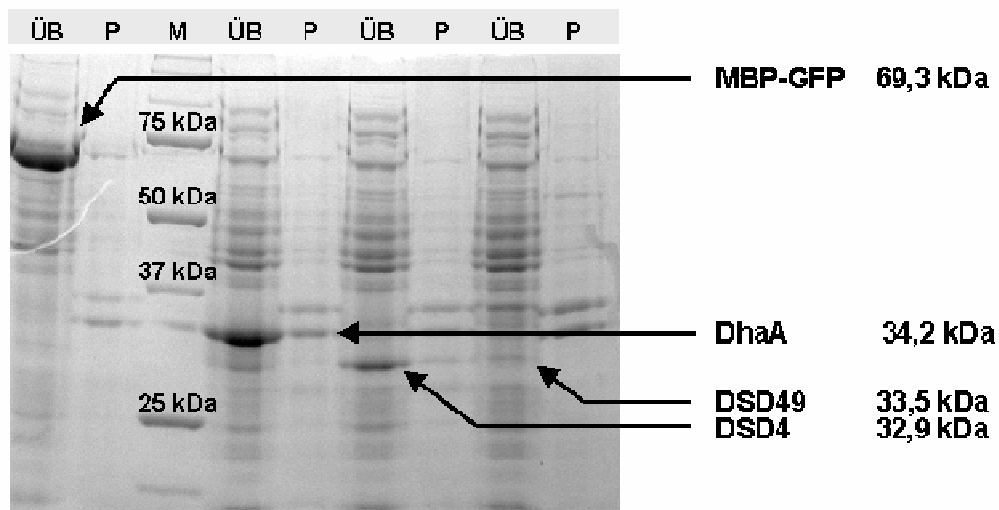
In den folgenden Abschnitten wird auf die Problematik der heterologen Genexpression bzw. der *in vivo* Proteinfaltung von Haloalkan Dehalogenasen eingegangen. In Abschnitt 4.1 wird zunächst die Ausgangssituation für die Expression der drei Haloalkan Dehalogenasen DhaA, DSD4 und DSD49 in dem Wirtsorganismus *E. coli* aufgezeigt und grundlegende Vorgehensweisen beschrieben. Der Abschnitt 4.2 beschäftigt sich mit experimentellen Ansätzen zur Expressionsoptimierung von DSD49 und DSD4 bzw. einer Punktmutante DSD4<sup>H107V</sup>, die zunächst beschrieben und anschließend diskutiert werden. Neben der experimentellen Vorgehensweise beschäftigt sich diese Arbeit mit modellgestützten Ansätzen zur Verbesserung der Proteinexpression, auf die in Abschnitt 4.3 näher eingegangen werden. Im Mittelpunkt steht hier vor allem die Punktmutante DSD4<sup>H107V</sup>. Abschließend werden die für die Expressionsoptimierung erhaltenen Ergebnisse in Abschnitt 4.4 zusammengefasst und mit Hilfe im Schrifttum bekannt gewordenen Erkenntnissen weiter diskutiert.

### 4.1. **Grundlagen für die Expressionsoptimierung von DhaA, DSD4 und DSD49**

Der Industriepartner in diesem Projekt DOW Chemicals stellte zu Beginn der Projektarbeiten drei Haloalkan Dehalogenasen DhaA, DSD4 und DSD49 zur Verfügung. Die Proteine liegen mit 34,2 kDa, 32,5 kDa und 33,5 kDa für DhaA, DSD4 bzw. DSD49 in der gleichen Größenordnung. Die Gene dieser Haloalkan Dehaloge-

nasen werden zunächst in ein Rhamnose induzierbares Expressionssystem (Altenbuchner et al. 2000) kloniert. Die anfänglichen Expressionsversuche mit *E. coli* BW3110 bei 30 °C in LB-Medium zeigen, dass erhebliche Unterschiede sowohl hinsichtlich der Löslichkeit als auch in Bezug auf die exprimierte Proteinmenge zwischen der Haloalkan Dehalogenase DhaA aus *Rhodococcus rhodochrous* und den aus einem Bodenscreening stammenden Dehalogenasen DSD4 und DSD49, vorliegen. Das auf dem Plasmid pTST101 codierte Fusionsprotein MBP-GFP mit 69,3 kDa dient als Standard, zu dem die Expression der anderen Proteine in Relation gesetzt werden. Während DhaA relativ zu MBP-GFP 80 % bei einem löslichen Anteil von 55 % ausmacht, sind die Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 lediglich in sehr geringem Maße exprimiert, siehe Abbildung 4-1.

A)



B)

Protein	Expression relativ zum Standard (%)	Verhältnis (%)	
		Überstand	Pellet
MBP-GFP	100	86 ± 0,1	14 ± 0,1
DhaA	80 ± 2,1	45 ± 1,2	55 ± 1,2
DSD4	21 ± 3,2	70 ± 0,1	30 ± 0,1
DSD49	5 ± 1,4	77 ± 8,7	23 ± 8,7

Abbildung 4-1: Zusammenfassung der anfänglichen Expressionsstudien mit den *E. coli* Stämmen BW3110 pJOE4036 DhaA, pJOE4036 DSD4 und pJOE4036 DSD49 sowie BW3110 pTST101 bei 30 °C in LB-Medium. Das auf dem Plasmid pTST101 codierte Fusionsprotein MBP-GFP dient als Standard zu dem die Expression der anderen Proteine in Relation gesetzt wird. Dargestellt ist A) eine SDS-PAGE mit den jeweiligen löslichen und unlöslichen Fraktionen des Zellaufschlusses nach 6 h Induktionszeit. M: Proteinmarker; ÜB/P: Überstand- und

Pellet Fraktion des Rohextraktes der vier Stämme. B) zeigt einen Vergleich einzelner Expressionsniveaus in Relation zu dem Standard Protein MBP-GFP in tabellarischer Form, wie sie aus der densitometrischen Analyse der SDS-PAGE hervorgehen.

Das Rhamnose induzierbare Expressionssystem *rha*<sub>BAD</sub> in Kombination mit dem Wirtstamm *E. coli* BW3110 stellt für die Haloalkan Dehalogenase DhaA ein geeignetes System dar, um diese in ausreichenden Mengen zu produzieren. Aufgrund dessen wird DhaA bzw. DhaA<sup>CYF</sup>, parallel zur Expressionsoptimierung von DSD4 und DSD49, dazu genutzt die nachfolgenden Produktions- und Aufarbeitungsschritte des Proteins zu etablieren. Die Doppelmutante DhaA<sup>CYF</sup> wurde vom Institut für Technische Biochemie zur Verfügung gestellt und zeichnet sich durch eine zweifach höhere Aktivität gegenüber DhaA aus. Dies ist aus prozesstechnischen Gründen für die Biotransformation von Vorteil.

### 4.1.1. Haloalkan Dehalogenase DhaA

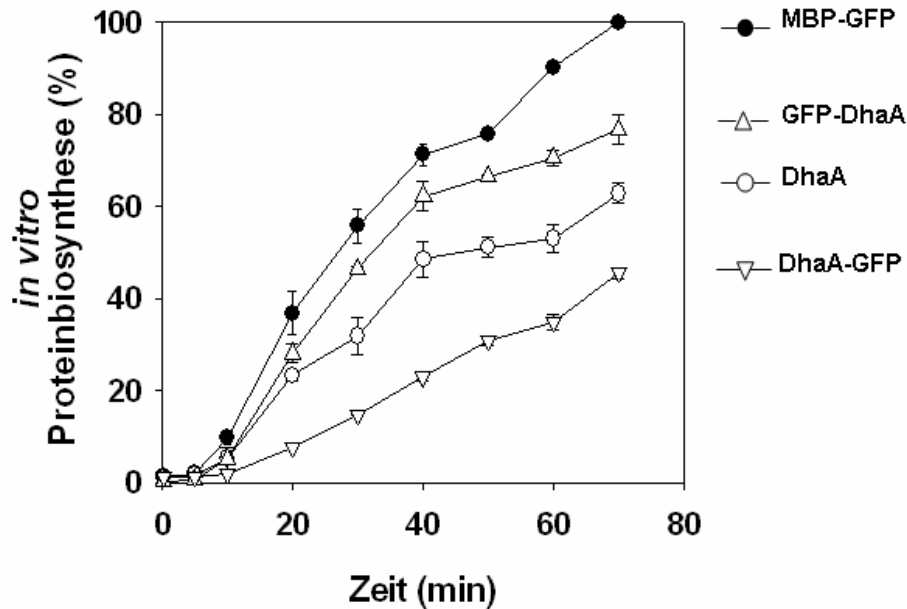
Eine Voruntersuchung des Expressionsverhaltens rekombinanter Proteine erfolgt über *in vitro* Synthesen. Diese Methode in Kombination mit der Berechnung von „folding indices“ (Arnold 2003) ermöglicht es mit wenig Zeitaufwand unterschiedliche Konstrukte rekombinanter Proteine in fusionierter und unfusionierter Form zu untersuchen. Hierdurch werden wesentlich zeitintensivere *in vivo* Versuche umgangen. Um ein für den Produktions- und Aufreinigungsprozess geeignetes Konstrukt zu finden, wird ein solches *in vitro* Screening für DhaA Konstrukte durchgeführt. Dieses sollte mehrere Eigenschaften in sich vereinen:

- (1) Der Anteil des rekombinanten Proteins am Gesamtprotein soll mindestens 30 % betragen.
- (2) Das Protein muss in löslicher Form vorliegen.
- (3) Eine einfache Detektion während des Produktions- und Aufarbeitungsprozesses soll möglich sein.

Da der angewandte Aktivitätstest mit anschließender GC-Analytik für Haloalkan Dehalogenasen zeitintensiv ist, wird für die Validierung des Produktions- und Aufreinigungsprozesses auf GFP Fusionsproteine zurückgegriffen, deren Detektion über Fluoreszenzsonden auf schnelle und einfache Weise durchzuführen ist. Für das *in vitro* Screening wird sowohl DhaA als auch DhaA mit N- und C-terminal fusionier-

tem GFP genutzt. Die Ergebnisse der *in vitro* Synthese sind in Abbildung 4-2 dargestellt.

A)



B)

mRNA	„folding index“ $f_{T7}$ (-)	<i>in vitro</i> Expression relativ zum Standard (%)	<i>in vivo</i> Expression relativ zum Standard (%)
<i>malE-gfp</i>	0,91	100	100
<i>dhaA</i>	0,48	62,8 ± 2,2	80,0 ± 2,1
<i>gfp-dhaA</i>	0,57	76,7 ± 3,1	72,0 ± 1,4
<i>dhaA-gfp</i>	0,26	45,5 ± 1,2	43,6 ± 2,1

Abbildung 4-2: **Ergebnisse des *in vitro* Screenings.** Die Aufnahme der *in vitro* Proteinbiosynthese der einzelnen Proteine findet über eine radioaktiv markierte Synthese statt. Dargestellt ist A) die prozentual synthetisierte Menge der rekombinanten Proteine relativ zu dem als Standard eingesetzten Protein MBP-GFP (pTST101) über der Zeit. Aufgetragen sind DhaA (pJOE4036 DhaA), GFP-DhaA (pJOE4056 GFP-DhaA) und DhaA-GFP (pJOE4056 DhaA-GFP). Abbildung 4-2 B) zeigt in tabellarischer Form Ergebnisse der *in vitro* Synthesen und *in vivo* Expressionsstudien einschließlich der „folding indices“. Die *in vivo* Expressionsstudien werden in LB-Medium bei 30 °C und einer Induktionszeit von 6 h innerhalb des Wirtsstamms *E. coli* BW3110 durchgeführt. Die Berechnung der „folding indices“ erfolgte über das Programm *m-fold* (Mathews et al. 1999; Zuker 2003) und mit der in Abschnitt 3.4.1 angegebenen Formel.

Die Ergebnisse der *in vitro* Synthese korrelieren sowohl mit den berechneten „folding indices“ als auch mit den ausgeführten *in vivo* Versuchen. Eine SDS-PAGE Analyse (nicht gezeigt) der *in vitro* Synthese zeigt, dass alle synthetisierten Proteine zu > 95 % in löslicher Form vorliegen. Dennoch gibt es erhebliche Unterschiede in der Menge an synthetisiertem Protein, was sich im „folding index“ widerspiegelt. Das Fusionsprotein GFP-DhaA besitzt ausgehend vom T7 Promotor mit 0,57 den höchsten „folding index“ und wird dementsprechend mit Anteilen von 76 % *in vitro* und 72 % in den *in vivo* Versuchen relativ zum Standardprotein MBP-GFP am besten exprimiert. Aufgrund dessen wird die N-terminale Fusion von DhaA mit GFP für die Etablierung des Produktions- und Aufarbeitungsprozesses herangezogen. Die Ergebnisse zu den Produktions- und Aufreinigungsprozessen der Haloalkan Dehalogenase sind in Kapitel 5 beschrieben.

#### 4.1.2. Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49

Da das Expressionsniveau der Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 in dem *E. coli* Stamm BW3110 mit 28 % bzw. 5 % relativ zum Standard MBP-GFP sehr gering ausfällt, wird zunächst nach besser geeigneten Expressionssystemen bzw. Expressionsbedingungen gesucht.

Homologie Recherchen hinsichtlich der Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz der Dehalogenasen DSD4 und DSD49 zeigen, dass die höchste Homologie zu der Haloalkan Dehalogenase LinB aus *Sphingomonas paucimobilis* (Accession No. AAX07227) vorliegt. DSD4 und DSD49 sind auf Seiten der Aminosäuresequenz zu 58 % bzw. 63 % identisch mit der Dehalogenase aus *S. paucimobilis* und zu 75 % bzw. 77 % homolog. Eine Stammbaumanalyse von DSD4 und DSD49 zu bekannten Haloalkan Dehalogenasen ist in Abbildung 4-3 dargestellt.

Anhand der Aminosäuresequenz von DSD4 und DSD49 wurde am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart eine rechnergestützte Modellierung der Proteinstrukturen durchgeführt (siehe z.B. Ergebnisse Seite 4-72). Die Modellierung wurde in Anlehnung an die Haloalkan Dehalogenase LinB mit dem Programm DSSP (Kabsch and Sander 1983) erstellt, da diese die höchste Sequenzhomologie zu DSD4 und DSD49 aufweist. Die Proteinstrukturen dieser Haloalkan Dehalogenasen lassen sich, wie in der Einleitung unter Abschnitt 1.1 für DhaA beschrieben, darstellen, das heißt es gibt strukturell bezüglich der Sekundärstrukturen und der Tertiärstruktur keine wesentlichen Unterschiede zwischen den betrachteten Dehalogenasen. Die geringere Löslichkeit sowie das geringe Expressionsniveau von DSD4



und DSD49 gegenüber DhaA kann daher in partikulären Aminosäuren oder in der Nukleinsäuresequenz hinsichtlich einzelner Codons begründet sein.

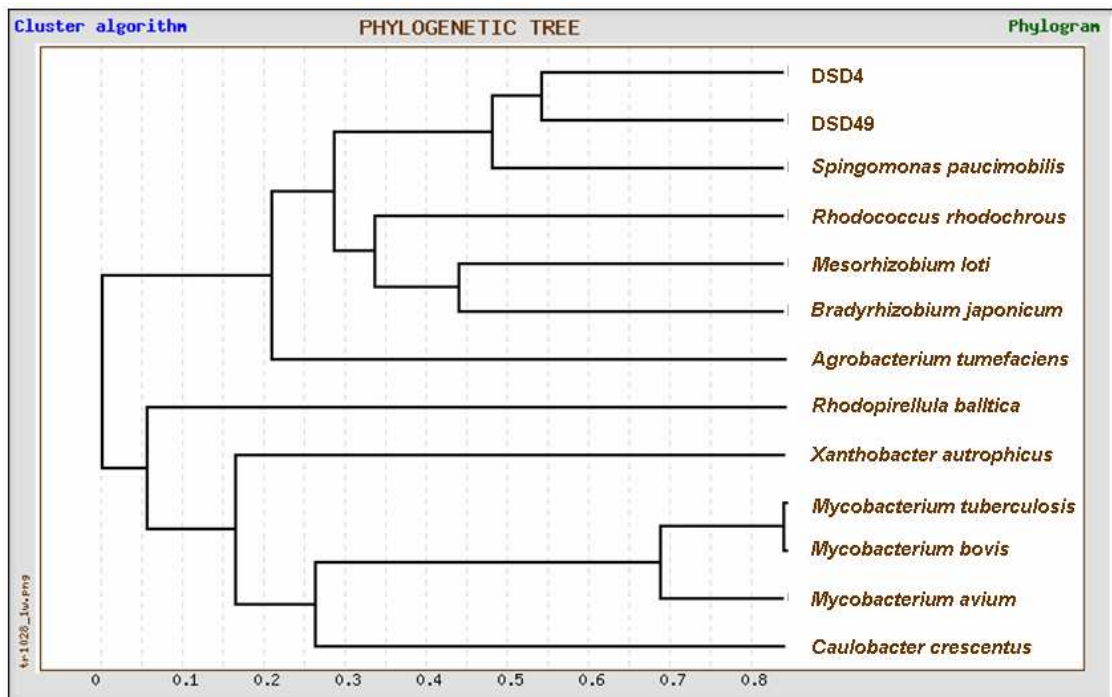


Abbildung 4-3: **Stammbaumanalyse ausgewählter Haloalkan Dehalogenasen.** Die phylogenetische Verknüpfung der Haloalkan Dehalogenasen wurde über die Internetseite <http://www.genebee.msu.su> (Stand Januar 2006) angefertigt (Brodsky et al. 1992). Der Stammbaum wird auf Basis der Aminosäuresequenzen der einzelnen Haloalkan Dehalogenasen erstellt. *Sphingomonas paucimobilis* (Accession (AC) No. P51698); *Rhodococcus rhodochrous* (AC No. POA3G2); *Mesorhizobium loti* (AC No. Q98C03); *Bradyrhizobium japonicum* (AC No. P59337); *Agrobacterium tumefaciens* (AC No. Q8U671); *Rhodopirellula baltica* (AC No. Q7UF99); *Xanthobacter autrophicus* (AC No. P22643); *Mycobacterium tuberculosis* (AC No. Q50670); *Mycobacterium bovis* (AC No. CAD94795); *Mycobacterium avium* (AC No. Q93K00); *Caulobacter crescentus* (AC No. NP\_419991)

Im Folgenden wird eine Optimierung der heterologen Proteinexpression für DSD4 und DSD49 auf Grundlage experimenteller Ansätze durchgeführt. Über modellgestützte Betrachtungen werden anschließend Ursachen für die Verringerung der *in vivo* Proteinfaltung von DSD4 herausgearbeitet. Hierbei steht die am Institut für Technische Biochemie stammende modifizierte Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> im Vordergrund. In den nachfolgenden Abschnitten werden die unterschiedlichen Ansätze näher erläutert und die Ergebnisse anhand von Literaturdaten diskutiert.

## **4.2. Experimentelle Ansätze zur Optimierung der Proteinexpression**

In der Literatur sind auf experimenteller Ebene eine Vielzahl von Methoden beschrieben, um die Proteinexpression zu verbessern und die Bildung von „Inclusion bodies“ (IB) herabzusetzen (Makrides 1996). Diese Methoden beruhen auf experimentellen Veränderungen während der heterologen Proteinsynthesephase oder auf generellen Veränderungen hinsichtlich des Wirtsorganismus bzw. des Expressionssystems. Zusammenfassend lassen sich diese Ansätze in sechs Gruppen unterteilen:

- (1) Eine Verringerung der Proteinbiosyntheserate (Goldstein and Doi 1995; Vasina and Baneyx 1997),
- (2) eine Veränderung der Nährmediumszusammensetzung (Blackwell and Horgan 1991; Barth et al. 2000),
- (3) die Co-Expression von Molekularen Chaperonen (Widersten 1998),
- (4) die Synthese des rekombinanten Proteins in den periplasmatischen oder extrazellulären Raum (He et al. 2002; Choi and Lee 2004),
- (5) Expression in unterschiedlichen Wirtsstämmen (Jana and Deb 2005) und
- (6) die Synthese des Enzyms als Fusionsprotein (Davis et al. 1999).

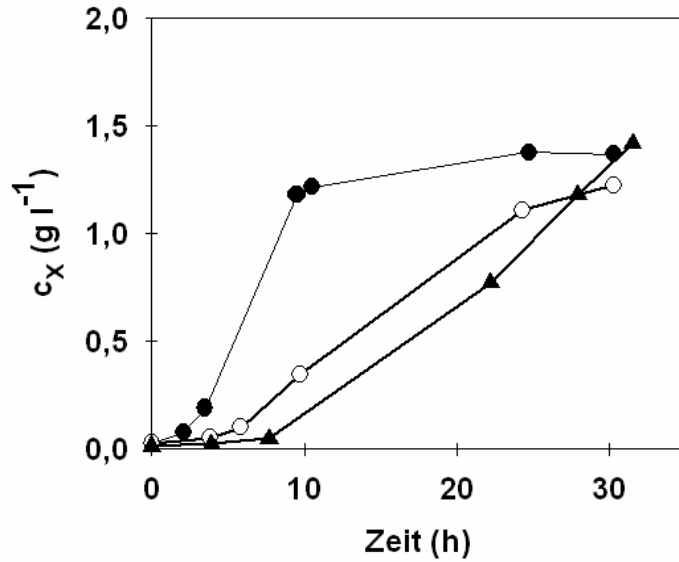
Innerhalb dieser Gruppen können wiederum eine Vielzahl von Ansatzmöglichkeiten unterschieden werden, welche die Bildung von Einschlusskörpern minimieren sollen. Die Ansatzpunkte, die beispielsweise mit einer Verringerung der Proteinsyntheserate arbeiten, eine Veränderung der Nährmediumszusammensetzung durchführen, unterschiedliche Wirtsstämmen einsetzen oder auch Ansätze in denen eine Synthese von Fusionsproteinen durchgeführt wird, werden auf die Expressionsproblematik von DSD4 und DSD49 übertragen und sind in den nachfolgenden Abschnitten dargestellt.

### **4.2.1. Verringerung der Proteinbiosyntheserate**

Eine Herabsetzung der Biosyntheserate des gesamten Organismus kann beispielsweise über eine verringerte Kultivierungstemperatur erzielt werden. Die Verringerung der spezifischen Wachstumsrate des Organismus ist eine der gängigsten Methoden, um die Synthese des rekombinanten Proteins in eine lösliche und aktive Form zu verschieben (Vasina and Baneyx 1997). Hierbei sind zwei gegenläufige Vorgänge zu berücksichtigen. Mit zunehmender Verringerung der Kultivierungstemperatur verschiebt sich die Synthese des rekombinanten Proteins zwar in Richtung der löslichen Phase, allerdings wird auch die Gesamtmenge des synthetisierten

Proteins erheblich herabgesetzt. Zusätzlich verlängert sich der Gesamtprozess durch die geringer werdende maximale spezifische Wachstumsrate des Organismus. Dies ist anhand der Expressionsversuche von GFP-DSD49 in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen in Abbildung 4-4 dargestellt.

A)



B)

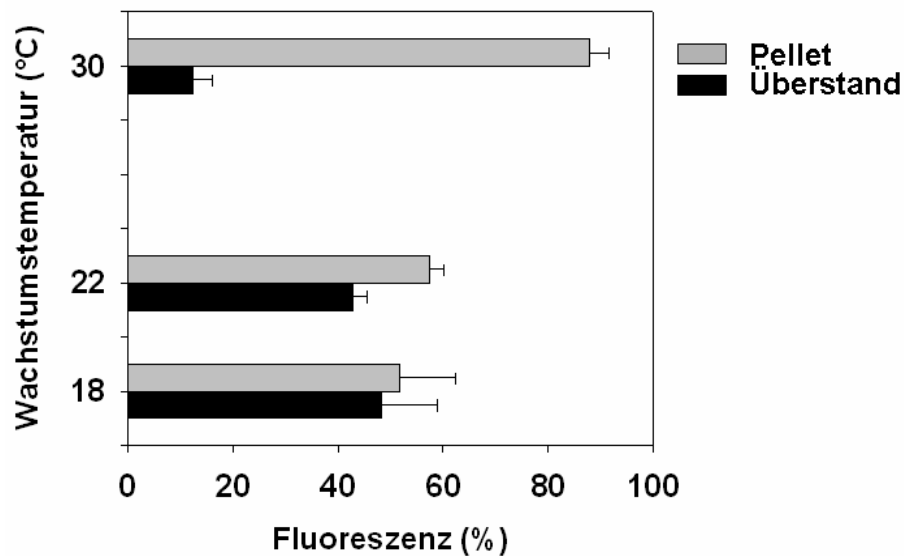


Abbildung 4-4: **Kultivierung von *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) pJOE4056 GFP-DSD49 bei verschiedenen Wachstumstemperaturen in LB-Medium.** Dargestellt sind A) die Ergebnisse der Wachstumsversuche bei 30°C (-●-), 22°C (-○-) und 18°C (-▲-), und B) die sich aus den Fluoreszenzdaten ergebenden Anteile des rekombinanten Proteins in der löslichen (■) und unlöslichen (■) Fraktion des Zellaufschlusses.

Aus Abbildung 4-4 wird deutlich, dass die Verringerung der maximalen spezifischen Wachstumsrate des Organismus zu einer erhöhten Löslichkeit des Zielproteins von 15 % auf 55 % führt. In diesem Beispiel wird die maximale spezifische Wachstumsrate des Mikroorganismus von  $\mu_{max} = 0,6 \text{ h}^{-1}$  bei 30 °C auf  $\mu_{max} = 0,2 \text{ h}^{-1}$  bei 18 °C herabgesetzt. Gleichzeitig sinkt mit steigender Löslichkeit die Produktmenge des rekombinanten Proteins in den Ansätzen. Die erhöhte Löslichkeit des rekombinanten Proteins kann zum einen auf die, bei niedrigeren Temperaturen verminderten hydrophoben Wechselwirkung zurückzuführen sein (Kiefhaber et al. 1991), zum anderen auch auf die geringere Konzentration des im Zytoplasma angereicherten rekombinanten Proteins. Unter Produktionsbedingungen lassen sich zwar niedrige Kultivierungstemperaturen z.B. 22 °C realisieren, allerdings verlängert sich dadurch der Fermentationsprozess und der Produktionsmaßstab muss durch die geringe Produktbildung erhöht werden.

Eine weitere Herangehensweise ist die spezifische Reduktion der Biosyntheserate des rekombinanten Proteins. Dies erfolgt durch den Einsatz von ‚schwachen‘ Promotoren, durch eine Herabsetzung der Induktorkonzentration oder über Promotoren, die eine Grundexpression bereits vor Induktor Zugabe aufweisen. Ein Beispiel für diese Art von Promotoren ist der *trc*-Promotor. Der *trc*-Promotor ist ein *trp-lac* Hybridpromotor, der die -35 Region des *trp*- und die -10 Region des *lacUV5*- Promoters beinhaltet. Der Promotor wird über den so genannten *lac* Repressor reguliert und ist unabhängig von der cAMP/crp Regulation (Amann et al. 1983). Das System ist mit dem Induktor Isopropylthio- $\beta$ -D-galactosid (IPTG) induzierbar, hat aber den Nachteil, dass bereits vor Induktion eine Basisexpression des rekombinanten Proteins vorhanden ist. Die dazugehörigen Expressionsvektoren sind kommerziell von der Firma Amersham Pharmacia Bioscience (Upsala, Schweden) erhältlich. Das Gen der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> wurde in dieses System kloniert und in dem Wirtstamm *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass das rekombinante Protein zu 30 % in löslicher Form vorliegt, allerdings nur 15 % des Gesamtproteins ausmachte. Bezeichnend ist, dass lediglich vor der Induktion mit IPTG das rekombinante Protein löslich synthetisiert wird. Dies lässt darauf schließen, dass eine erhöhte Translationsgeschwindigkeit während der Induktionsphase oder die schnell zunehmende Proteinkonzentration des rekombinanten Proteins im Zytoplasma einen Einfluß auf die Bildung von Einschlusskörpern hat.

#### 4.2.2. Mediumszusätze während der Kultivierung von Mikroorganismen

In der Literatur sind oftmals Substanzen beschrieben, die sich während der Proteinsynthese positiv auf die Löslichkeit rekombinanter Proteine auswirken. Dabei handelt es sich um die unterschiedlichsten Arten von Molekülen und Ionen:

- Zugabe von Prothetischen Gruppen oder Co-Faktoren (Weickert et al. 1999; Yang et al. 2003),
- Zugabe von geringen Mengen Glucose, um eine Induktion des *lac* Promotors zu verhindern,
- Zugabe von Polyolen und Methylaminen (Caldas et al. 1999; Barth et al. 2000; Bourot et al. 2000),
- Zugabe von Ethanol, niedermolekularen Thiolen oder von Natriumchlorid (Barth et al. 2000; Diamant et al. 2001).

Arbeiten von Weikert (Weickert et al. 1999) und Yang (Yang et al. 2003) beschäftigen sich mit dem Einsatz von Co-Faktoren zur Verbesserung der *in vivo* Proteinfaltung. Für die Gruppe der Haloalkan Dehalogenasen sind weder Co-Faktoren noch Prothetische Gruppen beschrieben (<http://www.brenda.uni-koeln.de/>), weshalb eine Zugabe dieser Substanzen zur Enzymstabilisierung, als nicht sinnvoll erscheint. Ansätze, bei denen durch Zugabe von Glucose eine Basisexpression verhindert werden soll, spielt im vorliegenden Fall ebenfalls keine Rolle, da an Stelle eines *lac* Promotors mit einem doppelt positiv regulierten *rha<sub>BAD</sub>* - Promotor gearbeitet wird. Die in der Aufzählung zuletzt genannten Maßnahmen beschäftigen sich mit einer Gruppe von Substanzen, die als chemische Chaperone zusammengefasst werden können.

Chemische Chaperone sind niedermolekulare Stoffe, die Proteine *in vitro* in ihrer nativen Form stabilisieren und sie vor Denaturierung und Aggregation schützen (Ou et al. 2001). Wie viele molekulare Chaperone zeigen auch chemische Chaperone eine geringe Spezifität und erleichtern die Faltung einer Vielzahl von Proteinen. Um effizient wirken zu können, müssen chemische Chaperone allerdings im millimolaren Bereich vorliegen (Kolter and Wendeler 2003). Der Einfluss von chemischen Chaperonen auf die Bildung von „Inclusion bodies“ wird nachfolgend näher untersucht, wobei die Auswirkungen von Sorbitol und NaCl auf die Proteinlöslichkeit von GFP-DSD4<sup>H107V</sup> im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stehen. Die Erhöhung der Osmolarität des Kultivierungsmediums durch NaCl wird durchgeführt, um die Per-

meabilität der Zellen für die chemischen Chaperone zu erhöhen. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Sorbitol in Verbindung mit einem osmotischen Schock und verringerter Kultivierungstemperatur die Löslichkeit des Fusionsproteins GFP-DSD4<sup>H107V</sup> von 5 % auf 80 % steigert. Über die Durchführung von Kontrollansätzen kann ausgeschlossen werden, dass diese starke Erhöhung der Löslichkeit allein auf die Absenkung der Temperatur oder allein auf die Zugabe von NaCl zurückzuführen ist.

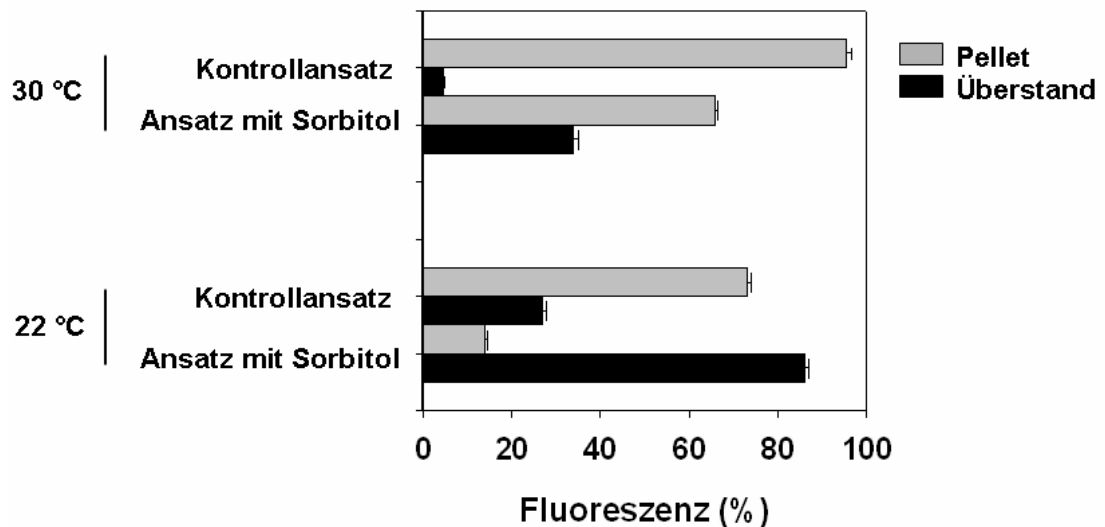


Abbildung 4-5: **Prozentuale Verteilung der Haloalkan Dehalogenase GFP-DSD4<sup>H107V</sup> in der löslichen und unlöslichen Fraktion des Zellrohextrakts.** *E. coli* BL21(rha-) GFP-DSD4<sup>H107V</sup> wird in LB-Medium mit 0,8 M NaCl bei 30 °C und 22 °C ohne und mit Zugabe von 0,5 M Sorbitol kultiviert. Der Anteil der löslichen Haloalkan Dehalogenase wird nach dem Zellaufschluss über Fluoreszenzmessungen bestimmt.

Durch die erhöhte Osmolarität des Kultivierungsmediums sowie durch den Einsatz von chemischen Chaperonen und der Absenkung der Kultivierungstemperatur wird die spezifische Wachstumsrate des in den Versuchen eingesetzten *E. coli* Stamms erheblich vermindert. Einhergehend mit einer verringerten spezifischen Wachstumsrate sinkt auch die Proteinbiosyntheserate des Mikroorganismus (Shin et al. 1998; Sanden et al. 2003), was sich positiv auf die Konformationsfindung des rekombinanten Proteins auswirken kann. Unter diesem Gesichtspunkt lässt sich zunächst die Erhöhung der Löslichkeit der Haloalkan Dehalogenase auf eine geringere Proteinbiosyntheserate zurückführen.

In den Versuchsreihen bei 26 °C liegt, bedingt durch die Temperatur und die hohe Osmolarität des Mediums, die maximale spezifische Wachstumsrate in allen Ansätzen zwischen  $\mu_{max} = 0,13$  und  $0,15 \text{ h}^{-1}$ . Dennoch variiert der Anteil des löslichen re-

kombinanten Proteins zwischen 10 % und 50 % ohne bzw. mit chemischen Chaperonen, weshalb die erhöhte Löslichkeit mit der als chemisches Chaperon bekannten Substanz Sorbitol in Verbindung steht. Der genaue Wirkungsmechanismus von chemischen Chaperonen ist noch weitestgehend unbekannt. Zum einen wird eine direkte Interaktion der chemischen Chaperone mit dem rekombinanten Protein postuliert (Barth et al. 2000), zum anderen werden auch Polyolen wie Glycerin zugeschrieben indirekt die relative Hydratation um die synthetisierten Polypeptide zu erhöhen und so die Selbstassoziation des Proteins zu fördern (Welch and Brown 1996).

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die extremen Kultivierungsbedingungen zu einer globalen Stressantwort führen, die anhand einer filamentösen Morphologie der Zellen während der Kultivierung zu erkennen ist (Linn and Imlay 1987; Mattick et al. 2003). Die hohe Osmolarität des Kultivierungsmediums löst innerhalb der Zelle die Expression der unter der Kontrolle des  $\sigma^S$  Faktor stehenden Gene aus (Bianchi and Baneyx 1999; Kagawa and Cao 2001). Die Untereinheit der RNA-Polymerase spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Transkription, während der stationären Phase und bei osmotischem Stress. Das veränderte Transkriptions- und Translationsmuster der Zelle kann sich ebenfalls auf die Faltung des rekombinanten Proteins auswirken. Die in Abbildung 4-5 gezeigten Versuche zeigen außerdem, dass osmotischer Stress bzw. die bei diesem Stimuli aktivierte Stressantwort alleine nicht ausreichend ist, um die Löslichkeit des rekombinanten Proteins signifikant zu steigern. Da in den beschriebenen Versuchsreihen mehrerer Faktoren variiert werden, ist die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins als ein kumulativer Effekt anzusehen und lässt sich nicht an einzelnen Parametern, wie der Kultivierungstemperatur, der Zugabe von Sorbitol oder NaCl, festmachen.

### **4.2.3. Einsatz von unterschiedlichen Wirtsorganismen**

#### **4.2.3.1. *Escherichia coli***

Einer der gängigsten und am häufigsten genutzten Mikroorganismen zur Produktion von rekombinanten Proteinen ist das gram negative Bakterium *Escherichia coli*. In dieser Arbeit werden auf das Expressionssystem abgestimmte Stämme eingesetzt. Sowohl *E. coli* BW3110 als auch *E. coli* BL21(*rha*<sup>-</sup>) weisen hinsichtlich der Verstoffwechslung des Induktors Rhamnose eine Defizienz auf. Hierfür wurde das Gen der Rhamnulose-Kinase (*rhaB*) am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart ausgeknockt (Wilms et al. 2001). Die *E. coli* Stämme gehören zwei generell unterschiedlichen Spezies an. *E. coli* BW3110 ist ein K12 Derivat und geht direkt aus dem Stamm W3110 hervor. Demgegenüber ist *E. coli* BL21 (*rha*<sup>-</sup>) ein so genanntes

B Derivat von *Escherichia coli* und geht auf den Stamm *E. coli* BL21 zurück, der für die Proteasen OmpT (outer membrane protease) und Lon defizient ist.

Zum Vergleich der beiden Expressionsstämme werden unterschiedliche Haloalkan Dehalogenasen über das Rhamnose induzierbare System bei 30 °C und 22 °C in LB-Medium exprimiert. In Abbildung 4-6 sind an der Expression der Haloalkan Dehalogenase DSD49, die mit einem Fluoreszenzmarker (GFP) fusioniert ist, beispielhaft die Unterschiede der beiden Rhamnose defizienten Expressionsstämme aufgezeigt.

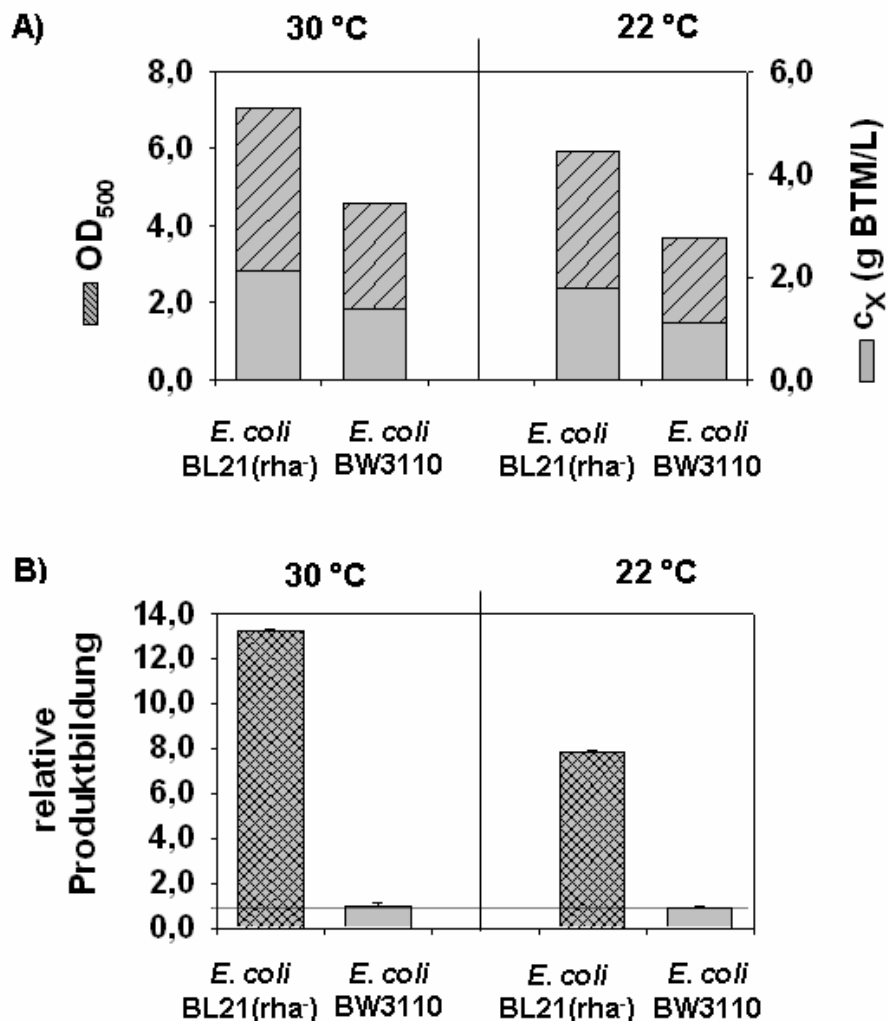


Abbildung 4-6: **Kultivierung von unterschiedlichen *E. coli* Wirtsorganismen zur heterologen Expression der Haloalkan Dehalogenase GFP-DSD49 in LB-Medium bei 30 °C und 22 °C.** Dargestellt ist A) die erreichte Zelldichte ( $OD_{500}$ ) bzw. die Biomassekonzentration ( $c_x$ ) am Ende der Kultivierung der *E. coli* Stämme BL21(rha-) pJOE4056 GFP-DSD49 und BW3110 pJOE4056 GFP-DSD49. Die Abbildung 4-6 B) zeigt die relative Produktbildung innerhalb der einzelnen Ansätze bezogen auf die Produktbildung des *E. coli* Stamms BW3110 pJOE4056 GFP-DSD49 bei 30 °C, die gleich eins gesetzt wird.



Als Fazit aus diesen Versuchen bleibt, dass *E. coli* BL21(rha) eine leicht höhere maximale spezifische Wachstumsrate aufweist als BW3110, und dass dieser Stamm im Schüttelkolben innerhalb der gleichen Zeit auf 1,5-fach so hohe Zelldichten anwächst. Dies resultiert in einer durchschnittlich zehnfachen Erhöhung der rekombinanten Produktkonzentration bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C. Die Abbildung 4-7 zeigt einen direkten Vergleich der Expressionsstämme bzw. der innerhalb dieser synthetisierten rekombinanten Proteine MBP-GFP und GFP-DSD49. Setzt man das Expressionsniveau von GFP-DSD49 in Relation zu dem Standardprotein MBP-GFP, so wird deutlich, dass sich die Expression des rekombinanten Proteins in dem Wirtsorganismus *E. coli* BL21(rha) gegenüber BW3110 erheblich verbessert hat.

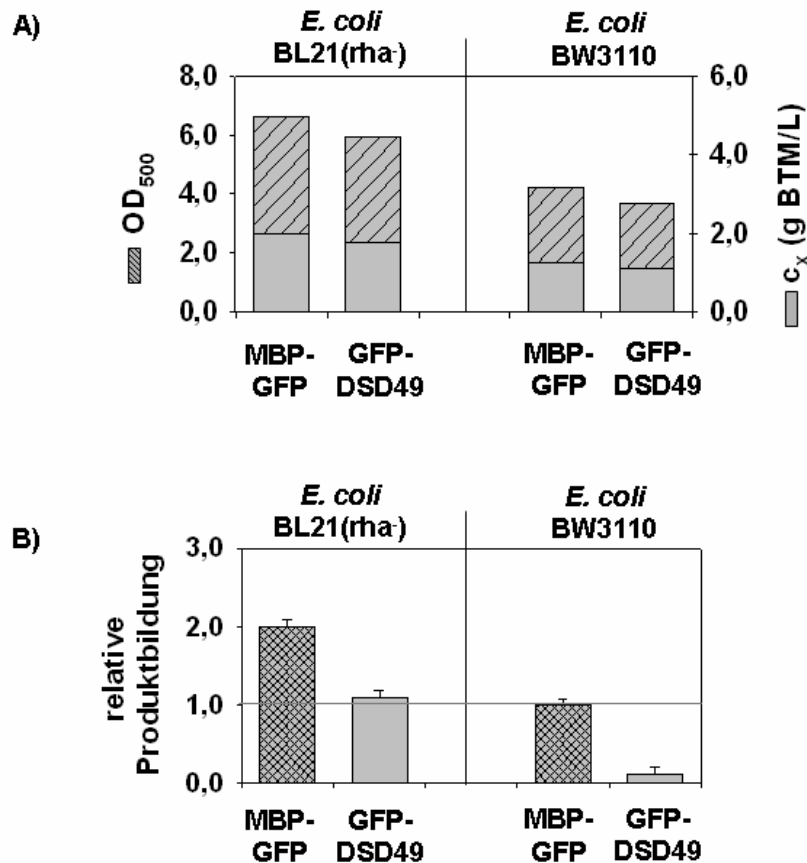


Abbildung 4-7: Vergleich der Expressionsstämme *E. coli* BL21(rha) und *E. coli* BW3110 während der Expression des als Standard genutzten Proteins MBP-GFP und der Haloalkan Dehalogenase GFP-DSD49. Die Kultivierung wird in LB-Medium bei 22 °C durchgeführt. Dargestellt sind A) die erreichten Zelldichten ( $OD_{500}$ ) bzw. die Biomassekonzentrationen ( $c_x$ ) nach einem Kultivierungszeitraum von 24 h und B) die relative Produktbildung der heterologen Proteine MBP-GFP und GFP-DSD49. Bezugspunkt ist die in *E. coli* BW3110 bei 22 °C synthetisierte Menge des Standardproteins MBP-GFP, welche auf eins gesetzt wird.

Die relative Produktbildung der Haloalkan Dehalogenase GFP-DSD49 konnte in dem Wirtstamm *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) deutlich verbessert werden. Als Bezugspunkt für die Darstellung wird das in *E. coli* BW3110 synthetisierte Standardprotein MBP-GFP gewählt, dessen gebildete Produktmenge auf 1 festgesetzt wird. Relativ hierzu ist die Produktmenge der Haloalkan Dehalogenase von 0,12 in *E. coli* BW3110 auf 1,1 in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) gesteigert worden.

Aus Tabelle 4-1 ist abzulesen, dass der Wechsel des Wirtsorganismus im Fall des Fusionsproteins MBP-GFP keine signifikante Auswirkung auf die Löslichkeit des Proteins hat. Sowohl in *E. coli* BW3110 als auch in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) wird das als Standard genutzte Protein bis zu 80 % in löslicher Form exprimiert. Aufgrund der sehr geringen gebildeten Produktmenge bei der Expression der Haloalkan Dehalogenase GFP-DSD49 in *E. coli* BW3110 beträgt der prozentuale Anteil des löslichen Proteins etwa 70 %. Dieser Anteil sinkt bei der Expression in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) auf 20 % ab. Dabei bewirkt eine Erhöhung der Produktmenge in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) um den Faktor zehn, eine Steigerung des löslichen, aktiven Enzyms um den Faktor drei.

Tabelle 4-1: **Relative Produktbildung der Haloalkan Dehalogenase GFP-DSD49**, die in Relation zu dem in dem jeweiligen Wirtstamm gebildeten Standardprotein MBP-GFP gesetzt wird. Zudem sind die prozentualen Anteile der löslichen und unlöslichen rekombinanten Proteine aufgezeigt.

	Expression relativ zum Standard (-)	Verhältnis (%)	
		Überstand	Pellet
<i>E. coli</i> BW3110			
MBP-GFP	1,0	67 ± 5,1	33 ± 5,1
GFP-DSD49	0,12	72 ± 0,5	28 ± 0,5
<i>E. coli</i> BL21(rha <sup>-</sup> )			
MBP-GFP	1,0	94 ± 4,7	6 ± 4,7
GFP-DSD49	0,55	17 ± 3,2	83 ± 3,2

Bereits Seo (Seo et al. 2003) konnte zeigen, dass sich *E. coli* BL21 gegenüber anderen Produktionsstämmen durch ein höheres Expressionsniveau heterologer Proteine auszeichnet. In ihren Versuchen liegt die spezifische Proteinmenge des heterologen Modellproteins GFP innerhalb des Wirtsorganismus BL21 um ein 3-faches höher als in dem zum Vergleich stehenden *E. coli* K12 Derivat JM105. Außerdem wird in dieser Veröffentlichung gezeigt, dass das Ausmaß der zellulären Stressantwort erheblichen Einfluss auf die Menge des heterolog exprimierten Proteins hat.

Unter den ausgewählten *E. coli* Stämmen wie *E. coli* JM105, TOP10 und HB101, ist *E. coli* BL21 derjenige Stamm, bei dem die zelluläre Stressantwort, wiedergegeben durch die Aktivierung der Gene des Transkriptionsfaktors  $\sigma^{32}$ , der Proteaseuntereinheit *cipB* und des Chaperons *dnaK*, am geringsten ausfällt und dadurch bedingt das höchste Expressionsniveau für das Modellprotein GFP zeigt. Übereinstimmend mit Daten von Shiloach (Shiloach et al. 1996) und van de Walle (van de Walle and Shiloach 1998), zeigt Abbildung 4-6, dass *E. coli* BL21 im Vergleich zu dem *E. coli* K12 Derivat BW3110 eine doppelt so hohe Zelldichte erreicht. Die höheren Zelldichten werden in diesen Literaturquellen auf eine verringerte Akkumulation des Wachstumsinhibitors Acetat zurückgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass im Fall von *E. coli* BL21 eine hohe Glucosekonzentration die Aktivierung des Glyoxylat Stoffwechsels zur Folge hat, was eine Erklärung für die geringere Acetat Akkumulation sein kann.

#### 4.2.3.2. *Pseudomonas putida*

Anhand der Aminosäuresequenz Analyse, die in Abschnitt 4.1.2 gezeigt ist, wird deutlich, dass auf Grund der Sequenzhomologien neben der Expression in dem Wirtstamm *E. coli* ebenso eine Produktion von DSD4 und DSD49 in *Sphingomonas sp.* bzw. *Pseudomonas sp.* in Frage kommt. Neben der Aminosäuresequenz wird im folgenden Abschnitt vor allem die Nukleinsäuresequenz in Betracht gezogen. Der sogenannte *codon adaption index (CAI)* wurde erstmals von Sharp und Li (Sharp and Li 1987) eingeführt. Dieser Index ist ein Maß dafür, wie gut die Codons innerhalb eines spezifischen Gens mit den genutzten Codons aus einem Satz von Referenzgenen übereinstimmt. Das heißt beispielsweise, wie gut die Nukleinsäuresequenz eines betrachteten Gens an die „codon usage“ des Wirtstamms angepasst ist. Der CAI kann über die folgende Formel berechnet werden:

$$CAI = \left( \prod W_k \right)^{1/L} \quad (4-1)$$

Hierbei ist  $W_k$  die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen eines Codons  $k$  innerhalb eines festgesetzten Referenzspektrums an Genen und  $L$  die Gesamtzahl der Codons innerhalb des Gens. Das Referenzspektrum an Genen für *E. coli* setzte sich bei Sharp und Li aus Genen von 17 ribosomalen Proteinen, vier Elongationsfaktoren, vier Membranproteinen, *recA* und *dnaK* zusammen. Heute wird der CAI mit  $W_k$  Werten ermittelt die sich aus der Gesamtheit aller bekannten Gene in *E. coli* ergeben. Werden in diesem Fall die CAI-Werte von DSD4 und DSD49 in Bezug auf die Wirtstämme *E. coli* W3110 und *P. putida* KT2440 betrachtet, so wird in Tabelle 4-2 deutlich, dass diese sich nur geringfügig unterscheiden. Nach den CAI-Werten zu

urteilen sollte, die in *P. putida* KT2440 synthetisierte Menge an rekombinantem Protein geringer ausfallen als in *E. coli* W3110.

Tabelle 4-2: **CAI-Werte ausgehend von der Nukleinsäuresequenz von DSD4 und DSD49 in Bezug auf die „codon usage“ von *E. coli* W3110 und *P. putida* KT2440.** Die Kalkulation der CAI Werte erfolgt nach Sharp (Sharp and Li 1987) mit Hilfe des Programms ‚CAI Calculator‘ (<http://www.evolvingcode.net/codon/cai> Januar 2006).

Haloalkan Dehalogenase	CAI-Wert	
	<i>Escherichia coli</i> W3110	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
DSD4	0,63	0,52
DSD49	0,64	0,60

Die heterologe Expression rekombinanter Proteine in dem Wirtsstamm *Pseudomonas putida* KT2440 wird am Beispiel der Haloalkan Dehalogenen DSD4<sup>H107V</sup> näher untersucht. Zu diesem Zweck ist das Gen der Haloalkan Dehalogenase in einen aus dem Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart, stammenden Expressionsvektor (pJOE4782.1) kloniert worden. Dieser Expressionsvektor bietet die Möglichkeit über einen Rhamnose induzierbaren Promotor sowohl in *P. putida* als auch in *E. coli* zu exprimieren, so dass ein direkter Vergleich zwischen den beiden Expressionsstämmen möglich ist. Die Expressionsstudien werden für beide Wirtsorganismen in LB-Medium bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C durchgeführt. Die Auswertung der SDS-PAGE ergibt keinen signifikanten Unterschied im Expressionsniveau der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> innerhalb der zwei Wirtsorganismen. *P. putida* wächst gegenüber *E. coli* zu höheren Zelldichten heran. Allerdings lässt sich aufgrund der fehlenden Korrelationen zwischen der Optischen Dichte und der Biotrockenmasse für *P. putida* kein Vergleich zwischen den weitaus aussagekräftigeren gebildeten Biotrockenmassen ziehen. Da auf das SDS-Gel immer dieselbe Menge an Gesamtprotein aufgetragen wird, kann daraus geschlossen werden, dass der prozentuale Anteil des rekombinanten Proteins am Gesamtprotein in beiden Wirtsorganismen in der gleichen Größenordnung liegt.

#### 4.2.4. Einsatz von Fusionsproteinen

Fusionsproteine werden oftmals genutzt um die Löslichkeit sowie die Ausbeute an rekombinantem Protein zu erhöhen. Aus der Literatur sind zahlreiche Fusionspartner bekannt, wobei der Einfluss des Fusionspartners auf die Proteinfaltung von Protein zu Protein sehr stark differieren kann (z.B. (Davis et al. 1999)). Im Fall von Dimer- oder Tetramer- Bildung von Enzymen kann ein Zusammenschluss mit höhermolekularen Tags oder Fusionsproteinen die Ausbildung der Quartärstruktur verhin-

dern. Die Folge ist der Verlust der Enzymaktivität. Bei der Klasse der Haloalkan Dehalogenasen handelt es sich um monomere, Co-Faktor unabhängige Enzyme, so dass ein Verlust der Enzymaktivität auf Grund einer verhinderten Quartärstrukturbildung vernachlässigt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wird sowohl eine Fusion der Haloalkan Dehalogenasen mit dem Maltosebinde Protein (MBP), als auch mit dem Grün fluoreszierenden Protein (GFP) (Cha et al. 2000) durchgeführt. Dabei sind die zunächst unterschiedlichen Intentionen der Fusionsproteine zu berücksichtigen. Während die Fusion mit MBP zu einer gesteigerten Löslichkeit des Proteins führen soll, ist die Fusion mit GFP bei der Validierung des Produktions- und Aufreinigungsprozesses von Vorteil. Das Protein GFP ermöglicht über seine Eigenfluoreszenz eine sehr einfache qualitative und quantitative Beurteilung von Expressionsversuchen, Fermentationen und Downstream Prozessen.

Über den „folding index“ der einzelnen Fusionsproteine kann tendenziell ermittelt werden, welcher Fusionspartner zu den höchsten Produktmengen führt. Ein Zusammenhang zwischen dem „folding index“ und der gebildeten Produktmenge des rekombinanten Proteins konnte bereits in Abschnitt 4.1.1 für die unterschiedlichen Fusionsproteine der Haloalkan Dehalogenase DhaA gezeigt werden. In der nachfolgenden Tabelle 4-3 sind die „folding indices“ der jeweiligen Fusionsproteine aufgeführt.

Tabelle 4-3: „Folding indices“ (*f*) der fusionierten und unfusionierten Haloalkan Dehalogenasen DSD49, DSD4 und DSD4<sup>H107V</sup>, die mit dem Programm *mfold* ermittelt wurden. Die Berechnungen basieren auf der mRNA der einzelnen Fusionsproteine, ausgehend von dem *in vivo* genutzten Rhamnose Promotor bis hin zur Transkriptionsterminationsregion. Zudem ist in der Tabelle der „folding index“ des als Standard genutzten Fusionsprotein MBP-GFP abgelegt.

mRNA	„folding index“ ( <i>f</i> )	m-RNA	„folding index“ ( <i>f</i> )
<i>malE-gfp</i>	0,83	<i>dsd4</i>	0,52
		<i>malE-dsd4</i>	0,65
		<i>gfp-dsd4</i>	0,65
<i>dsd49</i>	0,52	<i>dsd4</i> <sup>H107V</sup>	0,57
<i>malE-dsd49</i>	0,83	<i>malE-dsd4</i> <sup>H107V</sup>	0,70
<i>gfp-dsd49</i>	0,52	<i>gfp-dsd4</i> <sup>H107V</sup>	0,61

Aus den in Tabelle 4-3 bestimmten „folding indices“ ist zu erwarten, dass eine Fusion der Haloalkan Dehalogenasen mit den Proteinen MBP bzw. GFP eine Steigerung der Produktmenge zur Folge hat. Insbesondere die Fusion mit dem Maltosebinde-

protein zeigt in allen Fällen eine deutliche Erhöhung von  $f$ . Für den experimentellen Teil werden die jeweiligen Gene der Fusionsproteine zunächst in das Rhamnose-induzierbare Expressionssystem pJOE4036 bzw. pJOE4056 kloniert. Anschließend erfolgen Expressionsstudien in den Wirtsstämmen *E. coli* BW3110 bzw. *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>). Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse der Expressionsversuche ist in Tabelle 4-4 dargestellt. Zum Vergleich sind die Daten der unfusionierten Haloalkan Dehalogenasen ebenfalls in Tabelle 4-4 abgelegt.

Tabelle 4-4: **Zusammenfassung der Ergebnisse aus Expressionsstudien.** Die Expression der unterschiedlichen Fusionsproteine erfolgte innerhalb der Wirtsorganismen *E. coli* BW3110 bzw. *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>). Die Versuche werden in LB-Medium bei 30 °C durchgeführt, wobei die Induktion der heterologen Proteinexpression durch Zugabe von 0,2 % Rhamnose erfolgte. Die Produktbildung der einzelnen Haloalkan Dehalogenasen wird relativ zu dem Standardprotein MBP-GFP aus dem jeweiligen Wirtstamm in % angegeben.

Protein	Wirtstamm <i>E. coli</i>	Expression relativ zum Standard (%)	Verhältnis (%)	
			Überstand	Pellet
MBP-GFP	BL21 (rha <sup>-</sup> )	100	51,7 ± 10,2	48,3 ± 10,2
MBP-GFP	BW3110	100	86,6 ± 9,8	13,4 ± 9,8
DSD49	BW3110	8,3 ± 0,5	77,0 ± 8,7	23,0 ± 8,7
MBP-DSD49	BW3110	19,6 ± 1,2	27,8 ± 3,5	72,2 ± 3,5
GFP-DSD49	BW3110	27,8 ± 1,0	11,2 ± 1,3	88,8 ± 1,3
DSD4	BL21 (rha <sup>-</sup> )	53,3 ± 11,5	47,1 ± 10,1	52,9 ± 10,1
MBP-DSD4	BL21 (rha <sup>-</sup> )	75,3 ± 10,4	54,1 ± 0,3	45,9 ± 0,3
GFP-DSD4	BL21 (rha <sup>-</sup> )	60,7 ± 8,3	12,6 ± 10,2	87,4 ± 10,2
DSD4 <sup>H107V</sup>	BL21 (rha <sup>-</sup> )	47,4 ± 13,1	4,9 ± 2,2	95,1 ± 2,2
MBP-DSD4 <sup>H107V</sup>	BL21 (rha <sup>-</sup> )	97,8 ± 3,1	61,3 ± 12,3	38,7 ± 12,3
GFP-DSD4 <sup>H107V</sup>	BL21 (rha <sup>-</sup> )	65,1 ± 24,2	12,4 ± 8,6	87,6 ± 8,6

In Tabelle 4-4 ist die Produktbildung der rekombinanten Proteine relativ zu dem als Standard genutzten Protein MBP-GFP angegeben, wobei die Expression innerhalb des Wirtstamms *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) von der in *E. coli* BW3110 unterschieden wird. Die mit dem Maltosebindeprotein fusionierten Haloalkan Dehalogenasen weisen durchgehend die höchsten „folding indices“ auf. Diese erhöhte Produktbildung des rekombinanten Proteins durch die Fusion mit MBP ist auch in den experimentellen Ansätzen wieder zu finden. Insbesondere die Punktmutante der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> weist sowohl innerhalb des „folding index“ als auch in den *in vivo* Expressionsstudien relativ zum Standard, im unfusionierten Zustand mit  $f = 0,57$  und 57 % Expression bzw. in der Fusion mit MBP mit  $f = 0,7$  und einer Produktbildung von 97 %, eine deutliche Steigerung auf. Betrachtet man das Verhältnis zwi-

schen der in der löslichen Fraktion enthaltenen aktiven Haloalkan Dehalogenase und des inaktiven Enzyms, so ist keine generelle Tendenz erkennbar. Beispielsweise bewirkt im Fall der Haloalkan Dehalogenase DSD4 die Fusion mit GFP, dass der lösliche Anteil des rekombinanten Proteins von 50 % im unfusionierten Zustand, auf 10 % in der Fusion mit GFP absinkt. Demgegenüber wird der lösliche Anteil der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> über die Fusion mit MBP von 5 % auf 75 % erhöht.

Bei der in diesem Abschnitt beschriebenen Herangehensweise zur Beeinflussung der Löslichkeit von rekombinanten Proteinen wie auch der Produktbildung während der heterologen Proteinexpression, muss beachtet werden, dass sich über die Bildung von Fusionsproteinen die Menge des eigentlichen Zielproteins, bei gleicher Größe bezüglich des Fusionspartners, halbiert. Eine Fusion der Haloalkan Dehalogenase ist somit erst dann sinnvoll, wenn die in einem *in vivo* Ansatz erzielte Produktmenge gegenüber dem unfusionierten Protein verdoppelt wird und gleichzeitig der lösliche Anteil des Proteins gleich bleibt oder erhöht wird. Dies ist für die Fusion der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> mit dem Maltosebindeprotein MBP der Fall. In den durchgeführten Expressionsstudien (Tabelle 4-4) wird sowohl die gebildete Produktmenge relativ zum Standard um 40 % erhöht als auch die lösliche Fraktion des Enzyms von 5 % auf 75 % heraufgesetzt.

Ursprünglich wurden Fusionsproteine für die Aufreinigung und Immobilisierung von rekombinanten Proteinen genutzt. Viele dieser Systeme zur Bildung von Fusionsproteinen, wie zum Beispiel Thioredoxin (TRX), die Gluthathion-S-Transferase (GST) oder das Maltosebindeprotein (MBP) sind heute kommerziell erhältlich und haben einen positiven Effekt auf die heterologe Genexpression wie auch auf die Löslichkeit des fusionierten Zielproteins (Kapust and Waugh 1999; Sachdev and Chirgwin 2000; Sorensen et al. 2003). In den vorliegenden Versuchen ist der positive Einfluss des MBP auf die Expression unterschiedlicher Haloalkan Dehalogenasen nachgewiesen worden. Dabei ist der genaue Wirkungsmechanismus des MBP nicht bekannt. Allerdings ist zu vermuten, dass MBP als intramolekulares Chaperon mit dem anfusionierten Zielprotein in Wechselwirkung tritt (Shinde and Inouye 1996). Ebenfalls entscheidend für die erhöhte Löslichkeit und verminderte Degradation des Zielproteins ist die schnelle und effiziente Proteinfaltung des Fusionspartners während der ribosomalen Synthese (Baneyx 1999).

Das Protein GFP hingegen wird in der Literatur nicht als Fusionspartner beschrieben, der die Löslichkeit eines rekombinanten Proteins beeinflusst. Auch in der vor-

liegenden Arbeit hat GFP auf die Löslichkeit der Haloalkan Dehalogenasen oder auf deren Bildung weder einen positiven noch negativen Effekt. Zu beachten ist allerdings, dass wie oben bereits erwähnt, die Intention dieses Fusionspartners auf Seiten der Vereinfachung von Expressionsstudien lag. In der Veröffentlichung von Cha (Cha et al. 2000) ist beschrieben, dass GFP als Fusionspartner die fluoreszierenden Eigenschaften verliert, wenn das Gesamtkonstrukt in „Inclusion bodies“ (IB), das heißt in unlöslicher inaktiver Form vorliegt. Aufgrund dieser Beobachtung würde eine Detektion der Fluoreszenz, während der heterologen Genexpression eine Aussage über die Löslichkeit des rekombinanten Proteins zu lassen. Dies ist allerdings im Fall der mit GFP fusionierten Haloalkan Dehalogenase nicht der Fall. Auch in Form von IB's zeigen diese Fusionsproteine ein nicht zu vernachlässigendes Fluoreszenzsignal auf. Auch in der Literatur wurde schon mehrfach berichtet, dass die Missfaltung von GFP Fusionsproteinen innerhalb der Zelle, nicht zu einem vollständigen Verlust der Fluoreszenzeigenschaften des GFP führen (Tsumoto et al. 2003). Dennoch kann die Fusion eines rekombinanten Proteins mit GFP zur Vereinfachung der Analytik dienen, wenn das Protein bereits unfusioniert ein hohes Expressionsniveau wie auch eine hohe Löslichkeit aufweist.

#### **4.2.5. Zusammenfassung experimenteller Ansätze zur Optimierung der heterologen Proteinexpression von Haloalkan Dehalogenasen**

Im Zuge der heterologen Proteinexpression in Bakterien und anderen Wirtstämmen wurde seit Beginn dieser Technik deutlich, dass sowohl die Aggregation von neu synthetisierten Polypeptidketten in so genannte „Inclusion bodies“ (IB) als auch das Expressionsniveau rekombinanter Proteine, bei der Nutzbarkeit der Proteine eine zentrale Rolle spielt. IB's bestehen fast ausschließlich aus unlöslichen und nicht funktionellen rekombinanten Proteinen. Diese entstehen entweder durch die Akkumulation von Faltungsintermediaten der rekombinanten Proteine, die in hohen Konzentrationen innerhalb der Zelle vorliegen, oder durch einen fehlerhaften Faltungsprozess (Villaverde and Carrio 2003; Baneyx and Mujacic 2004). Bislang ist es nicht gelungen, eine allgemeingültige effektive Verfahrensweise für die rekombinante Proteinsynthese zu entwickeln, mit deren Hilfe beliebige Proteine heterolog in aktiver Form herzustellen sind. In den vergangenen Jahren spiegelt sich diese Problematik der IB Bildung innerhalb der Literatur in zahlreich verfassten Übersichtsartikeln wieder. In diesen Arbeiten werden verschiedene Konzepte für die lösliche Expression rekombinanter Proteine in unterschiedlichen Wirtstämmen mitgeteilt (Makrides 1996; Hannig and Makrides 1998; Baneyx 1999; Hoffmann and Rinas 2004; Jana and Deb 2005; Sorensen and Mortensen 2005).



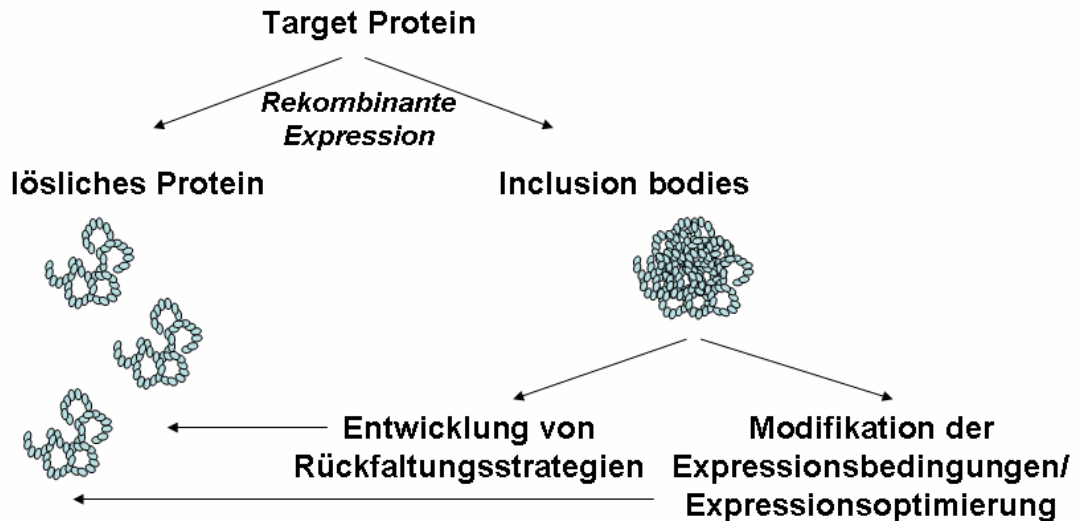


Abbildung 4-8: **Prinzipielle Strategien für die Bereitstellung von rekombinanten Proteinen in löslicher aktiver Form.** Generell können Methoden unterschieden werden, welche einerseits das Zielprotein über die Rückfaltung aus IB's gewinnen, und solchen die bereits in den Syntheseprozess des rekombinanten Proteins eingreifen, um die Synthese des funktionellen Proteins zu gewährleisten (Sorensen and Mortensen 2005).

Generell unterscheidet man bei der Bildung von IB's zwei Strategien für die Gewinnung von aktivem rekombinanten Protein. Hierbei steht die De- und anschließende Renaturierung der Proteinen aus den IB's einer Expressionsoptimierung gegenüber. Das größte Handicap bei der Rückfaltung von Proteinen aus IB's ist die geringe Produktausbeute verbunden mit den dabei entstehenden hohen Kosten und Zeitaufwand (Tsumoto et al. 2003). Zudem muss für jedes neue Targetprotein eine erneute Optimierung der Rückfaltungsbedingungen durchgeführt werden. Dies hat zur Folge, dass Rückfaltungsstrategien derzeit ausschließlich für Produkte mit einer hohen Wertschöpfung eingesetzt werden. Eine Optimierung der Expressionsbedingungen, die zu einer löslichen und aktiven Form des rekombinanten Proteins führen, ist daher für ein technisches Enzym wie die Haloalkan Dehalogenase Ziel führend.

In dem Übersichtsartikel von Sorensen (Sorensen and Mortensen 2005) werden im Bereich der Expressionsoptimierung zwei weitere Vorgehensweisen unterschieden. Dies sind zum einen Methoden, die eine Modifikation des Targetproteins ausschließen, und zum anderen Ansätze, die mit einer Veränderung des Targetproteins oder dessen Nukleinsäuresequenz einhergehen (siehe Abbildung 4-9). Den ersten Fall schließen die in Abschnitt 4.2.1 bis 4.2.3 angesprochenen Strategien zur Optimie-

rung der heterologen Genexpression ein. In diesen Abschnitten sind Ansätze, wie die Variation der Kultivierungstemperatur, die Auswahl geeigneter Wirtsstämme oder der Einfluss unterschiedlicher Mediumszusätze dargestellt. Die Co-Expression von molekularen Chaperonen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. In den zweiten Bereich, der mit einer Veränderung des Targetproteins einhergeht, fällt der in Abschnitt 4.2.4 dargestellte Einsatz von Fusionsproteinen.

**Expressionsoptimierung/  
Modifikation der Expressionsbedingungen**

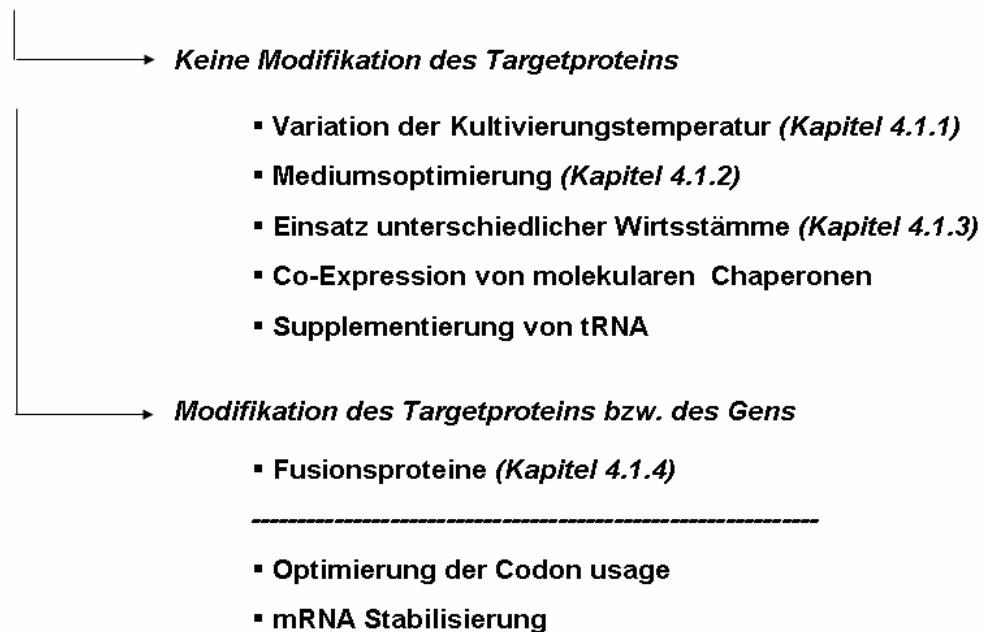
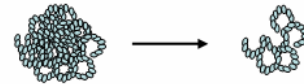


Abbildung 4-9: **Einteilung der Möglichkeiten zur Expressionsoptimierung nach Sorensen** (Sorensen and Mortensen 2005) in Ansätze, die eine Modifikation des Targetproteins bzw. Gens zulassen und in Methoden, die von einer Modifikation des Targetproteins absehen.

Die in den Abschnitten 4.2.1 bis 4.2.3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich insbesondere durch die Wahl des eingesetzten *E. coli* Stamms während der heterologen Genexpression erhebliche Verbesserungen in Bezug auf die erhaltene Produktmenge erzielen lassen. Erst durch die Expression der unterschiedlichen Haloalkan Dehalogenasen in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) ist es möglich, auch bei einer Verringerung der Kultivierungstemperatur für die weiterführenden Versuche relevante Mengen des rekombinanten Proteins zu erhalten.

In dem Übersichtsartikel von Hoffmann und Rinas (Hoffmann und Rinas 2004) wird in Betrachtung weiterer Literaturquellen (Vind et al. 1993, Dong et al. 1995, Rinas 1996, Hoffmann and Rinas 2001) postuliert, dass bei einsetzender rekombinanter Proteinsynthese die Syntheserate von „house-keeping“ Proteinen wie z.B. Elongationsfaktoren oder ribosomale Proteine sinkt (Hoffmann 2002). Diesen Angaben zufolge ist die Inhibierung der Synthese von Proteinen des Proteinbiosynthese-Systems abhängig von der Syntheserate des rekombinanten Proteins. Das heißt je höher die Syntheserate des rekombinanten Proteins desto höher ist die Inhibierung der Synthese von „house-keeping“ Proteinen. Mutmaßlich sinkt dabei die Konzentration der freien ribosomalen Untereinheiten, wodurch es zu einer Konkurrenz um die ribosomalen Bindestellen an den Ribosomen kommt. Bei hohen Syntheseraten von rekombinanten Proteinen kann dies das Absinken der Wachstumsrate zur Folge haben (Dong et al. 1995).

Bei der Expression in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) zeigen die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2.3, dass die synthetisierte Menge des rekombinanten Proteins um den Faktor zehn zunimmt, gleichzeitig aber die Bildung von „Inclusion bodies“ gegenüber *E. coli* BW3110 erhöht wird. In den Veröffentlichungen von Dong und Rinas (Dong et al. 1995; Rinas 1996) konnte gezeigt werden, dass auf die Induktion der heterologen Genexpression, eine Hitzeschock ähnliche Antwort des Mikroorganismus ausgelöst wird. Die Folge ist eine zusätzliche Synthese von Hitzeschockproteinen mit Chaperon- oder Proteasefunktionen, die auf Kosten des heterologen Proteins synthetisiert werden. Das Ausmaß der Hitzeschock- Antwort ist zunächst abhängig von den Eigenschaften des rekombinanten Proteins, von dessen Syntheserate, von den Kultivierungsbedingungen und schließlich von dem Mikroorganismus selbst (Hoffmann and Rinas 2000). In der Veröffentlichung von Seo (Seo et al. 2003) wird gezeigt, dass *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) gegenüber *E. coli* K Derivaten eine weitaus geringer ausfallende Hitzeschock- Antwort bei einer Erhöhung der Kultivierungstemperatur zeigt. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) gebildete Produktmenge um den Faktor zehn höher ist als in *E. coli* BW3110. Zusätzlich weist *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) eine Defizienz für die zytoplasmatische Protease Lon auf, die eine der Komponenten der Hitzeschockantwort darstellt. Die Lon- Protease ist verantwortlich für die Degradation von falsch gefalteten oder unvollständig synthetisierten Proteinen (Derman et al. 1993).

Neben dem verbesserten Expressionsniveau der Haloalkan Dehalogenasen in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) ist auch die Löslichkeit des Enzyms erhöht worden. Die in Ab-

schnitt 4.2.1 beschriebene Absenkung der Kultivierungstemperatur führt dazu, dass zunächst die Wachstumsrate des Mikroorganismus wie auch die Proteinbiosyntheserate gesenkt wird. Die Erhöhung der löslichen Fraktion des rekombinanten Proteins kann zum einen auf die verringerte Proteinbiosyntheserate zurückgeführt werden. Zum anderen kann aber auch die mit sinkender Wachstumsrate geringer werdende Proteinkonzentration des rekombinanten Proteins im Zytoplasma eine positive Auswirkung auf dessen Löslichkeit haben. Außerdem nehmen bei niedrigeren Temperaturen die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den entstehenden Polypeptidketten ab. Die ebenfalls in diesem Abschnitt 4.2.1 angesprochene Nutzung des schwächeren *trc* Promotors lässt den Schluss zu, dass die Proteinkonzentration des Enzyms im Zytoplasma oder die Proteinbiosyntheserate eine Rolle während der Proteinfaltung spielt. Innerhalb dieses Versuchs wird lediglich das vor der Induktion synthetisierte Protein in löslicher Form exprimiert. Im Fall der Expression von Haloalkan Dehalogenasen in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) ist ebenfalls die erhöhte zytoplasmatische Produktkonzentration oder die auf Grund der verminderten Stressantwort höhere Proteinbiosyntheserate für die Bildung von „Inclusion bodies“ in Betracht zu ziehen.

Es kann nicht eindeutig gezeigt werden, ob die Bildung von „Inclusion bodies“ auf die Proteinbiosyntheserate oder auf die im Zytoplasma vorliegende Konzentration des rekombinanten Proteins zurückzuführen ist.

Der in Abschnitt 4.2.2 beschriebene Einsatz von chemischen Chaperonen, die dem Kultivierungsmedium beigegeben werden, zeigt, dass diese Substanzen Einfluss auf die Proteinfaltung nehmen, jedoch keine Relevanz hinsichtlich des Produktionsprozesses besitzen. Versuchsansätze, innerhalb derer die größten Effekte in Bezug auf die Löslichkeit des rekombinanten Enzyms erzielt wurden, wurden mit dem chemischen Chaperon Sorbitol in Kombination mit einem osmotischen Schock und einer verringerten Wachstumstemperatur durchgeführt. Kontrollversuche zeigen, dass Sorbitol an der Faltung des rekombinanten Proteins beteiligt sein muss. Allerdings nimmt das Expressionsniveau unter den oben beschriebenen Bedingungen relativ zu dem Standardprotein MBP-GFP von 57 % auf 12 % ab, was für eine Produktion des Enzyms im größeren Maßstab nicht mehr relevant ist. Hinzu kommt, dass chemische Chaperone lediglich in hohen Konzentrationen ihre Wirkung zeigen (Kolter and Wendeler 2003). Das bedeutet, dass unter Produktionsbedingungen sowohl das chemische Chaperon Sorbitol, wie auch NaCl im Gramm bzw. Kilogramm Maßstab zugegeben werden muss, was keine praktikable Methode darstellt. Neben der Wirkung des Sorbitols zeigt sich in den einzelnen Ansätzen dieser Versuchsreihe,

dass wiederum die Konzentration des Zielproteins im Zytoplasma wie auch die Proteinsyntheserate Einfluss auf die Proteinfaltung nimmt.

Die in Abschnitt 4.2.4 dargestellte Methode der Expressionsoptimierung über die Bildung von Fusionsproteinen geht mit einer Veränderung des ursprünglichen Targetproteins einher. Das aus *E. coli* stammende Maltosebindeprotein (MBP) ist eines der effektivsten Proteine, welches die Löslichkeit rekombinanter Proteine positiv beeinflusst (Kapust and Waugh 1999). Bei der Arbeit mit Fusionsproteinen ist zu beachten, dass die Modifikation zu einem Verlust der Enzymaktivität führen kann. Insbesondere wenn das Enzym in seiner aktiven Form in Di- oder Tetrameren vorliegt. Ebenfalls wird in Abhängigkeit von der Größe des Fusionspartners die gebildete Produktmenge im Fall der Haloalkan Dehalogenase und des MBP um die Hälfte herabgesetzt. Es hat sich gezeigt, dass die Fusion mit MBP nur im Fall der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> zu einer Verbesserung der Expression führt. Sowohl die Produktmenge als auch die Löslichkeit des Proteins sind um den Faktor 1,5 bzw. 15 erhöht worden. Wie bereits in Kapitel 4.2.4 beschrieben, ist der genaue Wirkungsmechanismus des MBP nicht bekannt. In einer Veröffentlichung von Shinde (Shinde and Inouye 1996) wird gezeigt, dass die N-terminale Position des MBP bei der Faltung von Subtilisin essentiell ist. Demzufolge wirkt das MBP als eine Art intramolekulares Chaperon, das mit dem anfusionierten Zielprotein in Wechselwirkung tritt. Ebenfalls entscheidend für die erhöhte Löslichkeit und verminderte Degradation des Zielproteins ist die sehr schnelle und effiziente Konformationsfindung des MBP während der ribosomalen Synthese (Baneyx 1999).

In den Expressionsdaten des Abschnitts 4.2.4 spiegelt sich die Tatsache wieder, daß die Menge des sich im Zytoplasma der Zelle befindlichen rekombinanten Proteins nicht allein ausschlaggebend für die Anreicherung von unlöslichen, inaktiven Proteinen ist. Hier zeigt sich, dass die Expressionsniveaus der in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) exprimierten Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD4<sup>H107V</sup> mit 59,8% und 56,7 % relativ zum Standard in der gleichen Größenordnung liegen. Dennoch ist die Löslichkeit von DSD4<sup>H107V</sup> um den Faktor zehn geringer als die der ursprünglichen Haloalkan Dehalogenase DSD4.

### 4.3. Modellgestützte Ansätze der Expressionsoptimierung

In den dargestellten Ansätzen vorangegangener Abschnitte wurden, abgesehen von der Bildung von Fusionsproteinen, keine Veränderung innerhalb der Aminosäure- oder der Nukleinsäuresequenz des rekombinanten Proteins durchgeführt. In der Literatur gibt es jedoch Ansätze, die genau auf dieses abzielen. Dabei sind diese Vorgehensweisen teilweise auf Modelle gestützt. Bei der modellgestützten Expressionsoptimierung werden generell zwei Vorgehensweisen unterschieden. Im Folgenden werden für beide Vorgehensweisen (A) Änderungen auf Aminosäuresequenzebene (Abschnitt 4.3.2 und 4.3.4) und (B) Änderungen auf Ebene der Nukleinsäuresequenz (Abschnitt 4.3.3 und 4.3.4), Beispiele aufgezeigt. Eine Veränderung innerhalb der Aminosäuresequenz hat den Nachteil, dass es zu erheblichen Änderungen z.B. in der Aktivität, der Substratspezifität oder der Enantioselektivität des Enzyms kommen kann. Die Änderung synonymier Codons dagegen hat keinerlei Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz, kann jedoch erhebliche Auswirkungen auf die Proteinsynthese haben. Ein Beispiel für Änderungen auf Ebene der Nukleinsäuresequenz ist die Optimierung der „codon usage“ des betrachteten Proteins in Bezug auf den Wirtstamm, wodurch bereits erhebliche Steigerungen in der Proteinexpression erreicht werden konnten (Yadava and Ockenhouse 2003; Ito and Wagner 2004). Eine Analyse der „codon usage“ von Haloalkal Dehalogenasen bezüglich des Wirtstamms *E. coli* erfolgt in Abschnitt 4.3.1. Im Folgenden werden die einzelnen Ansatzweisen vorgestellt, experimentell unterlegt und anschließend mit den in der Literatur gezeigten Daten verglichen.

#### 4.3.1. “Codon usage”

*Escherichia coli* ist einer der am häufigsten im Rahmen der heterologen Genexpression eingesetzten Wirtsorganismen. Insbesondere das breite Spektrum an kommerziell erhältlichen Vektorsystemen, Wirtstämmen, der einfachen Handhabung, der geringen Produktionskosten und des hohen Expressionsniveaus, das bei der heterologen Proteinexpression erreicht wird, gibt diesem prokaryotischen System den Vorzug vor anderen Wirtsorganismen. Allerdings wird aufgrund von verschiedensten Ursachen oftmals keine ausreichende Expression des heterologen Gens erreicht. Hierbei kann die „codon usage“, mRNA Sekundärstrukturen, die Stabilität der mRNA sowie die Löslichkeit des Endprodukts eine entscheidende Rolle spielen (Kane 1995). Die in dem Genom von *E. coli* selten vorkommenden Codons

können während der Translation des heterologen Proteins zu einem frühzeitigen Abbruch der Proteinsynthese oder zu einem veränderten Leserahmen führen, insbesondere dann, wenn sie in Clustern vorkommen. Zu den nach Thanaraj (Thanaraj and Argos 1996) definierten seltenen Codons in *E. coli* zählen die Arginin (AGG, AGA, CGG), Glycin (GGA, GGG), Isoleucin (AUA), Leucin (CUA, UUA) und Prolin Codons (CCC). Eine Analyse der Nukleinsäuresequenzen der Haloalkan Dehalogenasen DhaA, DSD4 und DSD49 in Bezug auf die Anzahl seltener Codons innerhalb der Gene zeigt, dass alle drei Dehalogenasen eine hohe Anzahl seltener Codons aufweisen. Dies ist in der Übersicht in Tabelle 4-5 dargestellt.

Tabelle 4-5: Anteilmäßige Verteilung von seltenen Codons innerhalb der Haloalkan Dehalogenasen DhaA, DSD4 und DSD49.

Aminosäure	Codon	DhaA	DSD4	DSD49
Arginin	AGA	1	-	1
	AGG	-	2	1
	CGG	5	7	5
Glycin	GGA	4	6	7
	GGG	1	4	3
Isoleucin	AUA	-	1	-
Leucin	CUA	-	-	-
	UUA	-	-	-
Prolin	CCC	10	5	8
$\Sigma$ (seltene Codons)		21	25	25

In der Sequenz von DhaA sind 21 der oben genannten Codons und innerhalb der DSD4 und DSD49 Sequenzen jeweils 25 dieser Tripletts vorhanden. Wie aus Tabelle 4-5 ersichtlich ist entfällt die Anzahl der seltenen Codons zwischen den Haloalkan Dehalogenasen auf unterschiedliche Tripletts.

In hoch exprimierten Genen des Transkriptions- oder Translationsapparats von *E. coli* sind keine oder lediglich ein bis zwei dieser Codons integriert. Die Haloalkan Dehalogenase DhaA besitzt bei der heterologen Expression in *E. coli* BW3110 relativ zu dem Standardprotein MBP-GFP einen Anteil von 80 %. Die Abnahme dieses Anteils bei der Expression von DSD4 und DSD49 auf 28 % bzw. 5 % ist auf Grund der ähnlichen Verhältnisse in DhaA nicht anhand der seltenen Codons festzumachen.

Weitet man die Betrachtungen auf die gesamte Gensequenz aus, so lässt sich anhand des „*codon adaptation index*“ (CAI) eine Aussage darüber treffen, inwieweit ein Gen an die „codon usage“ des Wirtsorganismus angepasst ist. Der CAI-Wert wurde erstmals von Sharp definiert (Sharp and Li 1987) und gibt an, in welchem Maß die

Nukleinsäuresequenz des betrachteten Gens an die „codon usage“ des Wirtsorganismus angepasst ist (siehe Gleichung 4-1). Je näher dieser Wert dem Absolutwert 1 kommt, umso besser ist die Gensequenz der „codon usage“ in diesem Fall von *E. coli* angepasst. Bei einer Codon Optimierung wird im Allgemeinen ein *CAI* größer 0,8 angestrebt, um eine hohe Expressionsrate zu erzielen. Die Berechnung der *CAI*-Werte von DhaA, DSD4 und DSD49 in Bezug auf die „codon usage“ von *E. coli* W3110 ergeben Werte von 0,61, 0,63 und 0,64. In der Veröffentlichung von Sharp (Sharp and Li 1987) wurde der *CAI*- Wert lediglich auf die „codon usage“ von Genen bezogen, die in *E. coli* in einem hohen Maße exprimiert werden. Hierzu zählen z.B. ribosomale Proteine (z.B. *rpsA*) oder auch Elongationsfaktoren wie EF-Tu (*tufB*), EF-G (*tsf*) und EF-Ts (*fus*). Vergleicht man aus diesem Zusammenhang heraus die *CAI*- Werte für die unterschiedlichen Haloalkan Dehalogenasen als auch den *CAI*- Wert eines in *E. coli* hoch exprimierten Gens, so findet man erhebliche Unterschiede, die in Tabelle 4-6 dargestellt sind.

Tabelle 4-6: **CAI-Werte** (<http://www.evolvingcode.net/codon/cai/> Stand Januar 2006) **der Haloalkan Dehalogenasen DhaA, DSD4 und DSD49 und des Elongationsfaktors EF-TuB** in Bezug auf die „codon usage“ von *E. coli* W3110 [gbbct]:330 (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) und in Bezug auf die von Sharp (Sharp and Li 1987) definierte „codon usage“ von *E. coli*.

<b>Gen</b>	<b>CAI-Wert <i>E. coli</i> W3110</b>	<b>CAI-Wert nach Sharp für <i>E. coli</i> K12</b>
<i>dhaA</i>	0,61	0,27
<i>dsd4</i>	0,63	0,22
<i>dsd49</i>	0,64	0,27
<i>tufB</i>	0,79	0,80

Aus Tabelle 4-6 ist ersichtlich, dass hinsichtlich der *CAI*-Werte die Gene der Haloalkan Dehalogenasen weit außerhalb des Bereichs von hoch exprimierten Genen liegen. Dieser Unterschied zwischen den Haloalkan Dehalogenasen und beispielsweise einem Translationelongationsfaktor wird bei der Berechnung des *CAI*-Werts, ausgehend von der „codon usage“ des gesamten *E. coli* Genoms, nicht in dem Maße deutlich.

Damit bleibt festzuhalten, dass die Haloalkan Dehalogenase DhaA, ungeachtet des niedrigen *CAI*- Werts, bei der Expression in *E. coli* BW3110 relativ zum Standard einen Anteil von 80 % einnimmt. Der in Tabelle 4-6 dargestellte Unterschied, der sich bei der Expression von DhaA und DSD4 bzw. DSD49 ergibt, lässt sich somit nicht allein über den *CAI*- Wert erklären.



Über die Anpassung der Nukleinsäuresequenz eines Gens an die „codon usage“ des Wirtsorganismus wird vorwiegend Einfluss auf das Expressionsniveau genommen, nicht aber auf den Anteil des rekombinanten Proteins, das in löslicher Form vorliegt. Beispielsweise wird in der Veröffentlichung von Ito (Ito and Wagner 2004) die „codon usage“ Optimierung eines eukaryotischen Proteins beschrieben, was zwar bei der Expression in *E. coli* zu einer deutlichen Steigerung der Expression führt, gleichzeitig aber in einer Synthese von unlöslichem, inaktivem Protein mündet.

Seltene Codons innerhalb rekombinanter mRNAs führen zu erheblichen Problemen während der Proteinsynthese. Vor allem wenn sie in großer Zahl oder in Clustern vorliegen, können seltene Triplets die Produktausbeute sowie die Translationsgenauigkeit des rekombinanten Proteins beeinflussen (McNulty et al. 2003). McNulty und Matthes (Mattes 2001; McNulty et al. 2003) beschreiben diese Problematik für die vorwiegend in *E. coli* selten vorkommenden Arginin Codons. Die mRNAs der Haloalkan Dehalogenasen besitzen eine Reihe seltener Codons. Allerdings handelt es sich weder ausschließlich um Arginin Codons, noch sind diese in Clustern organisiert. Dennoch wurde in der vorliegenden Arbeit eine Supplementierung von tRNAs seltener Codon während der Expression der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> durchgeführt. Die Ergänzung dieser tRNAs erfolgt über das so genannte pRARE Plasmid des kommerziell erhältlichen *E. coli* BL21(DE3) Stamms Rosetta von Novagen (Darmstadt, Deutschland). Die heterologe Proteinexpression unter Standardbedingungen bei 30 °C in LB-Medium führt hierbei, im Vergleich zu dem Expressionsstamm *E. coli* BL21(rha), zu keinen Veränderung hinsichtlich der Löslichkeit oder der Produktmenge des rekombinanten Proteins. Über diesen Versuchsansatz kann somit der Einfluss seltener Codons auf die Produktlöslichkeit wie auch Konzentration ausgeschlossen werden.

Dennoch zeigen verschiedene Veröffentlichungen, dass seltene Codons für die Expression von rekombinaten Proteinen in einer anderen Hinsicht entscheidend sind. Demnach beeinflussen nach Deana (Deana et al. 1996) seltene bzw. häufig genutzte Triplets in der „codon usage“ von *E. coli* die Halbwertszeit der mRNA und so indirekt das Expressionsniveau der translatierten Polypeptidkette. Auch in der Veröffentlichung von Ramachandrian (Ramachandiran et al. 2002) wird gezeigt, dass es durch den Austausch eines einzelnen, seltenen Codons gegen ein häufiger genutztes, synonymes Triplett zu einer Abnahme der Chloramphenicol- Acetyltransferase Aktivität kommt. Eine Supplementierung relevanter tRNA führte in dieser Veröffentli-

chung nicht zu einer Verminderung dieses Effektes, so dass die Verminderung der Enzymaktivität mit einer sich ändernden mRNA Sekundärstruktur in Zusammenhang gebracht wurde. Lassen sich bei den Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 die seltenen Codons in Verbindung mit den dazugehörigen niedrigeren tRNA Konzentration als Grund für die verminderte Produktbildung und Löslichkeit über die Supplementierung dieser tRNAs ausschließen, so ist dennoch deren mRNA Struktur sowie die Translationselongationsrate einzelner Triplets auf Ebene der Nukleinsäuresequenz nicht außer Acht zu lassen.

Die Proteinbiosynthese in Prokaryonten ist ein co-translatinaler Prozess, das heißt dass noch während der Transkription der mRNA die ribosomale Synthese der Polypeptidkette einsetzt. Aufgrund dessen ist die mRNA während der Proteinsynthese sich ändernden Strukturen unterworfen. Mit Hilfe des Programms *mfold* (Mathews et al. 1999; Zuker 2003) lassen sich stationäre Strukturmodelle der mRNA berechnen. Die vollständigen mRNA Strukturen der Haloalkan Dehalogenase Gene *dhaA*, *dsd4* und *dsd49* können über dieses Programm dargestellt werden. Diese weisen auf Grund ihrer stark differierenden Nukleinsäuresequenzen dementsprechend unterschiedliche Strukturen auf, weshalb möglicherweise die mRNA Struktur Einfluss auf die Produktbildung nimmt.

Die mRNA Struktur ist in Hinblick auf die in Abschnitt 4.3.4 angesprochenen Punktmutante (DSD4<sup>H107K</sup>) der Haloalkan Dehalogenase DSD4 interessant. Bei dieser Variante von DSD4 ist an Position 107 die Aminosäure Histidin gegen Lysin über die zwei Codons AAA und AAG eingeführt worden. Diese Codons wirken sich unterschiedlich auf die Proteinsynthese bzw. auf die Stabilität der synthetisierten Polypeptidkette aus, zeigen aber auf Ebene der mRNA keine strukturellen Veränderungen.

### 4.3.2. Löslichkeitsmodell nach Wilkinson und Harrison

Ein Modell zur Vorhersage von Proteinlöslichkeiten wurde erstmals 1991 von Wilkinson und Harrison veröffentlicht (Wilkinson and Harrison 1991). In diesem ersten Modell ist zunächst die Korrelation zwischen der Bildung von „Inclusion bodies“ und sechs Protein bedingten Parametern untersucht worden. Die Analysen wurden auf experimenteller Seite mit 81 Proteinen, die in *E. coli* exprimiert wurden, durchgeführt. Für zwei der sechs untersuchten Parameter war ein Zusammenhang zu dem Phänomen der Bildung von „Inclusion bodies“ erkennbar. Bei diesen Parametern handelt es sich um die durchschnittliche Ladung des Proteins und um die Anzahl der Aminosäuren, welche Loop- Regionen ausbilden können. Die aus diesen Er-

gebnissen ermittelte Gleichung zur Vorhersage der Proteinlöslichkeit wurde 1999 publiziert (Davis et al. 1999) und ist als Gleichung 4-2 dargestellt.

Anhand der Gleichung 4-2 werden Löslichkeitsvorhersagen für die Haloalkan Dehalogenasen getroffen. Wie in Tabelle 4-7 dargestellt wird DSD4 bzw. DSD4<sup>H107V</sup> als unlöslich und DhaA mit einem (CV-CV')- Wert von – 0,83 als löslich vorkommendes Protein vorhergesagt. Wie in Abschnitt 4.2.4 gezeigt, konnten allerdings innerhalb von *in vivo* Expressionsstudien erhebliche Unterschiede zwischen der Expression von DSD4 und DSD4<sup>H107V</sup> in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) festgestellt werden. Der prozentuale Anteil der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> am löslichen Zellprotein ist um den Faktor zehn geringer als bei dem ursprünglichen Protein DSD4. Weder die Aminosäure Histidin noch Valin gehen in die Berechnungen der Löslichkeitswahrscheinlichkeit nach Wilkinson und Harrison mit ein, und doch haben diese Aminosäuren *in vivo* einen erheblichen Einfluss auf die Proteinfaltung. Dennoch wird im weiteren überprüft, ob es möglich ist, auf Grundlage der Gleichung 4-2, in ein Protein gezielt Mutationen auf Ebene der Aminosäuresequenz einzubringen, um die Löslichkeit dieses Proteins zu erhöhen.

**Gleichung zur Vorhersage der Proteinlöslichkeit nach Wilkinson und Harrison**

(Davis et al. 1999) <http://www.biotech.ou.edu/> (Stand: Januar 2006).

$$CV = a \left( \frac{Gly + Pro + Ser + Asn}{n} \right) - b \left| \left( \frac{(Arg + Lys) - (Asp + Glu)}{n} \right) - c \right| \quad (4-2)$$

$CV - CV' < 0$                       Protein wird in löslicher Form exprimiert

$CV - CV' > 0$                       Protein wird in unlöslicher Form exprimiert

mit

$$CV' = 1,71$$

$$a = 15,43$$

$$b = 29,56$$

$$c = 0,03$$

$n$  = Gesamtzahl der Aminosäuren

*Gly, Pro, Ser, Asn*                      Loop bildende Aminosäuren  
*Arg, Lys, Asp, Glu*                      geladene Aminosäuren

Berücksichtigt sind in der Gleichung 4-2 lediglich geladene Aminosäuren sowie Aminosäuren, die an der Ausbildung von Loop-Strukturen innerhalb des Proteins beteiligt sind.

Zur Erhöhung der Löslichkeit eines Proteins ist es nach dem Ansatz von Harrison und Wilkinson notwendig, mehrere Aminosäuren innerhalb des Proteins zu ersetzen, so dass der Parameter  $(CV-CV')$  negativ wird. Am Beispiel von DSD4 wurde im Rahmen dieser Arbeit eine solche Modifikation vorgenommen. Insgesamt werden in das zu synthetisierende Konstrukt 17 Aminosäure Modifikationen eingebracht. Ausgegangen wird von einem Sequenzalignment der Haloalkan Dehalogenase DSD4, LinB, DhaA und den Haloalkan Dehalogenasen aus *Rhizobium loti* und *Bradyrhizobium japonicum*. Die Positionen der Mutationen werden so gewählt, dass

- (1) lediglich Aminosäuren in Loop Regionen ausgetauscht werden,
- (2) Aminosäuren gewählt werden, die zu einer Erhöhung des  $(CV-CV')$ - Werts führen und
- (3) es müssen die ausgetauschten Aminosäuren den Aminosäuren an äquivalenten Positionen in DhaA entsprechen.

Für die Mutagenese wurden Loop Regionen des Proteins ausgewählt, da diese vorwiegend an der Proteinoberfläche liegen und somit direkt an der Wechselwirkung mit anderen Proteinen beteiligt sind. Anhand des Sequenz Alignments wurde ausgeschlossen, dass die Mutationen in hoch konservierten Regionen oder in Regionen, in denen sich katalytische Aminosäuren befinden, eingeführt werden. Die Aminosäuresequenz sowie die Nukleinsäuresequenz der mutagenisierten DSD4 sind im Anhang wiedergegeben. Eine dreidimensionale Darstellung der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>syn1</sup>, einschließlich der farblich unterlegten mutagenisierten Aminosäuren, ist in Abbildung 4-10 zu sehen.

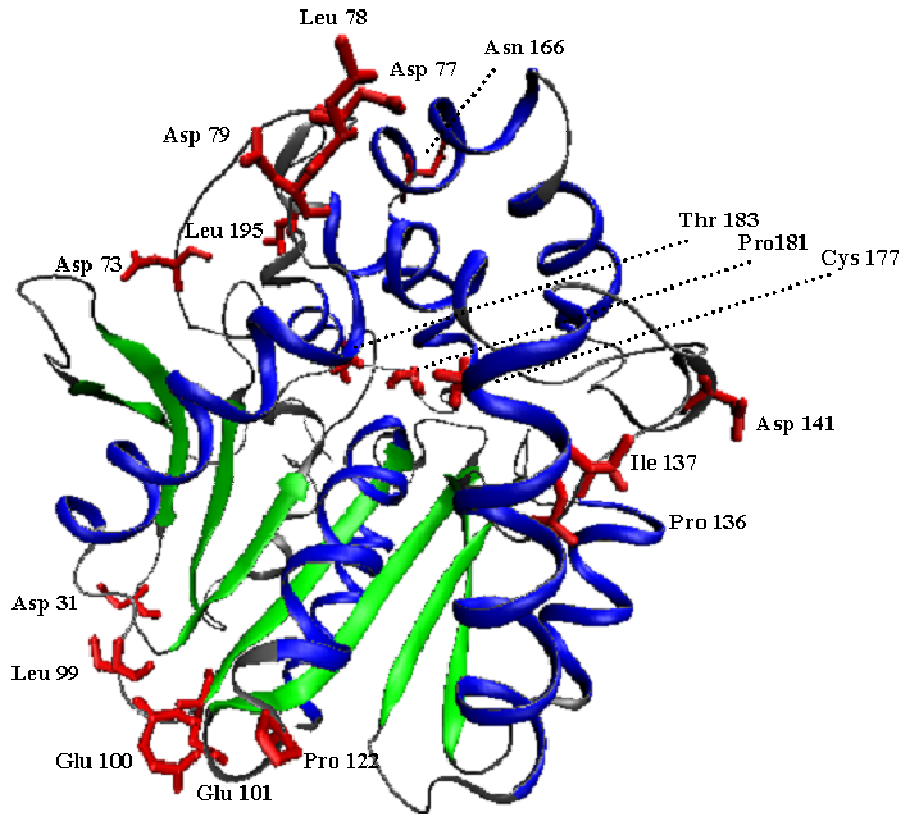


Abbildung 4-10: **Dreidimensionale Darstellung der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>syn1</sup>**. Die Visualisierung sowie die Einbringung der Mutationen innerhalb der Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm ‚Deep View/Swiss-Pdb Viewer‘ (Version 3.7) durchgeführt. Die 17 Mutationen in den Loop Regionen des Proteins sind in roter Farbe abgesetzt.

Das modifizierte *dsd4* Gen wurde von der Firma GENEART (Regensburg, Deutschland) vollständig synthetisiert und in einen konventionellen pUC19 Vektor eingebracht. Um die ursprünglichen Haloalkan Dehalogenase DSD4 und die synthetische Dehalogenase DSD4<sup>syn1</sup> direkt vergleichen zu können, musste DSD4<sup>syn1</sup> in das Rhamnose induzierbare Expressionssystem kloniert und in *E. coli* BL21(*rha*<sup>-</sup>) transformiert werden. Durch den Austausch von 17 Aminosäuren innerhalb der Sequenz von DSD4 ist der Parameter ( $CV-CV'$ ) von dem ursprünglichen Wert + 0,94 auf - 0,63 verschoben worden. Dies entspricht in der Vorhersage nach Wilkinson einer Löslichkeitswahrscheinlichkeit des Proteins von 65 %. In den Expressionsversuchen, dargestellt in Tabelle 4-7, zeigt sich jedoch, dass die eingeführten Mutationen keine positive Auswirkung auf die Löslichkeit des Proteins hatten. Im Gegenteil, die Löslichkeit der zuvor noch zu 50 % löslichen Haloalkan Dehalogenase DSD4 sank für die mutagenisierte Variante DSD4<sup>syn1</sup> auf einen löslichen Proteinanteil von 5 % ab.

Tabelle 4-7: Übersicht über die *in vivo* Expressionsstudien mit den *E. coli* Stämmen BL21(rha<sup>-</sup>) pJOE4036 DhaA, pJOE4036 DSD4 und pJOE4036 DSD4<sup>syn1</sup>. Die Versuche werden in LB-Medium bei 30°C durchgeführt. Dargestellt ist der Parameter ( $CV-CV'$ ) mit der dazugehörigen Löslichkeitswahrscheinlichkeit, sowie die prozentualen Anteile der einzelnen Proteine in der löslichen und unlöslichen Fraktion des Zellrohextraktes.

Protein	CV-CV'	Wahrscheinlichkeit	<i>in vivo</i> Expression Verhältnis (%)	
			Überstand	Pellet
DhaA	- 0,83	70 % löslich	68 ± 4,6	32 ± 4,6
DSD4	+ 0,94	28 % löslich	37 ± 4,8	63 ± 4,8
DSD4 <sup>H107V</sup>	+ 0,94	28 % löslich	7 ± 2,2	93 ± 2,2
DSD4 <sup>syn1</sup>	- 0,63	65 % löslich	5 ± 2,5	95 ± 2,5

Bereits die Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> zeigt, dass ein einzelner Austausch einer Aminosäure einen erheblichen Einfluss auf die Löslichkeit eines Proteins ausüben kann. Nach dem in diesem Abschnitt betrachteten Modell von Wilkinson und Harrison (Wilkinson und Harrison 1991) war es nötig gleich mehrerer Aminosäuren auszutauschen. Während der *in vivo* Proteinsynthese bewirken diese Veränderungen ein Ausfallen des rekombinanten Proteins als Inclusion bodies, wie es auch bereits bei einem einzelnen Aminosäureaustausch der Fall ist. Eine Optimierung der Proteinlöslichkeit über die Änderung der Aminosäuresequenz ist daher als kritisch anzusehen, auch wenn bei DSD4<sup>syn1</sup> die Änderungen in Anlehnung an eine löslich exprimierte Haloalkan Dehalogenase erfolgten.

An Stelle der Vorgehensweise einer gerichteten Mutagenese kann eine ungerichtete Mutagenese für die Erhöhung der Proteinlöslichkeit beispielsweise für die Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> in Erwägung gezogen werden. Bei der Durchführung einer ungerichteten Mutagenese des Targetproteins muss im Anschluss ein Screening nach relevanten Mutanten erfolgen. Innerhalb dieses Screeningverfahrens muss der Erhalt der Aktivität und der Enantioselektivität des Enzyms, kombiniert mit der angestrebten Löslichkeit des Proteins zu detektieren sein. Die Etablierung eines solchen Screeningverfahrens ist auf Grund des prochiralen Substrats 1,2,3-Trichlorpropan nicht trivial und zeitaufwändig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb von der Methode der ungerichteten Mutagenese abgesehen.

#### 4.3.3. Änderungen des Translationsprofils innerhalb der Haloalkan Dehalogenase DSD4

Die Konformationsfindung eines Proteins *in vivo* wird von vielen Faktoren beeinflusst. Hierbei spielt nicht nur der pH Wert innerhalb des Zytoplasmas eine Rolle, sondern auch die Interaktion der neu synthetisierten Polypeptidkette mit anderen Molekülen oder molekularen Chaperonen. Da die Proteinsynthese in Prokaryonten ein co-translatonaler Prozess ist, wird dieser von den Ribosomen selbst oder der mRNA bzw. mRNA-Struktur (Deana et al. 1996) beeinflusst. Zudem beschreibt die Veröffentlichung von Sharp (Sharp and Li 1987) ein Zusammenhang zwischen der Codon Zusammensetzung eines Gens und dessen Expressionsniveau. In weiteren Veröffentlichungen ist vor allem die Beobachtung interessant, dass selten genutzte Codons in Loop-Regionen (Krashennikov et al. 1989; Cortazzo et al. 2002) oder zwischen Proteindomänen (Purvis et al. 1987; Crombie et al. 1992) lokalisiert sind. Der Ribosomenfluss auf der mRNA wird vorwiegend über deren Struktur, den genetischen Code an sich und über die Verfügbarkeit der tRNA moduliert. Auf dieser Grundlage wird vermutet, dass Regionen der mRNA, die selten genutzte Codons enthalten, langsamer translatiert werden, und so den Faltungsprozess der entstehenden Polypeptidkette beeinflussen. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass bei einer Optimierung der „codon usage“ eines rekombinanten Proteins bezüglich des Wirtsorganismus oftmals eine Erhöhung des Expressionsniveaus eintritt, gleichzeitig aber das Produkt in „Inclusion bodies“ überführt wird (Yadava and Ockenhouse 2003; Ito and Wagner 2004).

Bei der heterologen Expression der Haloalkan Dehalogenase DhaA in *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) besitzt DhaA, relativ zu dem als Standard eingesetzten Protein MBP-GFP, einen Anteil am löslichen Zellprotein von 80 %. Dieser Anteil sinkt bei Versuchen mit der Haloalkan Dehalogenase DSD4 auf 50 %. Wie bereits in dem vorangegangenen Abschnitt 4.1.2 dargestellt, besitzen beide Proteine eine sehr ähnliche Proteinstruktur, sind allerdings auf Ebene der Aminosäuresequenz lediglich zu 50 % identisch, was sich auch in der Nukleinsäuresequenz widerspiegelt. Da Curran und Sorensen (Curran and Yarus 1989; Sorensen and Pedersen 1991) gezeigt haben, dass synonyme Codons mit unterschiedlichen Translationsraten translatiert werden, wird im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des Translationsprofils auf die Bildung von „Inclusion bodies“ untersucht. Dazu werden in Anlehnung an die Nukleinsäuresequenz von DhaA die Translationselongationsraten jeder einzelnen Position von DSD4 an die von DhaA angepasst. Die auf diese Weise neu synthetisierte Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>syn2</sup> besitzt die gleiche Aminosäuresequenz wie DSD4,

weist allerdings auf Ebene der Nukleinsäuresequenz erhebliche Veränderungen auf. Die Grundlage für die Anpassung ist zum einen ein Sequenzalignment zwischen DhaA und DSD4, zum anderen die in der Arbeit von Arnold (Arnold 2003, Arnold et al. 2005) aufgezeigten Translationselongationsraten  $(k_{TEL})_{eff}$  jedes einzelnen Codons (Tabelle 4-8). Aus Tabelle 4-8 ist ersichtlich, dass es erhebliche Unterschiede in den Translationselongationsraten  $(k_{TEL})_{eff}$  der 61 Aminosäuren codierenden Triplets gibt. Bei der Berechnung der Translationselongationsraten gehen in dem Modell von Arnold neben der Konzentration des Ternären Komplexes und der EF-G\*GTP Konzentration, ein Codon spezifischer Faktor  $f_i$  ein, der die Codon–Anticodon Bindung widerspiegelt. Diese Codon spezifischen Faktoren wurden der Veröffentlichung von Solmovici (Solomovici et al. 1997) entnommen. Für die Modellierung der Codon spezifischen Translationselongationsraten wurden bei Arnold mehrere Annahmen getroffen. Zu berücksichtigen ist insbesondere die Annahme, dass während der Translation lediglich eine geringe Anzahl der Ribosomen aktiv sind. Dies hat zur Folge, dass der so genannte „Queuing Faktor“ im Modell von Arnold nicht berücksichtigt wurde.

Anhand der „Codon usage“ Datenbank des Kazusa DNA Research Instituts in Japan (<http://www.kazusa.or.jp/codon/> Stand Januar 2006) wurden zudem die Anteile der einzelnen Codons ( $n_j^t$ ) innerhalb des Genoms von *E. coli* W3110 ermittelt. Hieraus errechnet sich die Häufigkeit ( $n_j^{aa_i}$ ), mit der ein Codon einer jeweiligen Aminosäure genutzt wird. In Tabelle 4-8 sind die Translationselongationsraten  $(k_{TEL})_{eff}$ , ( $n_j^t$ ) und ( $n_j^{aa_i}$ ) für die 61 Aminosäure Codons in alphabetischer Reihenfolge aufgezeigt. Nach diesen Modellberechnungen sind Triplets, die eine relativ geringe  $(k_{TEL})_{eff}$  besitzen, nicht direkt mit in *E. coli* selten genutzten Codons in Zusammenhang zu bringen. Allerdings werden innerhalb einer Aminosäure oftmals die am häufigsten vorkommenden Triplets mit den für die Aminosäure höchsten Translationselongationsraten translatiert.



Tabelle 4-8: **Codon spezifische Translationselongationsraten** ( $k_{TEL}^{eff}$ ), bezogen auf die Translationsrate des Codons *CUG* der Aminosäure Leucin, das nach Arnold (Arnold 2003) auf 24 AS s<sup>-1</sup> festgelegt wird. Der Parameter  $n_j^t$  ist der Anteil eines einzelnen Codons innerhalb des Genoms von *E. coli* W3110, während  $n_j^{aa_i}$  die Häufigkeit angibt, mit der ein Codon innerhalb einer Aminosäure auftritt. Die mit \* markierten Triplets gehören nach Thranjan (Thanaraj and Argos 1996) zu den in *E. coli* selten vorkommenden Codons.

AS	Codon	( $k_{TEL}^{eff}$ ) (AS s <sup>-1</sup> )	$n_j^t$ (%)	$n_j^{aa_i}$ (%)	AS	Codon	( $k_{TEL}^{eff}$ ) (AS/s)	$n_j^t$ (%)	$n_j^{aa_i}$ (%)
Ala	<i>GCA</i>	10,0	1,88	20,2	Leu	<i>CUA</i> *	22,1	0,36	3,4
Ala	<i>GCC</i>	10,4	2,51	26,9	Leu	<i>CUC</i>	22,1	1,07	10,2
Ala	<i>GCG</i>	12,7	3,42	36,7	Leu	<i>CUG</i>	24,0	5,35	51,1
Ala	<i>GCU</i>	9,3	1,52	16,3	Leu	<i>CUU</i>	22,8	1,08	10,3
					Leu	<i>UUA</i> *	22,5	1,29	12,3
Arg	<i>AGA</i> *	22,1	0,17	2,9	Leu	<i>UUG</i>	23,7	1,31	12,5
Arg	<i>AGG</i> *	17,5	0,12	2,1					
Arg	<i>CGA</i>	9,1	0,37	6,4	Lys	<i>AAA</i>	23,5	3,55	75,7
Arg	<i>CGC</i>	23,7	2,36	40,6	Lys	<i>AAG</i>	14,1	1,14	24,3
Arg	<i>CGG</i> *	21,1	0,49	8,4					
Arg	<i>CGU</i>	24,0	2,30	39,6	Met	<i>AUG</i>	23,8	2,80	100,0
Asn	<i>AAC</i>	23,1	2,15	56,4	Phe	<i>UUC</i>	21,2	1,60	43,0
Asn	<i>AAU</i>	20,3	1,66	43,6	Phe	<i>UUU</i>	22,8	2,12	57,0
Asp	<i>GAC</i>	19,4	2,05	38,0	Pro	<i>CCA</i>	13,2	0,90	19,2
Asp	<i>GAU</i>	23,7	3,34	62,0	Pro	<i>CCC</i> *	19,2	0,53	11,3
					Pro	<i>CCG</i>	23,0	2,49	53,2
Cys	<i>UGC</i>	23,2	0,64	57,7	Pro	<i>CCU</i>	23,1	0,76	16,2
Cys	<i>UGU</i>	20,0	0,47	42,3					
					Ser	<i>AGC</i>	23,0	1,59	28,5
Gln	<i>CAA</i>	22,3	1,48	22,7	Ser	<i>AGU</i>	17,2	0,75	13,5
Gln	<i>CAG</i>	22,8	2,93	77,3	Ser	<i>UCA</i>	10,7	0,62	11,1
					Ser	<i>UCC</i>	11,4	0,81	14,5
Glu	<i>GAA</i>	24,0	4,03	68,7	Ser	<i>UCG</i>	11,2	0,86	15,4
Glu	<i>GAG</i>	16,6	1,84	31,3	Ser	<i>UCU</i>	12,3	0,94	16,9
Gly	<i>GGA</i> *	23,6	0,73	9,8	Thr	<i>ACA</i>	22,8	0,60	11,5
Gly	<i>GGC</i>	23,9	3,06	41,1	Thr	<i>ACC</i>	22,9	2,38	45,5
Gly	<i>GGG</i> *	23,6	1,08	14,5	Thr	<i>ACG</i>	17,9	1,38	26,4
Gly	<i>GGU</i>	22,7	2,57	34,5	Thr	<i>ACU</i>	15,8	0,87	16,6
His	<i>CAC</i>	20,6	1,01	43,9	Trp	<i>UGG</i>	22,6	1,33	100,0
His	<i>CAU</i>	22,2	1,29	56,1					
					Tyr	<i>UAC</i>	21,4	1,25	46,0
Ile	<i>AUA</i> *	23,9	0,35	6,1	Tyr	<i>UAU</i>	23,5	1,47	54,0
Ile	<i>AUC</i>	22,9	2,58	44,6					
Ile	<i>AUU</i>	23,9	2,85	49,3	Val	<i>GUA</i>	8,6	1,08	15,0
					Val	<i>GUC</i>	9,3	1,58	22,0
					Val	<i>GUG</i>	12,7	2,67	37,1
					Val	<i>GUU</i>	11,3	1,86	25,9

Die in der Tabelle 4-8 wiederzufindenden Translationselongationsraten dienen als Grundlage für den Aufbau der neu synthetisierten Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>syn2</sup>. Die Vorgehensweise, nach der das synthetische Gen *dsd4*<sup>syn2</sup> erzeugt wurde, ist in Abbildung 4-11 dargestellt. Die Basis für die Synthese von *dsd4*<sup>syn2</sup> bildet, wie bereits erwähnt ein Sequenzalignment zwischen den Aminosäuresequenzen der Haloalkan Dehalogenasen DhaA und DSD4, das mit dem Programm ClustalW (Version 1.83) erstellt wurde. Ausgehend von diesem Alignment lassen sich die Codon spezifischen Translationselongationsraten an jeder einzelnen Position darlegen und vergleichen. Dies ist in der Abbildung 4-11 A) für die ersten zehn Aminosäuren der Haloalkan Dehalogenasen gezeigt. Die Abweichung der Translationselongationsraten ( $\Delta((k_{TEL})_{eff} dsd4 - (k_{TEL})_{eff} dhaA)$ ) ist ebenfalls für die ersten Aminosäuren abgebildet. Im dargestellten Ansatz wurden die Abweichungen der  $(k_{TEL})_{eff}$  zwischen *dhaA* und *dsd4* durch den Austausch von synonymen Codons innerhalb der Nukleinsäuresequenz von DSD4 auf ein Minimum reduziert. Ansatzweise ist dies für die ersten zehn Aminosäuren in Abbildung 4-11 B) dargestellt. Die gesamte Sequenz des synthetisch hergestellten *dsd4*<sup>syn2</sup> Gens ist im Anhang wieder zu finden. Bereits in dem dargestellten Ausschnitt der Protein- bzw. Gensequenz wird deutlich, dass eine Anpassung der Codon spezifischen Translationsraten nicht an allen Positionen der fortlaufenden Sequenz möglich ist. Das ist insbesondere dann der Fall, wenn unterschiedliche Aminosäuren an äquivalenten Positionen sitzen.

A)

Sequenzalignment CLUSTAL W (1.83) der Haloalkan Dehalogenasen DhaA und DSD4

DhaA	MSEIGTGFFDPH---	YVEVLGERMHYVDVGP	RDGTPVLF	FLHGNPTSSYLWRNII	PHVAP
DSD4	MSEEAIS-ALDPHPRKKQ	ELLGTSMSYVDTG--	TGEPVVFLHGNPTSSYLWRNVI	PHVAP	
	*** . . .:***	*:** * **.*	* **:*	*****:*****	
DhaA	SHRCIAPDLIGMGKSD-	KPDLDYFDDHVRYLDA	FIEALG-	LEEVLVI	HDWGSALGFHW
DSD4	VARCIAPDLIGMGASGP	SSSGNYTFADHARHLD	ALLDAILPKGQLSLV	VVDWGSALGFHW	
	***** * *				
DhaA	AKRNPERVKGIACI				
DSD4	ANRNRDRVGIAYI				
	*:** :**:*				
DhaA	CVVRPLTEVEMDH				
DSD4	SVLRKLSSEEMDN				
	.:** *:. ***:				
DhaA	PKLLFWGTPGVLI				
DSD4	PKLLVNAEPGAIL				
	****. . **:::				

	<b>DhaA</b>	M	S	E	I	G	T	G	F	P	F	...
		AUG	UCA	GAA	AUC	GGU	ACA	GGC	UUC	CCC	UUC	...
	$(k_{TEL})_{eff}$	23,8	10,7	24,0	22,9	22,7	22,8	23,9	21,2	19,2	21,2	...
	<b>DSD4</b>	M	S	E	E	A	I	S	-	A	L	...
		AUG	AGC	GAA	GAA	GCG	AUC	UCG	-	GCC	CUC	...
	$(k_{TEL})_{eff}$	23,8	23,0	24,0	24,0	12,7	22,9	11,2	-	10,4	22,1	...

$\Delta((k_{TEL})_{eff} dsd4 - (k_{TEL})_{eff} dhaA):$												
		0	12,3	0	1,1	-10,0	0,1	-12,7	-	-8,8	0,9	...

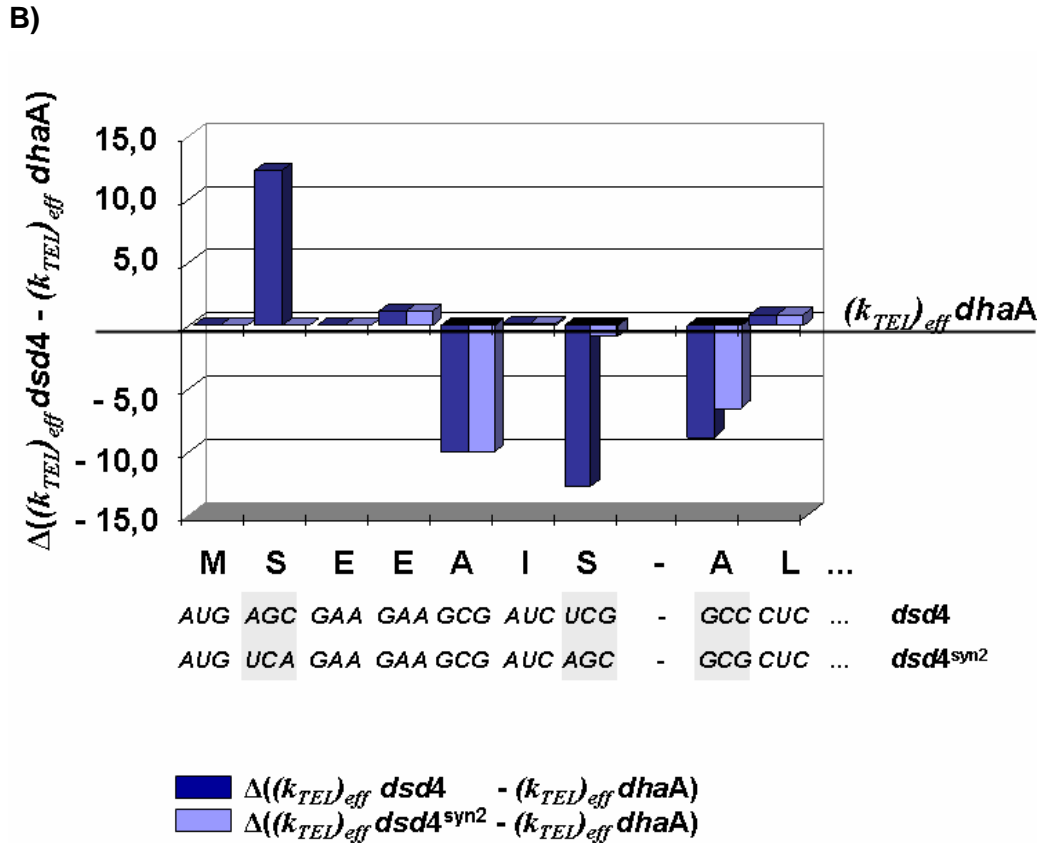


Abbildung 4-11: **Vorgehensweise zur Synthese der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>syn2</sup>**. Basis für die Anpassung der Translationselongationsraten ist ein Sequenzalignment der Haloalkan Dehalogenasen DhaA und DSD4, das mit dem Programm ClustalW (1.83) (<http://ebi.ac.uk.clustalw> Stand Januar 2006) erstellt wurde. Für den Anfangsbereich der beiden Haloalkan Dehlognasen ist in Abbildung 4-11 A) die Aminosäuresequenz bzw. Nukleinsäuresequenz beider Proteine einschließlich der dazugehörigen Codon spezifischen  $(k_{TEL})_{eff}$  dargestellt. Daraus resultiert die Abweichung in den Translationselongationsraten  $\Delta((k_{TEL})_{eff} dsd4 - (k_{TEL})_{eff} dhaA)$ , die für jede Position innerhalb der mRNA errechnet wird. Ein positiver/ negativer  $\Delta$  Wert bedeutet, dass an dieser Position die mRNA von *dhaA* langsamer/ schneller translatiert wird, als die von *dsd4*. Abbildung 4-11 B) zeigt die Anpassung der  $(k_{TEL})_{eff}$  von *dsd4* an die von *dhaA*. Durch den Austausch von synonymen Codons wird die Differenz zwischen den Translationselongationsraten ( $\Delta((k_{TEL})_{eff} dsd4 - (k_{TEL})_{eff} dhaA)$ ) an jeder Position auf ein Minimum reduziert.

Im Ganzen werden 149 der insgesamt 293 Triplets innerhalb der *dsd4* Sequenz durch synonyme Codons ersetzt (Tabelle 4-9). An 81 Positionen wurde dadurch  $(k_{TEL})_{eff}$  von *dsd4* vollständig an die von *dhaA* angeglichen. Zudem kommt, dass bereits 74 Triplets der Originalsequenz von *dsd4* in den  $(k_{TEL})_{eff}$  mit *dhaA* überein-

stimmen, so dass 53 % der gesamten Gensequenz von DSD4<sup>syn2</sup> und DhaA bezogen auf das Translationsprofil übereinstimmen.

Tabelle 4-9: **Übersicht über die Anzahl der Triplets, in denen die Translationselongationsraten zwischen *dsd4* und *dhaA* (nicht) übereinstimmen.** Aufgezeigt ist die Anzahl der Codons in der Originalsequenz von *dsd4* sowie von *dsd4*<sup>syn2</sup>, deren  $(k_{TEL})_{eff}$  mit den von *dhaA* übereinstimmen.

<b>DSD4 mit 293 Aminosäuren bzw. Codons</b>			
• <b>Originalsequenz <i>dsd4</i></b>	$(k_{TEL})_{eff} dsd4 = (k_{TEL})_{eff} dhaA$	$(k_{TEL})_{eff} dsd4 \neq (k_{TEL})_{eff} dhaA$	
	74 Triplets	219 Triplets	
• <b>Sequenz von <i>dsd4</i><sup>syn2</sup></b>	$(k_{TEL})_{eff} dsd4 = (k_{TEL})_{eff} dhaA$	$(k_{TEL})_{eff} dsd4 \neq (k_{TEL})_{eff} dhaA$	
	155 Triplets	138 Triplets	

Das auf diese Weise entstandene Gen *dsd4*<sup>syn2</sup> wurde von der Firma GENART synthetisiert und für die folgenden Expressionsstudien in ein Rhamnose induzierbares Expressionssystem kloniert. Für einen direkten Vergleich zwischen der ursprünglichen Haloalkan Dehalogenase DSD4 und DSD4<sup>syn2</sup> werden die Expressionsversuche in dem gleichen Wirtstamm *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche zeigen (Tabelle 4-10), dass sowohl im Expressionsniveau des rekombinanten Proteins als auch in der Bildung von „Inclusion bodies“ keine signifikanten Änderungen zu verzeichnen sind.

Tabelle 4-10: **Ergebnisse der Expressionsstudien mit den *E. coli* Stämmen BL21(rha<sup>-</sup>) pTST101, pJOE4036 DSD4 und pJOE4036 DSD4<sup>syn2</sup>.** Die Versuche werden unter Standardbedingungen in LB-Medium bei 30 °C durchgeführt. Die Auswertung der SDS-Gele erfolgt über densitometrische Messungen mit dem Programm Image Master<sup>®</sup> VDS Software (Version 2.0).

Protein	Wirtstamm <i>E. coli</i>	Expression relativ zum Standard (%)	Verhältnis (%)	
			Überstand	Pellet
MBP-GFP	BL21(rha <sup>-</sup> )	100	80 ± 5,0	20 ± 5,0
DSD4	BL21(rha <sup>-</sup> )	61 ± 3,1	40 ± 2,5	60 ± 2,5
DSD4 <sup>syn2</sup>	BL21(rha <sup>-</sup> )	70 ± 5,4	35 ± 4,1	65 ± 4,1

Der gewählte Ansatz zur Anpassung der Translationselongationsraten zeigt, dass der Austausch der synonymen Codons im betrachteten Fall keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung von unlöslichem inaktivem Protein hat. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass auf Grund der gewählten Bedingung nur Änderungen auf Nukleinsäuresequenz Ebene zuzulassen, lediglich etwa 50 % der Gensequenz von

$dsd4^{syn2}$  an das Translationsprofil von *dhaA* angepasst werden konnte. Es besteht die Möglichkeit, dass hierdurch entscheidende Regionen, die die Faltung der entstehenden Polypeptidkette beeinflussen, ausgenommen wurden.

In mehreren Literaturquellen ist beschrieben, dass die Translationselongationsrate eines Gens Einfluss auf die Löslichkeit des synthetisierten Proteins nimmt. Ein Beispiel für diesen Zusammenhang ist die Veröffentlichung von Komar (Komar et al. 1999), der in einer *in vitro* Synthese zeigen konnte, dass stille Mutationen innerhalb der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) zu einer Veränderung des Translationsflusses führen. In der Gensequenz der CAT wurden vorwiegend seltener genutzte Codons durch Triplets ersetzt, die in der „codon usage“ von *E. coli* häufig vorkommen. Dies hat zum einen Auswirkungen auf die Gesamtproteinmenge des rekombinanten Proteins, zum anderen führt dies aber auch zu einer vermehrten Bildung von „Inclusion bodies“. In den Versuchen von Komar wurden insgesamt 16 synonyme Codons ausgetauscht, wobei diese nicht über die gesamte Gensequenz verteilt sind, sondern in einer 30 Aminosäuren umfassenden Region liegen, die sowohl eine Loop-Region als auch eine  $\beta$ -Faltblatt Struktur einschließt. Nach den in der Arbeit von Arnold (Arnold 2003) festgehaltenen  $(k_{TEL})_{eff}$  kommt es in dem beschriebenen Bereich an 12 von 16 Positionen zu einer Erhöhung der Translationselongationsraten einzelner Triplets. Dies kann eine Ursache für den veränderten Faltungsprozess der Polypeptidkette sein, was in diesem Fall zu einer Aggregation des Proteins führt.

In einer weiteren Veröffentlichung von Cortazzo (Cortazzo et al. 2002) werden die Auswirkungen synonyme Codon Substitutionen innerhalb eines Proteins aus dem Organismus *Echinococcus granulosus* auf die heterologe Expression in *E. coli* K12 beschrieben. Dabei erfolgten die Modifikationen in einem Loop zwischen zwei  $\alpha$ -Helices, der fünf Aminosäuren umfasst. Eine der Varianten, in der drei der fünf Triplets durch synonyme Codons ersetzt wurden, wird vermehrt in Einschlusskörpern akkumuliert. Auch hier kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Veränderung der Translationsrate in der beschriebenen Region des Proteins, ausgelöst durch die Änderung synonyme Codons, zu dem veränderten Faltungsprozess führt. Auch bei Cortazzo handelt es sich um den Austausch von in *E. coli* selten genutzten Codons gegen häufiger genutzte Triplets, wodurch die Translationselongationsrate an den einzelnen Positionen um durchschnittlich  $1,1 \text{ AS s}^{-1}$  gesenkt wird.

Crombie (Crombie et al. 1992) beschreibt für das *TRP3* Protein aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eine Absenkung der Enzymaktivität um den Faktor 1,5, die durch den Austausch von synonymen Codons zustande kommt. *TRP3* ist ein bifunk-

tionales Protein, das aus einer Anthranilat- Synthase und einer Indolglycerolphosphat- Synthase- Domäne besteht. Die Modifikation von zehn aufeinander folgenden Triplets in dem Übergangsbereich der beiden Domänen führt bei der heterologen Expression in *E. coli* zu Aktivitätsverlusten. In diesem Zusammenhang werden ausschließlich selten genutzte Triplets, die in dieser Region auftreten gegen häufig genutzte Codons ersetzt. Hier wird davon ausgegangen, dass die Aufhebung einer Translationspause in diesem Bereich zu einem fehlerhaften Faltungsprozess führt.

Die Beispiele von Cortazzo und Crombie (Crombie et al. 1992; Cortazzo et al. 2002) zeigen, dass die Translationselongationsraten innerhalb von Loop- Regionen maßgeblich an der Proteinfaltung beteiligt sind. In den Versuchsreihen von Komar (Komar et al. 1999) ist ebenfalls eine Loop-Region aber auch eine  $\beta$ -Faltblatt Struktur betroffen, so dass über die Gesamtheit der ausgetauschten synonymen Codons keine eindeutige Aussage getroffen werden kann, welches der Strukturelemente die Proteinfaltung beeinflusst. In allen drei Fällen wurde durch den Austausch von synonymen Codons die lösliche, aktive Fraktion der jeweiligen Proteine verringert. Dies wurde in den Veröffentlichungen durchweg auf eine Modifikation des Translationsprofils bzw. auf Änderungen von Translationspausen zurückgeführt. Die Anzahl der betroffenen Triplets reicht von drei bis sechzehn, wobei keine Aussagen getroffen wurden, ob bereits ein oder zwei Triplets ausreichen, um eine Änderung im Translationsprofil zu erzielen.

Betrachtet man die Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>syn2</sup>, sind hier über die Gesamtlänge des Gens Codon Modifikationen vorgenommen worden, so dass etwa 50 % des Translationsprofils an das von *dhaA* angeglichen ist. Diese Anpassungen sind nicht ausreichend, um die Proteinfaltung zu beeinflussen. Vor allem im Bereich der Cap-Domäne (siehe Abbildung 1-4) sind nach den Modifikationen noch Abweichungen in den Translationselongationsraten von *dsd4*<sup>syn2</sup> und *dhaA* zu finden. Aber auch Loop- Regionen, wie z.B. zwischen der  $\alpha$ -Helix  $\alpha$ B und dem  $\beta$ -Faltblatt  $\beta$ 5 oder zwischen  $\beta$ 6 und  $\alpha$ D, konnten nicht vollständig angepasst werden. Auf Grund dessen wird es schwierig zu beurteilen, ob ein positiver Einfluss auf die Proteinlöslichkeit gezeigt werden kann, wenn eine vollständige Anpassung der Translationselongationsraten hätte erfolgen können.

In vielen Veröffentlichungen gehen die Meinungen, über eine mögliche Korrelation gezielter Vorkommen synonymen Codons innerhalb von Sekundärstrukturen weit auseinander. Die Untersuchung von Gen- und Protein-Datenbanken, die von Bru-

nak (Brunak and Engelbrecht 1996) durchgeführt wurden, weisen keinerlei Korrelationen von selten genutzten Codons und deren Positionierung in Strukturelementen von Proteinen auf. Dem gegenüber stehen Veröffentlichungen von Adzhubei, Thanaraj (Adzhubei et al. 1996; Thanaraj and Argos 1996), die eine Verbindung zwischen synonym genutzten Codons und Proteinstrukturen herstellen. Eine Übereinstimmung zwischen diesen Standpunkten zeichnet sich in den Veröffentlichungen von Gumptra und Xie (Xie and Ding 1998; Gupta et al. 2000) ab. Sie gehen davon aus, dass eine Korrelation zwischen der Verteilung von synonymen Triplets im Zusammenhang mit Proteinsekundärstrukturen von Spezies zu Spezies variiert. Postuliert wird in diesen Arbeiten, dass innerhalb des Genoms von Eukaryonten ein höherer Grad an struktureller Information über Proteinstrukturen in der Nukleinsäuresequenz enthalten ist, als dies auf Seiten des prokaryontischen Genoms der Fall ist. In den oben genannten Veröffentlichungen von Komar, Cortazzo, Crombie oder auch Ramachandrian sind sowohl eukaryontische als auch prokaryontische Proteine genutzt worden, um den Einfluss von synonymen Codon Substitutionen vornehmlich innerhalb von ausgewählten Loop-Regionen deutlich zu machen. Das heißt, dass auch in prokaryontischen Systemen synonyme Codons über ihre Translationselongationsraten oder aber über die Ausbildung veränderter mRNA Sekundärstrukturen Informationen zur Konformationsfindung von Proteinen enthalten. Die Veränderungen des Translationsprofils, wie sie in der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurden, haben auf die heterologe Expression der Haloalkan Dehalogenase allerdings keinen Einfluss.

#### **4.3.4. Auswirkungen von Punktmutationen auf die *in vivo* Proteinfaltung**

Dass sich das Löslichkeitsverhalten der Haloalkan Dehalogenase nicht allein über die im Abschnitt 4.3.2 beschriebene Formel nach Wilkinson und Harrison beschreiben lässt, zeigt die Punktmutation innerhalb der Haloalkan Dehalogenase DSD4, die an Position 107 eingeführt wurde. Das an Position 107 befindliche Histidin<sup>107</sup> bildet mit der Aminosäure Aspartat<sup>108</sup> einen Loop zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt  $\beta$ 5 und der anschließenden  $\alpha$ -Helix  $\alpha$ C. Das Aspartat<sup>108</sup> gehört zu der katalytischen Triade des Enzyms und bildet innerhalb dieser das Nukleophil. Der Bereich um diese Loop-Region ist über die bekannten Haloalkan Dehalogenasen hinweg hoch konserviert, siehe Abbildung 4-12.

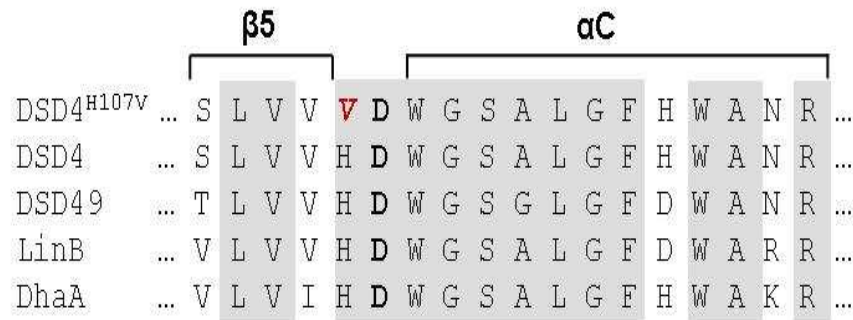
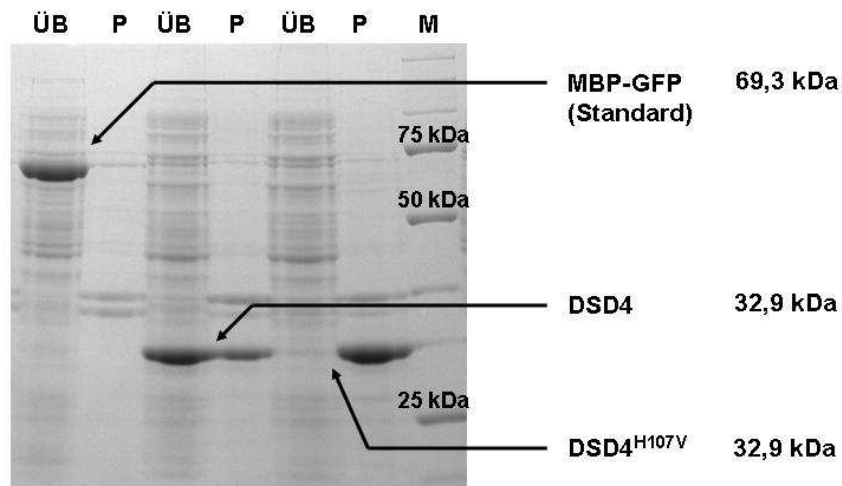


Abbildung 4-12: **Ausschnitt eines Alignments der Aminosäuresequenzen der Haloalkan Dehaloalkan DSD4, DSD49, LinB und DhaA.** Gezeigt ist die Region des  $\beta$ -Faltblatts  $\beta 5$  und der anschließenden  $\alpha$ -Helix  $\alpha C$ . Die über alle Sequenzen hinweg konservierten Bereiche sind grau unterlegt. Das katalytisch aktive Aspartat ist schwarz und das in der Punktmutante DSD4<sup>H107V</sup> eingebrachte Valin rot und kursiv hervorgehoben. Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk.clustalw> (Stand Januar 2006)) erstellt.

In einem Versuch die Enantioselektivität des Enzyms über eine räumliche Veränderung des aktiven Zentrums zu erhöhen, wurde am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart Histidin<sup>107</sup> gegen die Aminosäure Valin ausgetauscht. Versuche in dem Wirtstamm *E. coli* BL21(rh<sup>a</sup>) zeigten, dass unter gleichen Kultivierungsbedingungen die Löslichkeit des Proteins von 50 % (DSD4) auf 5 % (DSD4<sup>H107V</sup>) sinkt, siehe Abbildung 4-13. Weder die Aminosäure Histidin noch Valin gehen in die Formel von Wilkinson ein, so dass diese Aminosäuren auf den Löslichkeitsindex ( $CV-CV'$ ) des Proteins keinen Einfluss nehmen. Dass dennoch eine Punktmutation einen so erheblichen Einfluss auf die Proteinfaltung hat, schließt eine einfache Betrachtungsweise über die summarische Erfassung einzelner Aminosäuregruppen nach Wilkinson und Harrison im Fall der Haloalkan Dehalogenase DSD4 aus.



A)



B)

Protein	Expression relativ zum Standard (%)	Verhältnis (%)	
		Überstand	Pellet
MBP-GFP	100	86 ± 0,1	14 ± 0,1
DSD4	59,8 ± 2,1	55 ± 5,1	45 ± 4,8
DSD4 <sup>H107V</sup>	56,7 ± 2,1	5 ± 2,3	95 ± 2,3

Abbildung 4-13: Kultivierung von *E. coli* BL21 (rha<sup>-</sup>) pTST101, pJO4036 DSD4 und pJOE4036 DSD4<sup>H107V</sup> in LB-Medium bei 30 °C. Dargestellt sind die Ergebnisse bezüglich des Expressionsniveaus und der Löslichkeit der Proteine in Form von (A) einer SDS-Gelelektrophorese (von links nach rechts: MBP-GFP, DSD4 und DSD4<sup>H107V</sup>. Aufgetragen ist jeweils die lösliche (ÜB) und unlösliche (P) Fraktion des Zellrohextrakts) und (B) in Form einer Übersichtstabelle, wobei die prozentualen Angaben des Expressionsniveaus von DSD4 und DSD4<sup>H107V</sup> in Bezug auf das Standardprotein MBP-GFP zu sehen sind. Die Auswertung des SDS-Gels erfolgte über densitometrische Messungen mit dem Programm Image Master<sup>®</sup> VDS Software (Version 2.0).

Punktmutationen an der Position 107 können, wie es für das Enzym DSD4<sup>H107V</sup> gezeigt wurde, zu erheblichen Veränderungen während des Faltungsprozesses des Proteins führen. Dies kann, auf Grund des Aminosäureaustausches, auf die Veränderungen der biochemischen Eigenschaften an dieser Position zurückzuführen sein. Die Aminosäuren Histidin und Valin unterscheiden sich erheblich in ihren bio- und

stereochemischen Eigenschaften voneinander. Histidin ist mit Lysin und Arginin der Gruppe der positiv geladenen Aminosäuren zuzuordnen, wohingegen Valin zu den hydrophoben, aliphatischen Aminosäuren gehört. Eine Zusammenfassung der bio- und stereochemischen Eigenschaften, der zu diesen zwei Gruppen gehörenden Aminosäuren, ist in Tabelle 4-11 wiedergegeben.

Tabelle 4-11: **Molmassen und biochemische Eigenschaften zweier Aminosäure Gruppen**, denen die Aminosäuren Histidin und Valin angehören (Sambrook and Russell 2001).

AS	Molmasse (Da)	van der Waals Volumen	pI-Wert	biochemische Eigenschaften	
Histidin	155	118	7,6	positiv geladen	
Arginin	174	148	10,7	positiv geladen	
Lysin	146	135	9,6	positiv geladen	
Valin	117	105	6,0	hydrophob	aliphatisch
Alanin	89	67	6,1	hydrophob	
Isoleucin	131	124	6,0	hydrophob	aliphatisch
Leucin	131	124	6,0	hydrophob	aliphatisch

Valin besitzt eine hydrophobe Seitenkette und gehört mit 117 Da zu den kleineren Aminosäuren. Demgegenüber nimmt Histidin mit 155 Da einen größeren Raum ein und besitzt zudem eine basische Seitenkette. Anhand des Strukturmodells der Haloalkan Dehalogenase DSD4 wird deutlich, dass der Austausch von Histidin gegen Valin zu einer räumlichen Erweiterung des Aktiven Zentrums führt, siehe Abbildung 4-14. Dies sollte zu einer erhöhten Stereoselektivität des Enzyms führen. Die hydrophobe Seitenkette des Valins kann möglicherweise eine Interaktion mit anderen Aminosäuren, im aktiven Zentrum verhindern und so zu einer Aggregation der entstehenden Polypeptidketten führen. Die Folge dessen ist die Akkumulation des Enzyms in unlöslicher Form als „Inclusion bodies“ (IB), so dass sich ein Nachweis der veränderten Stereoselektivität des Enzyms schwierig gestaltet.

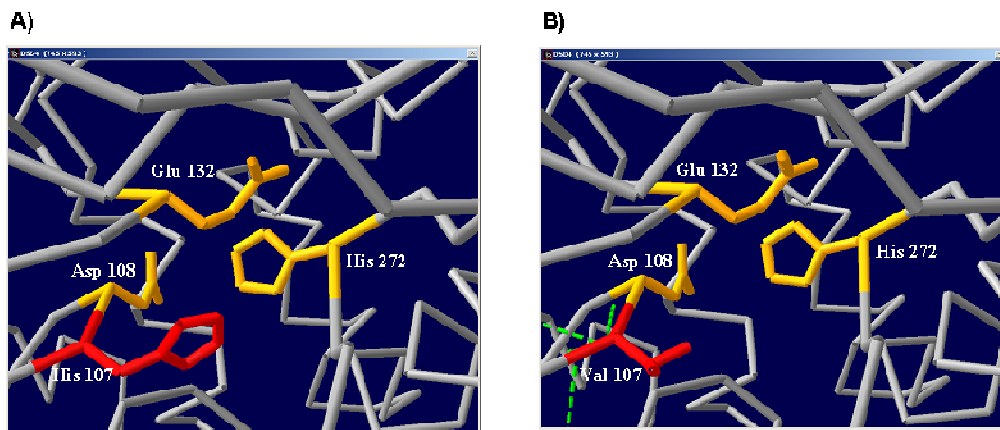


Abbildung 4-14: **Strukturmodell der Haloalkan Dehalogenase DSD4 mit dem Fokus auf das aktive Zentrum** (Aspartat<sup>108</sup> – Glutamat<sup>132</sup> – Histidin<sup>272</sup>). Dargestellt ist (A) DSD4 und (B) die Punktmutante DSD4<sup>H107V</sup> mit Hilfe des Programms Deep View/Swiss-Pdb Viewer (Version 3.7), basierend auf dem vom Institut für Technische Biochemie erstellten Strukturmodell. Die katalytisch aktiven Aminosäuren sind in Gelb dargestellt, die Punktmutation betreffende Aminosäure in Rot.

Werden die Betrachtungen in diesem Fall ausschließlich auf die Problematik der Proteinlöslichkeit gerichtet, so ist die Frage zu klären, ob die Löslichkeit des Proteins allein an den biochemischen Eigenschaften der an Position 107 befindlichen Aminosäure festzumachen ist. Der Austausch des Histidin<sup>107</sup> gegen eine Aminosäure mit ähnlichen proteinchemischen Eigenschaften wie Arginin oder Lysin sollte entsprechend zu einem löslichen Endprodukt führen. Arginin wie auch Lysin wurden an Stelle des Histidin<sup>107</sup> über die Codons CGA bzw. AAG über die Quick Change Methode nach Stratagene (<http://www.stratagene.com/manuals> Stand: Januar 2006) eingeführt. Beide Aminosäuren haben an dieser Position zur Folge, dass die Proteine DSD4<sup>H107R</sup> und DSD4<sup>H107K</sup> in Form von „Inclusion bodies“ in der Zelle akkumulieren. In beiden Fällen ist das Verhältnis zwischen löslichem und unlöslichem Anteil des Proteins 5 % zu 95 %. Dies entspricht dem Ergebnis im Fall des Einbaus der hydrophoben Aminosäure Valin<sup>107</sup>, bei dem das heterologe Protein ebenfalls in Form von „Inclusion bodies“ im Zytoplasma der Zelle akkumuliert. Die Hypothese, dass Aminosäuren mit ähnlichen proteinbiochemischen Eigenschaften wie Histidin zu löslichen Endprodukten führen, muss demzufolge verworfen werden. Anhand der Strukturmodelle von DSD4<sup>H107R</sup> und DSD4<sup>H107K</sup> läßt sich in Abbildung 4-15 erkennen, dass die Aminosäuren Arginin und Lysin räumlich gesehen eine zur Aminosäure Histidin<sup>107</sup> ähnlichen Konformation einnehmen. Dennoch ist es möglich, dass das Histidin<sup>107</sup> eine stabilisierende Wirkung auf die Struktur des aktiven Zentrums hat

und diese mit der Inkooperation anderer Aminosäuren, wie z.B. Lysin oder Arginin verloren geht.

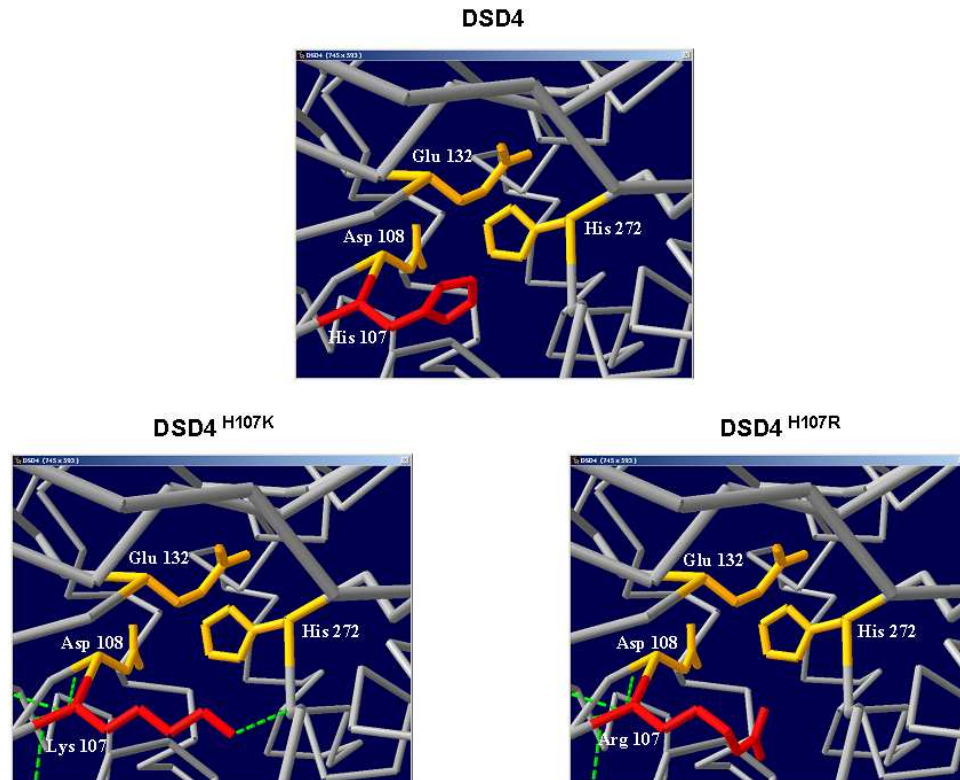


Abbildung 4-15: Gezeigt ist ausgehend von dem Strukturmodell der Haloalkan Dehydrogenase DSD4, das Modell des aktiven Zentrums nach dem gezielten Austausch der Aminosäure Histidin<sup>107</sup> gegen Arginin (DSD4<sup>H107R</sup>) bzw. Lysin (DSD4<sup>H107K</sup>). Das Modell wurde), basierend auf dem vom Institut für Technische Biochemie erstellten Strukturmodell, mit Hilfe des Deep View/Swiss-Pdb Viewer (Version 3.7) erstellt. Hierbei sind die katalytisch aktiven Aminosäuren in Gelb dargestellt und die Punktmutation betreffenden Aminosäuren in Rot.

Eine andere Hypothese für die Akkumulation von Einschlusskörpern ist die in Abschnitt 4.3.3 angesprochene Modulation der Translationselongationsrate, die mit dem Austausch von Histidin gegen Valin an Position 107 einhergeht. Histidin, das in DSD4 an Position 107 über das Codon CAC codiert wird, ist in den Betrachtungen von Arnold (Arnold 2003, Arnold et al. 2005) mit einer  $(k_{TEL})_{eff}$  von 20,6 AS s<sup>-1</sup> festgesetzt. Demgegenüber wird Valin über das Codon GUG mit einer  $(k_{TEL})_{eff}$  von 12,7 AS s<sup>-1</sup> erheblich langsamer translatiert. Ebenso werden die zuvor eingefügten Codons für Arginin und Lysin mit geringen Translationselongationsraten von  $(k_{TEL})_{eff}^{CGA} = 9,1$  und  $(k_{TEL})_{eff}^{AAG} = 14,1$  AS s<sup>-1</sup> translatiert. Aufgrund dessen könnte neben den Eigenschaften der Aminosäuren Histidin und Valin auch die Translation-

selongationsrate ( $k_{TEL})_{eff}$  der Codons an dieser Position eine wichtige Rolle spielen. Valin besitzt ausschließlich synonyme Codons, die mit geringen Translationselongationsraten translatiert werden. Mit dem Ersatz von Valin durch eine adäquate Aminosäure mit gleichen biochemischen Eigenschaften wird im folgenden untersucht, ob über die Erhöhung der ( $k_{TEL})_{eff}$  Einfluss auf die Proteinlöslichkeit genommen wird. Aus diesem Grund wurde Leucin an Stelle der unpolaren aliphatischen Aminosäure Valin an Position 107 eingesetzt. Leucin besitzt sechs synonyme Codons, die alle relativ hohe Translationselongationsraten von 22,1 bis 24,0 AS s<sup>-1</sup> aufweisen, siehe Tabelle 4-8. Herausgegriffen wird das Codon *CUG*, welches mit 24,0 AS s<sup>-1</sup> translatiert wird und zudem ebenso wie das Valin Codon *GUG* innerhalb der jeweiligen Aminosäure das am häufigsten genutzte Triplet innerhalb des Wirtsorganismus *E. coli* darstellt. Als Ergebnis erhält man, dass die Erhöhung der Translationselongationsrate an dieser Position des Enzyms nicht zu einer Erhöhung der Löslichkeit führt. Ebenso wie bei der Haloalkan Dehydrogenase DSD4<sup>H107V</sup> liegen auch bei der Proteinvariante DSD4<sup>H107L</sup> 95 % des Enzyms in Einschlusskörpern vor. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der Effekt einer erhöhten ( $k_{TEL})_{eff}$  an dieser Position von den Unterschieden der biochemischen Eigenschaften der Aminosäuren Histidin und Leucin bzw. Valin überlagert wird.

Um den Einfluss der Aminosäuren vollständig auszuschließen, sollte eine Veränderung des Histidins idealerweise nur auf Ebene der Nukleinsäuresequenz stattfinden. Die zwei für die Aminosäure Histidin codierenden Codons *CAC* und *CAU* besitzen allerdings ähnlich hohe Translationselongationsraten von 20,6 bzw. 22,2 AS s<sup>-1</sup>, so dass eine verlangsamte ( $k_{TEL})_{eff}$  nicht realisiert werden kann. Aus diesem Grund wird wie bereits zuvor beschrieben auf die Aminosäuren Arginin und Lysin zurückgegriffen, welche Translationselongationsraten von 9,1 AS s<sup>-1</sup> (*CGA*) bzw. 14,1 AS s<sup>-1</sup> (*AAG*) aufweisen. In beiden Fällen akkumuliert das rekombinante Protein in Einschlusskörpern, wobei auch in diesem Versuch nicht direkt zwischen dem Einfluss der Aminosäure- Eigenschaften und den veränderten Translationselongationsraten unterschieden werden konnte.

Interessanterweise kann für die Aminosäure Lysin gezeigt werden, dass die Proteinexpression auch auf Ebene der Nukleinsäuresequenz beeinflussbar ist. Ausschlaggebend für die Proteinexpression ist in diesem Fall das für die Aminosäure Lysin codierende Triplet. Die Aminosäure Lysin wird von zwei Triplets *AAG* und *AAA* codiert. Diese Triplets zählen nicht zu den von *E. coli* selten genutzten Codons. Dennoch gibt es innerhalb der „codon usage“ von *E. coli* eine Präferenz für das Triplet *AAA*, das gegenüber dem Triplet *AAG* dreimal so häufig genutzt wird.

An Stelle des Histidin<sup>107</sup> wird in der Haloalkan Dehalogenase DSD4 über die Quick Change Methode die Aminosäure Lysin sowohl über das Codon AAA als auch über das Triplet AAG eingeführt. Die Ergebnisse der Expressionsstudien mit den generierten DSD4 Varianten sind in Abbildung 4-16 A) bis C) dargestellt.

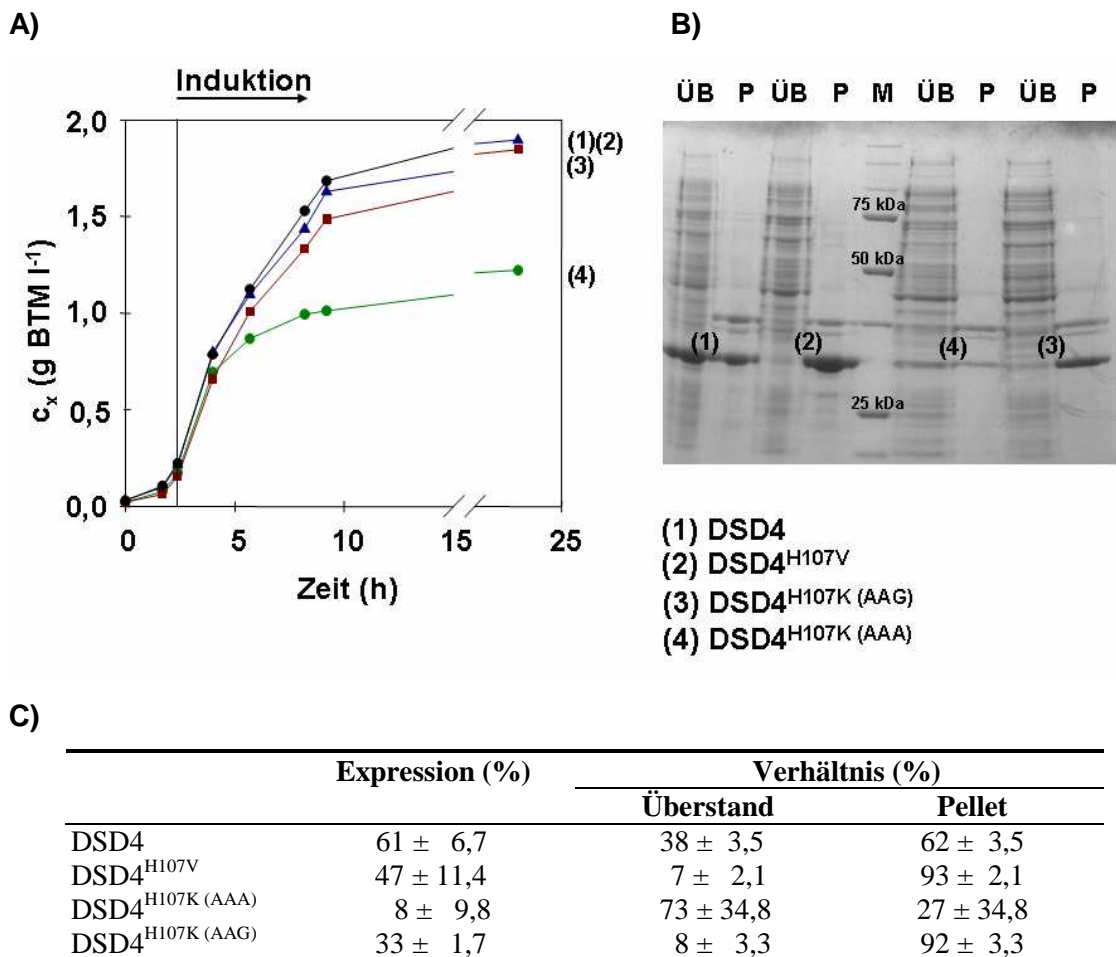


Abbildung 4-16: **Expressionsversuch mit *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) pJOE4036 DSD4 (1)/ DSD4<sup>H107V</sup> (2)/ DSD4<sup>H107K (AAA)</sup> (4) und DSD4<sup>H107K (AAG)</sup> (3) in LB-Medium bei 30 °C.** Dargestellt ist A) der Wachstumsverlauf anhand der Biotrockenmasse über der Zeit. B) SDS-PAGE Analyse des Zellproteins am Ende der Kultivierung, wobei abwechslungsweise der Überstand (ÜB) und das Zellpellet (P) aufgetragen ist. M ist die Abkürzung des Molekulargewichtsmarkers. C) Tabelle über den Anteil der heterologen Proteine am Gesamtprotein bzw. das Verhältnis zwischen der löslichen und unlöslichen Fraktion des Proteins.

Die Expression dieser Proteine in dem Wirtsorganismus *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) führt bereits während der Kultivierung der beiden Stämme zu unterschiedlichen Wachstumsverläufen, was sich auf die Endbiomassekonzentrationen auswirkt. Der Stamm, der Lysin an Position 107 des Enzyms über das Triplet AAA codiert, bildet 30 %

weniger Biotrockenmasse gegenüber dem komplementären Stamm mit dem Lysin Codon AAG.

Bei rekombinanten *E. coli* Stämmen, die Plasmide für die heterologe Expression von Proteinen tragen, gibt es beobachtbare Unterschiede sowohl in der spezifischen Wachstumsrate als auch in den Biomassenausbeuten. Diese Unterschiede ergeben sich zwischen Stämmen, die das rekombinante Protein exprimieren und den nicht induzierten Kontrollstämmen. Ausschlag gebend dafür ist nach Hoffmann (Hoffmann and Rinas 2001) die erhöhte respiratorische Aktivität des Organismus auf Grund des höheren Energiebedarfs durch die zusätzliche Synthese des rekombinanten Proteins. Im Fall der heterologen Expression der Haloalkan Dehalogenasen DSD4<sup>H107K (AAA)</sup> und DSD4<sup>H107K (AAG)</sup> haben zunächst beide *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) Stämme den selben Energiebedarf. Dennoch kommt es innerhalb von Wachstumsversuchen zu Differenzen in der Biotrockenmasse von 30 % am Ende der Kultivierung (Abbildung 4-16 A).

Dieses Ergebnis der verringerten Bioendmassekonzentration wurde bereits in einer Veröffentlichung von Schmidt (Schmidt et al. 1999) beschrieben. Die Inhibierung des Wachstums wurde hierbei für den *E. coli* Stamm BL21(DE3) pETRE3H gezeigt. Die Plasmide pETRE9H und pETRE3H codieren beide den C-Terminus des VP60 Capsid-Protein eines Virus. In pETRE3H ist der N-Terminus des heterologen Proteins an die Signalsequenz eines periplasmatischen Polypeptids fusioniert, welche das Genprodukt proteolytisch instabil macht. Der Referenzstamm enthält das Plasmid pETRE9H, wobei das codierte Protein N-terminal einen „Peptid- Tag“ trägt. Der „Peptid- Tag“ hat zur Folge, dass das Protein für den proteolytischen Abbau unzugänglich wird und daher als „Inclusion bodies“ anfällt. Die Wachstumsinhibierung des *E. coli* BL21(DE3) Stamms, der das proteolytisch instabile Capsid-Protein exprimiert, wurde in der Veröffentlichung von Schmidt auf den erhöhten Energiebedarf einer ATP abhängigen Protease zurückgeführt.

Bei einer näheren Analyse der exprimierten Haloalkan Dehalogenasen DSD4<sup>H107K (AAA)</sup> und DSD4<sup>H107K (AAG)</sup> zeigt sich, dass das erst genannte Protein weniger stark in der Zelle akkumuliert. Die Haloalkan Dehalogenase DSD4 mit dem Lysin<sup>107</sup> Codon AAA besitzt einen deutlich geringeren Anteil am Gesamtprotein von 5 % bis 10 % als das Protein mit dem Triplet AAG an Position 107. Die Dehalogenase DSD4<sup>H107K (AAG)</sup> liegt von ihrem Expressionsniveau im Bereich der ursprünglichen Haloalkan Dehalogenase DSD4 mit einem Anteil am Gesamtprotein von 30 %. Allerdings liegt diese fast ausschließlich in Form von „Inclusion bodies“ vor. Die Akkumulation des Proteins in Form inerter Einschlusskörper verhindert den proteolyti-

schen Abbau des Enzyms. Anhand der SDS-PAGE wird ersichtlich, dass DSD4<sup>H107K (AAA)</sup> nicht während des Faltungsprozesses als „Inclusion bodies“ angehäuft wird. Aus diesem Grund ist vermutlich das Protein für Proteasen zugänglich und kann abgebaut werden. Der zusätzliche Energieaufwand der Zelle für den proteolytischen Abbau des Enzyms ist in Zusammenhang mit der zu beobachtenden Wachstumsinhibierung zu sehen. Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, dass die heterologe Proteinexpression und Proteinfaltung nicht nur auf Ebene der Aminosäuresequenz des Proteins beeinflusst wird, sondern detaillierter betrachtet, sich bereits auf Ebene der Nukleinsäuresequenz manifestiert.

Bereits Pedersen (Pedersen 1984) konnte zeigen, dass die intrazelluläre Proteinsynthese am Ribosom mit variablen Translationsraten abläuft. In späteren Literaturquellen wird auf einen Zusammenhang zwischen der Nutzung von synonymen Codons innerhalb der Nukleinsäuresequenz und der Sekundärstruktur des Proteins hingewiesen (Thanaraj and Argos 1996; Oresic and Shalloway 1998; Gu et al. 2004). Hierbei spielen vor allem in *E. coli* selten genutzte Codons in Loop-Regionen oder in Regionen zwischen zwei Proteindomänen eine Rolle. Es wird vermutet, dass die Verzögerung der Translation an diesen Positionen eine schrittweise Proteinfaltung ermöglicht. Zudem konnte in Veröffentlichungen über die Änderung der Translationskinetik, wie in Abschnitt 4.3.3 dargestellt, Einfluss auf die *in vivo* und *in vitro* Proteinfaltung genommen werden (Crombie et al. 1992; Komar et al. 1999). Allerdings gingen diese Veränderungen der Translationsprofile ausschließlich mit einer verminderten Proteinlöslichkeit einher, nicht aber mit dem proteolytischen Abbau des synthetisierten Proteins.

### **4.3.5. Zusammenfassung der modellgestützten Ansätze zur Optimierung der heterologen Genexpression von Haloalkan Dehalogenasen**

Die Analyse der Nukleinsäuresequenzen der Haloalkan Dehalogenasen DhaA, DSD4 und DSD49 zeigt, dass alle drei Sequenzen einen relativ hohen Anteil von 7 % bis 8 % an seltenen Codons, in Bezug auf die „codon usage“ von *E. coli*, enthalten. Die Expression der Haloalkan Dehalogenasen in *E. coli* BW3110 unter gleichen Kultivierungsbedingungen zeigt, dass dennoch die gebildeten Produktmengen der rekombinanten Proteine von DhaA über DSD4 bis hin zu DSD49 stark abnehmen. Über die Supplementierung von tRNAs selten genutzter Triplets konnte zunächst ausgeschlossen werden, dass das geringe Expressionsniveau von DSD4 und DSD49 auf die seltenen Codons zurückzuführen ist. Setzt man die Nukleinsäuresequenzen der Haloalkan Dehalogenase in Relation zu in *E. coli* hoch exprimierten Genen



( $CAI > 0,9$ ), so erhält man für *dhaA*, *dsd4* und *dsd49* *CAI*-Werte die sich im Bereich von 0,2 befinden. Das heißt, auch die ermittelten *CAI*-Werte, die sich auf die gesamte Nukleinsäuresequenz beziehen, geben keinen Aufschluss auf das unterschiedliche Expressionsverhalten der drei Haloalkan Dehalogenasen.

Möglich ist, dass die Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 kurz nach ihrer Synthese im Zytoplasma der Zelle Degradationsprozessen unterliegen, und so eine Akkumulation des Enzyms verhindert wird. Es konnte in der Literatur gezeigt werden, dass der proteolytische Abbau von neu synthetisierten Proteinen mit einem erhöhten Energiebedarf der Zelle einhergeht was zur Inhibierung des Wachstums führt (Schmidt et al. 1999). Eine solche Wachstumsinhibierung tritt jedoch bei den *E. coli* Stämmen, die die Haloalkan Dehalogenasen DSD4 oder DSD49 exprimieren im Vergleich zu dem Wachstumsverlauf von *E. coli* pJOE4036 DhaA nicht auf. Demzufolge manifestieren sich die Unterschiede der Expressionsniveaus in den Aminosäuresequenzen an sich oder auf Ebene der Nukleinsäuresequenzen.

Die in dem Abschnitt 4.3 vorgestellten Ansätze sind im Allgemeinen dahingehend ausgerichtet, dass versucht wird eine Angleichung der Haloalkan Dehalogenase DSD4 bzw. DSD4<sup>H107V</sup> an die, in *E. coli* gut exprimierte Dehalogenase DhaA zu erzielen. Dies ist zum einen in Abschnitt 4.3.2 auf Ebene der Aminosäuresequenz, zum anderen in Abschnitt 4.3.3 auf Nukleinsäuresequenzebene durchgeführt worden.

Grundlage für die in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Veränderungen auf Aminosäuresequenzebene, bildete das Löslichkeitsmodell nach Wilkinson und Harrison (Wilkinson and Harrison 1991). Anfang der 90er wurden hierfür 81 Proteine einer statistischen Analyse unterzogen, die teilweise während der Expression in *E. coli* unter Wachstumsbedingungen von 37 °C Einschlusskörper bilden. Die Analyse erfolgte in Hinblick auf sechs unterschiedliche Parameter. Es wurde sowohl die durchschnittliche Ladung des Proteins, der Anteil an Loop bildenden Aminosäuren, der Anteil der Aminosäure Cystein und Prolin, die Hydrophobizität des Proteins sowie die Gesamtzahl der Aminosäuren hinsichtlich des Einflusses auf die Bildung von „Inclusion bodies“ analysiert. Es kristallisierte sich heraus, dass vor allem die beiden erst genannten Faktoren stark mit der Synthese von unlöslichen Proteinen korrelieren. Eine modifizierte Version dieses Löslichkeitsmodells wurde in einer Veröffentlichung von Davis (Davis et al. 1999) genutzt, um Vorhersagen über die Löslichkeit unterschiedlicher Fusionsproteine zu treffen. Hier konnte gezeigt werden, dass das humane Interleukin-3 über die C-terminale Fusion mit NusA löslich bzw. mit Thioredoxin fusioniert unlöslich exprimiert wird, was zuvor über das Löslichkeitsmodell vor-

hergesagt werden konnte. Ein Umkehrschluss, dahingehend mit Hilfe dieses Modells über gerichtete Mutagenese gezielt Aminosäuren auszutauschen, die die Löslichkeit des Proteins beeinflussen, ist in der Literatur bis dato nicht beschrieben. Dieses modifizierte Modell nach Davis wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um durch den gezielten Austausch von Aminosäuren den Löslichkeitsindex von DSD4 zu erhöhen. Auf Modellebene konnte durch den Austausch von 17 Aminosäuren erreicht werden, dass der Löslichkeitsindex von DSD4 von 0,94 auf – 0,63 erhöht wird, was einer Wahrscheinlichkeit von 65 % entspricht, dass das Protein in löslicher Form vorliegt. Experimentell führte dies allerdings zu einem vollständigen Verlust der Proteinlöslichkeit. Trotzdem die gezielten Mutationen, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, in Anlehnung an die Haloalkan Dehalogenase DhaA erfolgten, besaßen diese keinen positiven Effekt auf die Löslichkeit des DSD4 Proteins. Diese, gegenüber der Veröffentlichung von Davis (Davis et al. 1999) umgekehrte Herangehensweise an die Löslichkeitsproblematik rekombinanter Proteine zeigt, dass nicht allein die in das Modell eingehenden Parameter, wie die Ladung des Proteins oder die Anzahl der Loop bildenden Aminosäuren, die Löslichkeit determinieren. Dies kann im Übrigen auch am Beispiel des Maltosebinde Proteins (MBP) gezeigt werden. Dieses aus *E. coli* stammende Protein wird in der rekombinanten Proteinsynthese oftmals als Fusionsprotein eingesetzt, um eine Verminderung von Einschlusskörpern während der Synthese zu erzielen (di Guan et al. 1988). MBP selbst als auch Fusionsproteine wie MBP-DSD4 werden nach dem modifizierten Modell nach Davis mit einer Wahrscheinlichkeit von 55 % bzw. 68 % unlöslich vorausgesagt. Experimentell kann hier allerdings am Beispiel des Fusionsproteins MBP-DSD4 in Abschnitt 4.2.4 gezeigt werden, dass etwa 50 % des Proteins in löslicher Form im Zytoplasma vorliegt. Auch auf die in Abschnitt 4.3.4 näher eingegangene Punktmutation H107V innerhalb der Haloalkan Dehalogenase DSD4 hat einen erheblichen Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins. Allerdings geht weder die Aminosäure Histidin noch Valin in den beschriebenen Löslichkeitsindex ein. Vorstellbar ist hier, dass eine Vorhersage der Löslichkeit über das Modell von Harrison und Wilkinson lediglich auf unmodifizierte Proteine angewendet werden kann, das heißt auf Proteine eines Organismus, die nicht nachträglich einer gerichteten oder ungerichteten Mutagenese unterzogen worden sind. Allerdings gibt es auch hier offenbar, wie im Fall des MBP, Ausnahmen.

Der zweite Ansatz zielte auf die Veränderung von Translationselongationsraten durch den Austausch einer Reihe von synonymen Triplets ab. Die Anpassung der Translationselongationsrate von DSD4 an die von DhaA hatte keine signifikante Än-

derung der Proteinlöslichkeit zur Folge. Das Ergebnis dieses Ansatzes ist nicht eindeutig zu interpretieren. Zunächst ist in diesem Fall keine Veränderung der Aminosäuresequenz durchgeführt worden. Wäre allein die Aminosäuresequenz determinierend für die Löslichkeit, ist klar, dass in diesem Ansatz keine Veränderung hinsichtlich der Bildung von „Inclusion bodies“ zu verzeichnen ist. Dass nicht nur allein die Aminosäuresequenz sondern auch die Nukleinsäuresequenz einen erheblichen Einfluss darauf hat, ob ein Protein in löslicher Form synthetisiert wird, geht aus unterschiedlichen Literaturquellen hervor (z.B. (Komar et al. 1999; Cortazzo et al. 2002)). Der gewählte Ansatz versucht die Translationselongationsraten einzelner Triplets von DSD4 über das gesamte Gen hinweg an die von DhaA anzupassen. Aufgrund einer Homologie von 75 % auf Aminosäuresequenzebene zwischen den beiden Enzymen, kann lediglich 53 % der Gensequenz an die gewünschten Translationselongationsraten durch den Austausch von synonymen Codons angepasst werden. In der Literatur sind vorwiegend Loop-Regionen beschrieben, die über ihre Translationsgeschwindigkeit maßgebend die Löslichkeit rekombinater Proteine beeinflussen, wobei hier eine Reihe aufeinanderfolgender Triplets (Crombie et al. 1992; Komar et al. 1999) oder auch einzelne Positionen (Ramachandiran et al. 2002) ausschlaggebend sein können. Die Haloalkan Dehalogenase DSD4 besteht aus acht  $\beta$ -Faltblättern, die von sechs  $\alpha$ -Helices umgeben sind, und einer Cap-Domäne, die von fünf  $\alpha$ -Helices gebildet wird. Insgesamt werden diese Sekundärstrukturen über 18 Loop-Regionen miteinander verknüpft (siehe Abbildung 1-4). Abweichungen in den Translationselongationsraten innerhalb von Loop-Strukturen, die nicht korrigiert werden konnten, sind vor allem im Bereich der Cap-Domäne zu finden. Aber auch Loop-Regionen, wie z.B. zwischen der  $\alpha$ -Helix  $\alpha$ B und dem  $\beta$ -Faltblatt  $\beta$ 5 oder zwischen  $\beta$ 6 und  $\alpha$ D, konnten nicht vollständig an das Translationsprofil der Haloalkan Dehalogenase DhaA angepasst werden. Auch innerhalb der Sekundärstrukturen selbst sind noch erhebliche Abweichungen der Translationselongationsraten zwischen DSD4 und DhaA zu verzeichnen. Hier wird es schwierig zu beurteilen, ob ein positiver Einfluss auf die Proteinlöslichkeit hätte gezeigt werden können, wenn eine vollständige Anpassung der Translationselongationsraten hätte durchgeführt werden können. Eine Aussage darüber welche Rolle die Loop-Regionen dabei spielen, kann anhand dieses Beispiels nicht getroffen werden.

Die in dem Abschnitt 4.3.4 näher betrachtete Punktmutation H107V innerhalb der Haloalkan Dehalogenase DSD4 liegt in der Verbindung zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt  $\beta$ 5 und der darauf folgenden  $\alpha$ -Helix  $\alpha$ C. Die an Position 108 befindliche Aminosäure Aspartat<sup>108</sup> gehört zu der katalytischen Triade des Enzyms. Die in diesem Kapitel

durchgeführten Versuche zeigen, dass eine Position innerhalb der Aminosäuresequenz des Enzyms oder in Bezug auf synonyme Codons ausreichend ist, um einen erheblichen Einfluss auf die Löslichkeit bzw. auf die Stabilität des Proteins zu haben. Die gerichtete Mutagenese über die die Aminosäure Histidin<sup>107</sup> gegen Lysin ausgetauscht wurde, macht deutlich, dass es Unterschiede zwischen den für die Aminosäure Lysin codierenden Triplets gibt. Das Codon AAG verursacht wie auch, das über das Codon GUG translatierte Valin eine Akkumulation des rekombinanten Proteins in Form von „Inclusion bodies“. Demgegenüber hat das Einbringen des Lysin Codons AAA einen proteolytischen Abbau des Proteins im Zytoplasma zur Folge. Beide Triplets gehören nicht zu den in *E. coli* selten genutzten Codons, wobei es dennoch eine deutliche Präferenz für das Codon AAA ( $n_j^{aa_i}$  76 %) an Stelle des AAG ( $n_j^{aa_i}$  24 %) Triplets gibt. An dieser Position kommt es im Vergleich zu dem Lysin Codon AAG ( $(k_{TEL})_{eff} = 14,1 \text{ AS s}^{-1}$ ) durch das Einsetzen des Codons AAA zu einer Erhöhung der Codon spezifischen Translationsrate um  $9,1 \text{ AS s}^{-1}$ . Dadurch bedingt muss es zu Konformationsänderung kommen, die die neu synthetisierte Polypeptidkette zytoplasmatischen Proteasen zugänglich macht. Gegenüber der ursprünglichen Translationselongationsrate des Histidin Codons CAC ( $(k_{TEL})_{eff} = 20,6 \text{ AS s}^{-1}$ ) findet hier eine Erhöhung der Translationsgeschwindigkeit um  $2,9 \text{ AS s}^{-1}$  statt. Gezeigt werden konnte in der Literatur bislang lediglich, dass, N-terminal fusionierte Polypeptide Einfluss auf die Stabilität rekombinanter Proteine nehmen, und damit verbunden das Wachstum der Wirtsstämme beeinflusst (Schmidt et al. 1999). Nicht aber konnte gezeigt werden, dass bereits ein einzelnes synonymes Triplet Ursache für den proteolytischen Abbau eines Proteins sein kann.

#### 4.4. Experimentelle Methoden versus modellgestützte Ansätze

In der Biotechnologie besteht heute zu Tage eine große Nachfrage hinsichtlich verschiedenster funktionaler Proteine, die in aktiver Form vorliegen müssen. Dabei reicht es oftmals nicht mehr aus, diese Proteine aus ihrer natürlichen Umgebung zu isolieren. Vielmehr treten diese Verfahren zunehmend in den Hintergrund, zu Gunsten der rekombinanten Proteinsynthese, die beispielsweise innerhalb von Mikroorganismen durchgeführt wird. Ein großes Problem bei der Expression von Fremdproteinen innerhalb dieser Organismen ist die Bildung von so genannten „Inclusion bodies“ (IB), die eine Anhäufung des rekombinanten Proteins im Zytoplasma der Zelle darstellen.

Im Fall der Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 liegt die Problematik der Proteinexpression sowohl auf Seiten des niedrigen Expressionsniveaus des rekombinanten Proteins gemessen am Anteil des Gesamtproteins, sowie auf Seiten der Synthese von unlöslichem, inaktive Protein im Zytoplasma von *Escherichia coli*. Die besten Ergebnisse hinsichtlich der synthetisierten Produktmenge als auch hinsichtlich der Löslichkeit der Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 wurden im Verlauf der Expressionsoptimierung im Bereich der experimentellen Ansätze erzielt, siehe Abschnitt 4.2. Veröffentlichungen von Holm (Holm 1986), Anderson (Andersson and Kurland 1990) und Arnold (Arnold et al. 2005) postulieren, dass das Expressionsniveau von der Translationsinitiation determiniert wird. In den experimentellen Ansätzen konnte über den Einsatz eines *E. coli* B Stamms an Stelle eines *E. coli* K12 Derivats eine Erhöhung der Produktmenge um den Faktor 10 erzielt werden. Hierbei wurden Faktoren, die für die Translationsinitiation von Bedeutung sind, wie z.B. die Shine-Dalgarno Sequenz, die Distanz zwischen dieser Sequenz und dem Start Codon *AUG* oder auch einzelne Nukleinsäuren, die eine Änderung der mRNA Struktur im Bereich der Initiationsregion bewirken können, nicht verändert. Daher müssen hier wirtsspezifische Faktoren mit der Erhöhung der Produktkonzentration in Verbindung gebracht werden. Beispielsweise kann die verminderte Stress Antwort des *E. coli* B Stamms gegenüber *E. coli* K12 Derivaten (Seo et al. 2003) oder auch das Fehlen der Proteasen OmpT und Lon zu einem erhöhten Expressionsniveau des rekombinanten Proteins beitragen.

Die erhöhte Produktbildung innerhalb von *E. coli* BL21(rha<sup>-</sup>) aller in der Arbeit verwendeten Haloalkan Dehalogenasen, bildete auf experimenteller Ebene die Grundlage für eine Steigerung der Proteinlöslichkeit durch die Herabsetzung der Kultivierungstemperatur. Die fermentative Produktion der Enzyme lässt sich bei 22 °C problemlos realisieren und bewirkt gegenüber 30 °C eine Erhöhung der Proteinlöslichkeit von 10 % auf 45 %.

Für die von der Haloalkan Dehalogenase DSD4 ausgehenden Punktmutante DSD4<sup>H107V</sup> wurde allein über die verminderte Kultivierungstemperatur keine ausreichende Steigerung der Proteinlöslichkeit erzielt, um deren Enzymaktivität zu messen. Mit dem Einsatz von chemischen Chaperonen, siehe Abschnitt 4.2.2, ist die Proteinlöslichkeit von ursprünglich 5 % auf 80 % erhöht worden, gleichzeitig aber der Anteil des Enzyms am Gesamtprotein so stark gesenkt worden, dass eine Messung der Enzymaktivität nicht möglich ist. Abhilfe schaffte die Fusion der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> mit dem Maltosebindeprotein (MBP) in Abschnitt 4.2.4. Trotz ausreichend löslich synthetisierter Proteinmengen des Fusionsproteins MBP-DSD4<sup>H107V</sup> kann in Ansätzen für die Aktivitätsbestimmung keine Umsetzung des

1,2,3-Trichlorpropans gemessen werden. Denkbar ist hier, dass sich die Fusion Konformations bedingt, störend auf die Aktivität des Enzyms auswirkt. Dem gegenüber steht aber, dass für das Fusionsprotein MBP-DSD4 ein Vollumsatz des Substrats in das Produkt 2,3-Dichlor-1-propanol gemessen werden kann. In der weiteren Vorgehensweise ist versucht worden, Ursachen für die fehlerhafte Proteinfaltung der Punktmutante DSD4<sup>H107V</sup> herauszuarbeiten. Aus diesem Grund wurden die Aminosäuresequenz wie auch die Nukleinsäuresequenz der Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD4<sup>H107V</sup> näher betrachtet.

Detaillierte *in vitro* Versuche gaben Aufschlüsse darüber, wie unterschiedlichste Polypeptide ihre native dreidimensionale Struktur erlangen (Anfinsen 1973; Tanford et al. 1973). Basierend auf diesen Studien wurde daher zunächst die Bedeutung der Aminosäuresequenz für die Proteinfaltung in den Vordergrund gestellt. Wenig später wurde jedoch deutlich, dass *in vivo* noch weitere Faktoren, wie z.B. molekulare Chaperone (Feldman and Frydman 2000) oder auch das zytoplasmatische Milieu an sich Einfluss auf die Faltung von neu synthetisierten Polypeptidketten nehmen. Der genaue Einfluss der Nukleinsäuresequenz auf die co-translationale Proteinfaltung ist noch nicht bis im Detail untersucht. Bekannt ist, dass Proteine in *E. coli*, die in einem hohen Maß exprimiert werden, fast ausschließlich von Triplets codiert werden, die innerhalb der „codon usage“ des Organismus häufig vorkommen (Sharp and Li 1987). Zum Großteil korreliert das Vorkommen der jeweiligen tRNAs, die für die Translation der dazugehörigen Codons verantwortlich sind, mit der Triplett Häufigkeit innerhalb der „codon usage“ (Ikemura 1981). Hieraus wurde abgeleitet, dass die tRNA Konzentration die Translationselongationsrate ( $(k_{TEL})_{eff}$ ) der Triplets determiniert (Varenne et al. 1984; Liljenstrom and von Heijne 1987). Allerdings konnten Sorensen (Sorensen and Pedersen 1991) und Curran (Curran and Yarus 1989) zeigen, dass Codons, die von der gleichen tRNA translatiert werden, in ihren Translationselongationsraten variieren. Zurückzuführen ist dies auf die Wechselwirkungen zwischen Codon und Anticodon während der Bindung der Aminoacyl- tRNA. In *E. coli* sind sowohl selten genutzte Codons zu finden, die mit relativ hohen Translationselongationsraten translatiert werden, aber auch Triplets deren  $(k_{TEL})_{eff}$  langsam ist, obwohl sie häufig in der „codon usage“ wieder zu finden sind. Der Einfluss der Nukleinsäuresequenz, insbesondere von synonymen Codons, auf die Löslichkeit von heterolog exprimierten Proteinen wird beispielsweise in den Veröffentlichungen von Cortazzo, Crombie oder Ramachandrian (Crombie et al. 1992; Cortazzo et al. 2002; Ramachandiran et al. 2002) deutlich. Der Austausch synonymen Codons, die in Loop- Regionen oder zwischen Protein- Domänen lokalisiert sind, bewirkt hierbei durchgehend eine Veränderung der Proteinfaltung. Unklar bleibt, ob das veränderte

Translationsprofil, wie bei Komar (Komar et al. 1999) für die Chloramphenicol Acetyltransferase gezeigt, auf die sich verändernden Translationselongationsraten der einzelnen Triplets oder auf eine Veränderung der mRNA Struktur zurückzuführen ist. Der Versuch die Translationselongationsraten der Haloalkan Dehalogenase DSD4 an jeder Position so gut wie möglich an das Translationsprofil der hoch exprimierten Dehalogenase DhaA anzupassen bleibt ohne Effekt auf die Löslichkeit des Proteins, obgleich dies mit erheblichen Änderungen im Translationsprofil wie auch in der mRNA Struktur einhergehen muss (Abschnitt 4.3.3). Auch die Supplementierung von tRNAs seltener Codons (Abschnitt 4.2.1) führt zu keiner Änderung innerhalb der Proteinfaltung.

Eine massive Änderung der Proteinlöslichkeit bewirkt der Austausch der Aminosäure Histidin an Position 107 der Haloalkan Dehalogenase DSD4 gegen die hydrophobe Aminosäure Valin. Der Ersatz des Histidins gegen Aminosäuren wie Arginin oder Lysin, die ähnliche biochemische Eigenschaften besitzen, kann diesen Effekt nicht aufheben. Hier kann davon ausgegangen werden, dass Histidin<sup>107</sup> essentiell für die Stabilisierung des Faltungsprozesses der Haloalkan Dehalogenase ist. Über die bekannten Haloalkan Dehalogenasen Sequenzen ist diese Aminosäure relativ hoch konserviert.

Im Zusammenhang mit dem Austausch von Histidin<sup>107</sup> gegen Lysin wird deutlich, dass synonyme Codons sich unterschiedlich auf die Proteinexpression auswirken. Das Lysin Codon AAA führt dazu, dass die entstehende Polypeptidkette proteolytisch instabil wird, wohingegen das Triplet AAG die Anreicherung des Proteins in „Inclusion bodies“ fördert. Diese detaillierte Betrachtung der Auswirkung von synonymen Codons lässt vermuten, dass der Faltungsprozess von Proteinen über eine Vielzahl von Faktoren moduliert wird. Hierbei spielt sowohl die Aminosäuresequenz an sich eine Rolle, aber auch Faktoren auf Ebene der Nukleinsäuresequenz, wie die mRNA Sekundärstruktur, die Translationselongationsraten, die „codon usage“ bzw. die Wahl synonymen Triplets, sowie die Konzentration an vorhandener tRNA. Für den Anspruch den Faltungsprozess während der heterologen Proteinsynthese in einer positiven Weise zu beeinflussen, gibt es offenbar keine universelle Vorgehensweise. Da viele der oben genannten Faktoren miteinander verknüpft sind, gelingt es nicht in allen Fällen durch die reine Betrachtung nur eines Faktors Einfluss auf den Faltungsprozess zu nehmen (Yadava and Ockenhouse 2003; Ito and Wagner 2004).

Im Fall der Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 wurde eine nennenswerte Verbesserung der heterologen Proteinexpression über rein experimentelle Ansätze erzielt. Problematisch gestaltete sich die *in vivo* Expression der Haloalkan Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup>. Diese wurde zwar im Zuge der experimentellen Ansätze über die Bildung eines Fusionsproteins löslich exprimiert, zeigte jedoch keine enzymatische Aktivität. Mit Hilfe der modellgestützten Methoden konnten für die nicht fusionierte Dehalogenase DSD4<sup>H107V</sup> keine generellen Ursachen für den fehlerhaften Faltungsprozess herausgearbeitet werden. Hier ist zu vermuten, dass das Histidin an Position 107 eine essentielle Rolle im Verlauf des Faltungsprozesses besitzt.



## 5. Produktion und Aufreinigung von Haloalkan Dehalogenasen

Parallel zu der Expressionsoptimierung der Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 wurde ein Verfahren zur Herstellung des Biokatalysators erarbeitet. Wie bereits im ersten Abschnitt des Kapitels 4 beschrieben, wurde der Herstellungsprozess mit der Haloalkan Dehalogenase DhaA etabliert. In Abschnitt 5.1 dieses Kapitels wird zunächst auf die Grundlagen und Ziele des zu erarbeitenden Herstellungs- und Aufreinigungsprozesses eingegangen. Der nachfolgende Abschnitt 5.2 beschäftigt sich mit der Produktion des Biokatalysators über eine Hochzelldichte- Fermentation. Der Downstream- Prozess für die Haloalkan Dehalogenase, welcher einen Zellaufschluss, eine Affinitätsaufreinigung sowie eine Konditionierung des Enzyms einschließt, ist in Abschnitt 5.3 beschrieben. Abschließend werden im Unterkapitel 5.4 die Ergebnisse dieses Kapitels zusammenfassend dargestellt und diskutiert.

### 5.1. Grundlagen für die Produktion und den Downstream Prozess der Haloalkan Dehalogenasen

In den nachfolgenden Absätzen wird darauf eingegangen, welche Haloalkan Dehalogenase zur Etablierung des Herstellungsprozesses herangezogen wird. Zudem werden grundsätzliche Überlegungen zu dem Downstream- Prozess des Biokatalysators vorgestellt und die Thematik der Integrierten Prozessführung näher beleuchtet.

#### 5.1.1. Haloalkan Dehalogenase DhaA und DhaA<sup>CYYF</sup>

Die biokatalytische Umsetzung von 1,2,3-Trichlorpropan über die Haloalkan Dehalogenase DhaA erfolgt mit einem  $k_{cat}$  von  $0,08 \text{ s}^{-1}$  (Bosma 2002) sehr langsam. Daher sind für die Umsetzung des Substrats innerhalb eines Festbettreaktors größere Mengen des Biokatalysators erforderlich. Hinzu kommt, dass der Biokatalysator für das Festbettverfahren auf Trägermaterialien wie Eupergit immobilisiert werden muss. Dies erhöht die Stabilität und damit die Halbwertszeit des Enzyms, verringert aber gleichzeitig dessen Aktivität (Samorski 2006). Für die anfänglichen Versuche im Festbettreaktor wurde erwogen, eine mutagenisierte Variante der Haloalkan Dehalogenase DhaA einzusetzen. Die Variante DhaA<sup>CYYF</sup> wurde erstmals in der Literatur von Bosma (Bosma et al. 2003) beschrieben und auf dieser Grundlage am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart generiert. Sie weist durch den Austausch von Cystein gegen Tyrosin bzw. Tyrosin gegen Phenylalanin an den Positionen 176 und 273 eine zweifache Erhöhung der spezifischen Aktivität auf, was in

dem angestrebten Festbettverfahren von Vorteil ist. Ungeachtet der verringerten Enantioselektivität des Enzyms DhaA<sup>CYF</sup> gegenüber der ursprünglichen DhaA, wird erstere zunächst fermentativ hergestellt und anschließend aufgereinigt. Aus den oben genannten Gründen wird angestrebt, die Haloalkan Dehalogenase in Mengen von 5 bis 10 Gramm mit einer Reinheit von > 80 % für die biokatalytische Umsetzung von 1,2,3-Trichlorpropan zur Verfügung zu stellen.

Für die Auslegung des Produktions- und Aufreinigungsprozesses wird eine mit GFP fusionierte Variante der Haloalkan Dehalogenase DhaA<sup>CYF</sup> genutzt, welche bereits im Vorfeld (Abschnitt 4.1.1) beschrieben wurde. Die Vorteile dieser grün fluoreszierenden Variante des Biokatalysators ergeben sich durch das „Online-Monitoring“ des gesamten Produktions- und Downstream- Prozesses, sowie durch die einfache und effiziente Quantifizierung des aufgereinigten Enzyms.

### **5.1.2. Kriterien für den Produktions- und Downstream Prozess**

Das zu erarbeitende Herstellungsverfahren vereinigt generell zwei aufeinander folgende Prozesse in sich, nämlich (A) die Produktion und (B) die Aufreinigung des Biokatalysators. Da es sich hierbei um die Bereitstellung eines technischen Enzyms handelt, wird eine Minimierung des Kosten- und Zeitfaktors für den Gesamtprozess angestrebt. Da der Kostenfaktor für die rekombinante Enzymproduktion gegenüber den aus dem „Downstream- Processing“ resultierenden Kosten vergleichsweise gering ist, sind insbesondere auf Seiten der Proteinaufreinigung Prozessabläufe zu verbessern.

Für das „Downstream- Processing“ liefern Erfahrungen vergangener Jahrzehnte grundlegende Kriterien, nach denen ein Aufreinigungsprozess ausgelegt werden sollte. Hierzu gehört z.B., dass zunächst (1) die anteilmäßig größte Verunreinigung wie auch (2) die einfachste zu beseitigende Verunreinigung abgereichert wird. Desweiteren werden (3) die aufwendigsten und teuersten Separationsschritte zuletzt durchgeführt (Petrides 2003).

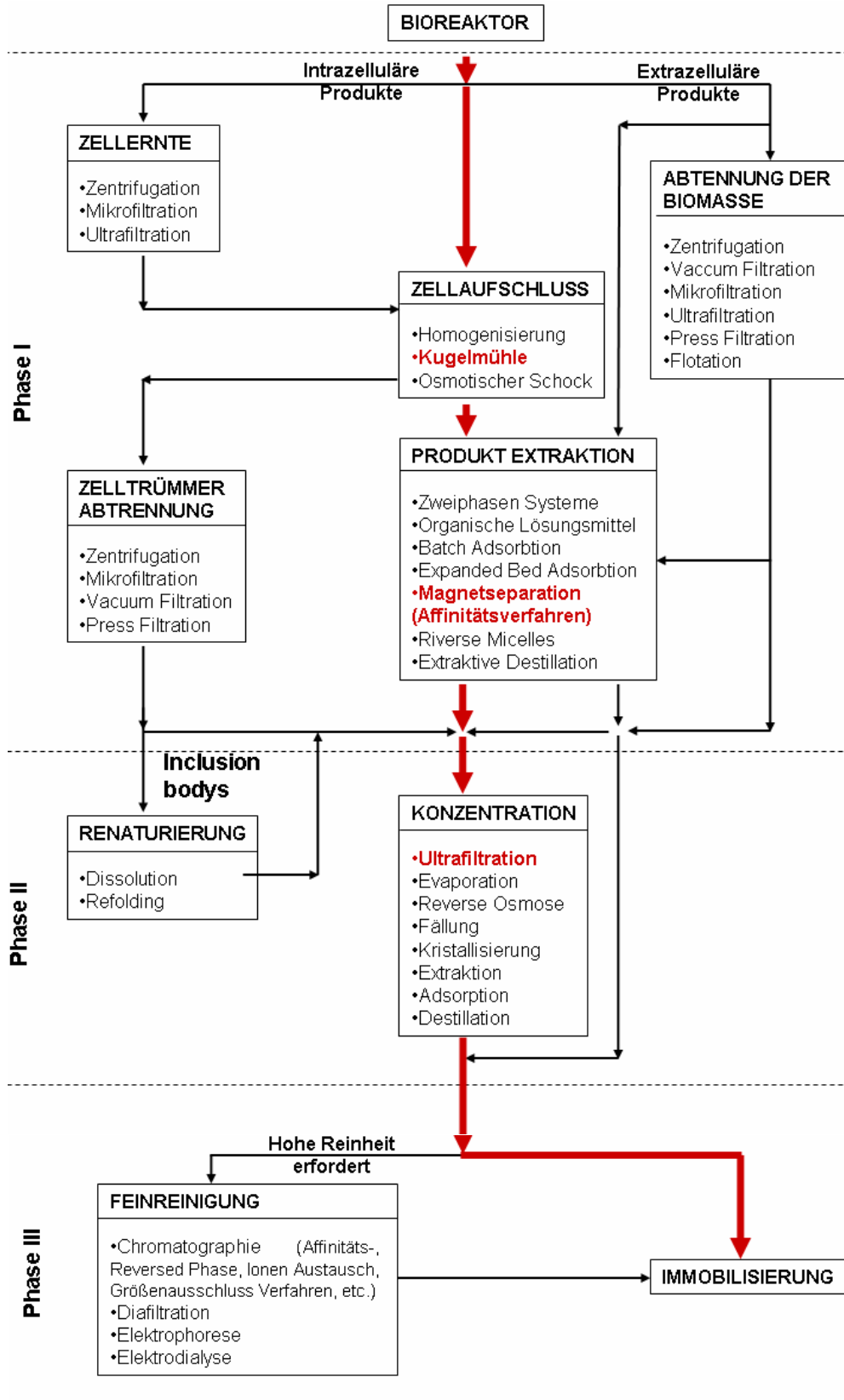


Abbildung 5-1: Allgemeines Schema für das „Downstream- Processing“ von **intra- und extrazellulären Proteinen** (modifiziert nach (Petrides 2003)). Die für die Haloalkan Dehalogenasen genutzte Aufarbeitungsstrategie ist in Rot gekennzeichnet.

Die Abbildung 5-1 zeigt ein allgemeines Schema des Downstream- Prozesses von intra- und extrazellulären Proteinen (modifiziert nach (Petrides 2003)). Anhand dieses Schemas wird ersichtlich, dass zur Aufreinigung unterschiedlichster Produkte nach den vorstehend genannten Kriterien vorgegangen wird. Es lassen sich drei Reinigungsphasen unterscheiden, wobei die erste Phase Schritte zur Grobreinigung des Endprodukts einschließt. Prozessschritte der zweiten und dritten Aufreinigungsphase sind zur Aufkonzentrierung bzw. zur Feinreinigung des Produktes vorgesehen. Bei der Haloalkan Dehalogenase handelt es sich um ein intrazelluläres Enzym, so dass hier zunächst in der ersten Stufe der Proteingewinnung nach der Fermentation eine Zellernte via Zentrifugation oder Filtration durchgeführt werden muss. Weiterhin gehören zu dieser ersten Stufe der Zellaufschluss der Bakteriensuspension über Homogenisierungsverfahren oder Kugelmühlenaufschlüsse, sowie die anschließende Abtrennung der Zelltrümmer über Zentrifugation oder Filtrationsschritte. Vor der Endreinigung des Produkts über unterschiedliche Chromatographieverfahren würde in der zweiten Phase des Aufreinigungsprozesses eine Aufkonzentrierung der Produktsuspension erfolgen. Der für die Haloalkan Dehalogenase angestrebte Aufreinigungsprozess ist in Abbildung 5-1 rot unterlegt. Deutlich zu erkennen ist hierbei, dass typische Aufreinigungsschritte der ersten Reinigungsphase umgangen werden. Hierunter fallen vornehmlich die Schritte der Zell- und Zelltrümmerabtrennung sowie die erste Aufkonzentrierung des Rohextraktes. Erstmals eröffnete Anfang der 90 er Jahre die so genannte ‚Expanded Bed Adsorption‘ (EBA) Technologie diese Möglichkeit (Amersham-Biosciences 2001). Dieses Chromatographieverfahren erlaubt eine direkte Aufreinigung des Zielproteins aus Fermentationsrohextrakt ohne vorherige Abtrennung von Zelltrümmern. In der vorliegenden Arbeit kommt ein weitgehend der EBA-Technologie entsprechendes Verfahren zum Einsatz. Die ursprünglich Methode des ‚High Gradient Magnetic Fishing‘ (HGMF) (Hubbuch et al. 2001) ermöglicht ebenfalls eine Verkürzung des gesamten Downstream- Prozesses insbesondere in der oben beschriebenen ersten Phase der Produktaufarbeitung. Diese HGMF- Separation basiert auf funktionalisierten Magnetpartikeln, die spezifisch das Zielprotein binden können, und gleichzeitig sehr einfach in einem Durchfluss- Verfahren innerhalb eines magnetischen Feldes separiert werden können.

### 5.1.3. Integrierte Verfahren

Die Mehrheit der heutzutage eingesetzten Downstream- Prozesse wird in einer Batch- Verfahrensweise betrieben, vor allem wenn es sich dabei um sehr hochwertige, intrazelluläre Produkte handelt. Ausnahmen bilden beispielsweise die Produk-

tion von organischen Säuren oder Ethanol, die in großem Maßstab über eine integrierte Verfahrensweise gewonnen werden. Integrierte Verfahren zeichnen sich dadurch aus, dass im Fall von extrazellulären Produkten bereits während des Produktionsprozesses eine kontinuierliche Abtrennung derselben über geeignete Systeme erfolgt. Ein Beispiel dafür ist die Produktion von 2-Phenylethanol über die Batch-Kultivierung von *Kluyveromyces marxianus* (Etschmann et al. 2005). Hierbei wird das Produkt über eine Pervaporationseinheit aus dem laufenden Prozess abgetrennt, um eine Produktinhibierung zu vermeiden. Im Fall der rekombinant hergestellten Haloalkan Dehalogenase handelt es sich um ein intrazelluläres Enzym, so dass vor der Abtrennung des Produkts ein Aufschluss der Zellen nötig ist. Das heißt, dass während der Kultivierung eine Produktabtrennung ohne Abreicherung des Wirtsorganismus nicht möglich ist. Die Produktion des Biokatalysators und das anschließende „Downstream- Processing“ werden daher sequentiell durchgeführt.



Abbildung 5-2: **Schematische Darstellung des sequentiell ablaufenden Produktions- und Aufreinigungsprozesses der Haloalkan Dehalogenase DhaA<sup>CYYF</sup>**. Im Anschluss an die Produktion des rekombinanten Enzyms innerhalb eines Bioreaktors, findet der Zellaufschluss mittels einer kontinuierlichen Kugelmühle statt. Anschließend erfolgt die Aufreinigung des Biokatalysators mittels der Magnettrenntechnik aus dem Zellrohextrakt, wobei eine Ultrafiltration zur Konditionierung des Endprodukts in die Anlage integriert wird.

Der Gesamtprozess zeichnet sich durch eine Minimierung von Einzelschritten und durch eine zeitlich- und räumlich möglichst nahe Abfolge dieser Schritte aus. Die detaillierten Anlagenschemata der Einzelprozesse sind in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben und erläutert.

## 5.2. Enzymproduktion mittels Hochzelldichte- Fermentation

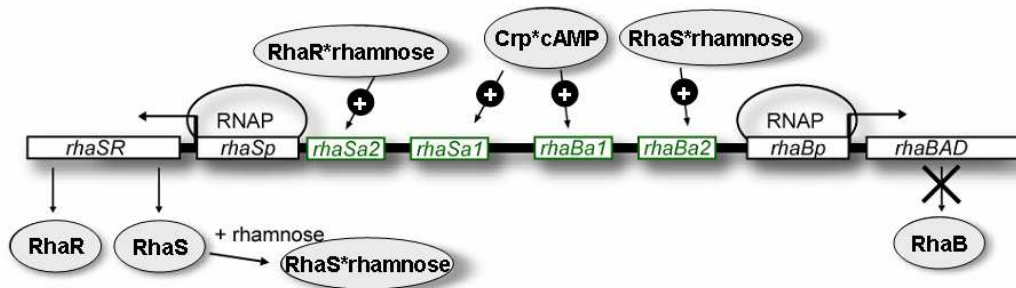
Für die Produktion des Biokatalysators wird ein Upscale des Labormaßstab- Verfahrens in den halb-technischen Maßstab durchgeführt. Eine Maßstabsvergrößerung ließe sich prinzipiell durch die Umsetzung der Schüttelkolben- Technik im 500 ml- Maßstab in ein Batch- Verfahren verwirklichen. Allerdings lassen sich über das Fed-Batch- Verfahren weitaus höhere Zelldichten realisieren. Die Haloalkan Dehalogenase DhaA<sup>CYYF</sup> wird rekombinant in dem Wirtsorganismus *E. coli* BW3110 innerhalb einer Hochzelldichte- Fermentation hergestellt. Die Fermentation ist auf einen 30 Liter- Bioreaktor ausgelegt, wobei das Endvolumen 13 l beträgt. In einem Verfahren dieser Größenordnung kann über eine Zufütterungsstrategie mit exponentieller Zufütterungsrate bis zu 100 g l<sup>-1</sup> Biotrockenmasse des rekombinanten Organismus erhalten werden. Das rekombinante Enzym wird während der Phase der heterologen Proteinexpression in einer Menge von bis zu 30 % in der Zelle angereichert. Mit diesem Verfahren konnten somit ca. 130 g des Biokatalystors im Rahmen einer einzigen Fermentation hergestellt werden.

### 5.2.1. Expressionssystem

Für die Produktion des heterologen Proteins in *Escherichia coli* wird der positiv regulierte *E. coli rha<sub>BAD</sub>* - Promotor genutzt (Egan and Schleif 1993). Der Expressionsvektor wurde am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart entwickelt (Altenbuchner et al. 2000). Der Rhamnose induzierbare *rha<sub>BAD</sub>* - Promotor ist innerhalb von *E. coli* streng reguliert und zeigt daher im Vergleich zu anderen Systemen deutliche Vorteile für die heterologe Genexpression (Haldimann et al. 1998).

L-Rhamnose wird von *E. coli* über die membrangebundene Permease RhaT aufgenommen. Die Isomerisierung der L-Rhamnose zu L-Rhamnulose erfolgt über die Isomerase RhaA, welche anschließend über die Rhamnulose Kinase RhaB zu Rhamnulose-1-phosphat phosphoryliert, und schließlich über die Aldolase RhaD hydrolysiert wird. Die Gene der, in den Stoffwechsel integrierten Enzyme *rhaA*, *rhaB* und *rhaD*, werden über den *rha<sub>BAD</sub>* - Promotor reguliert. Das Gen der Permease *rhaT* liegt außerhalb dieser Transkriptionseinheit und wird deshalb über einen separaten Promotor reguliert. Die Expression der beteiligten Gene wird über eine regulatorische Kaskade, bestehend aus den Regulatorproteinen RhaS und RhaR, positiv reguliert (Tobin and Schleif 1987).

**A) Rhamnose Operon**



**B) Expressionsvektor**

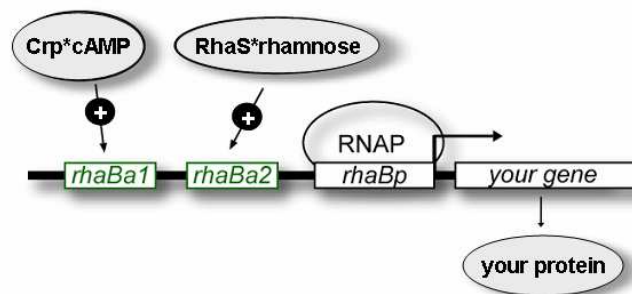


Abbildung 5-3: **Abbildung des Rhamnose Operons innerhalb des Genoms von *E. coli* (A) und des auf dem Expressionsvektor integrierten Teils (B).** Gezeigt ist die zweifach positive Regulation einzelner Transkriptionseinheiten über die regulatorischen Einheiten RhaR\*Rhamnose und Crp\*cAMP. Grün unterlegt sind die Bindungsstellen der regulatorischen Einheiten; rhaSp und rhaBp stellen die jeweiligen Promotoren der Transkriptionseinheiten dar; rha<sub>SR</sub> und rha<sub>BAD</sub> repräsentieren die Gene der Regulationsproteine RhaS und RhaR, sowie die Gene der metabolischen Proteine RhaB, RhaA und RhaD. RNAP stellt die RNA Polymerase zur Transkription der Gene dar.

Die Instabilität des Expressionsvektors, die unter anderem durch die Multimerbildung des Vektors innerhalb des Wirtsorganismus zustande kommt, wurde über die Integration der *cer* Region aus dem ColE1 Plasmid verhindert. Diese Region ist innerhalb des ColE1 Plasmids für die Auflösung von Plasmid Dimeren verantwortlich, so dass eine gleichmäßige Verteilung von „Multicopy“ Plasmiden auf die Tochterzellen wahrscheinlicher ist (Summers and Sherratt 1988). Experimentell wurde die Stabilität des Expressionsvektors in der Veröffentlichung von Wilms (Wilms et al. 2001) belegt.

Der Induktor L-Rhamnose des Expressionssystems stellt bei der rekombinanten Enzymproduktion im technischen Maßstab eine kostenintensive Komponente dar. Aufgrund dessen wurde, abgestimmt auf das Rhamnose induzierbare Expressionssystem, der Expressionsstamm *E. coli* BW3110 entwickelt (Wilms et al. 2001). Über die Inaktivierung der L-Rhamnulose Kinase RhaB ist dieser Stamm nicht mehr in der Lage, den Induktor Rhamnose zu verstoffwechseln. Die Inaktivierung des *rhaB* Gens wurde am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart von Dr. J. Altenbuchner erneut für den *E. coli* Stamm BL21 durchgeführt, so dass dieser ebenso wie *E. coli* BW3110 nicht mehr in der Lage ist, Rhamnose zu verstoffwechseln.

### 5.2.2. Hochzelldichte- Fermentation

Für die Produktion der Haloalkan Dehalogenase DhaA<sup>CYYF</sup> wird eine Hochzelldichte-Kultivierung des *E. coli* Stamms BW3110 durchgeführt, der den Expressionsvektor pJOE4056 GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> enthält. Die Hochzelldichte- Kultivierung von Mikroorganismen stellt die Methode der Wahl dar, um hohe Raum-Zeit-Ausbeuten während der heterologen Expression von Proteinen zu erzielen. Innerhalb dieses Verfahrens können über exponentielle Zufütterungsstrategien des Nährmediums Zelldichten von  $> 100 \text{ g l}^{-1}$  Biotrockenmasse erreicht werden (Wilms et. al. 2001). In einem Zufütterungsverfahren mit dem Mikroorganismus *E. coli* ist die Acetat Bildung während der Kultivierung ein kritischer Faktor. Diese Acetat Bildung, welche bei höheren Konzentrationen zu einer Wachstumsinhibierung führt, kann durch die Verringerung der spezifischen Wachstumsrate auf unter  $0,2 \text{ h}^{-1}$  vermieden werden. In der Dissertation von Wilms (Wilms et al. 2001) wurde bereits ein Hochzelldichte- Verfahren für die Produktion einer L-N-Carbamoylase über den Wirtsstamm *E. coli* BW3110 etabliert, so dass die Herstellung der Haloalkan Dehalogenase in Anlehnung an dieses Verfahren durchgeführt wird.

Die Hochzelldichte Kultivierung wird in einem 30 Liter- Bioreaktor der Firma Bioengineering mit einem Endvolumen von 13 l bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Über den gesamten Kultivierungszeitraum wird der pH Wert über die Zugabe einer Ammoniumhydroxid Lösung auf pH 7,0 konstant gehalten. Die Kultivierung des *E. coli* Stamms erfolgt auf einem Mineralsalzmedium und setzt sich aus zwei Phasen zusammen, nämlich aus der Batch- und Fed-Batch- Phase. Das Volumen während der Batch Phase beträgt 8 l und wird während der Zufütterungsphase mit einem Volumen von 5,2 l aufgestockt. Innerhalb der Fed-Batch Phase wird über ein exponentielles Zufütterungsverfahren die maximale spezifische Wachstumsrate von



*E. coli* auf  $\mu_{max} = 0,1 \text{ h}^{-1}$  festgesetzt. Der limitierende Faktor für das Wachstum ist hierbei die im Bioreaktor als einzige Kohlenstoffquelle vorliegende Glukosekonzentration. Die Stoffbilanzen für die Biomasse und Glukose liefern unter der Annahme von  $\mu = \text{konstant}$ ,  $dc_s/dt = 0$  und  $c_s \ll c_s^0$  die Gleichung (5-1) für die exponentielle Zufütterung des Mediums während der Fed-Batch Phase:

$$F(t) = \left( \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m \right) \frac{c_{x_0} \cdot V_0}{c_{s_0}} \cdot e^{\mu t} \quad (5-1)$$

Dabei steht

- $F(t)$  ( $1 \text{ h}^{-1}$ ) für die Zufütterungsrate,
- $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) für die spezifische Wachstumsrate,
- $m$  ( $\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) ist der spezifische Erhaltungsstoffwechselkoeffizient (= 0,04),
- $Y_{x/s}$  ( $\text{g g}^{-1}$ ) ist der spezifische Biomasse/Substrat Ausbeutekoeffizient (= 0,5),
- $c_{x_0}$  ( $\text{g l}^{-1}$ ) für die Biomassekonzentration zu Beginn der Zufütterungsphase,
- $V_0$  (l) für das Volumen des Bioreaktors zu Beginn der Zufütterungsphase,
- $c_{s_0}$  ( $\text{g l}^{-1}$ ) für die Glucosekonzentration des Feed-Mediums und
- $t$  (h) für die Zeit nach Beginn der Zufütterung.

Eine Limitierung der Glucose während der Fed-Batch- Phase ist auch aus Sicht der heterologen Genexpression essentiell. Wie im Abschnitt 5.2.1 beschrieben, ist das vorliegende Expressionssystem doppelt positiv reguliert. Für die Expression des heterologen Gens ist sowohl die Anwesenheit der systemeigenen regulatorischen Einheit RhaS\*Rhamnose als auch der Komplex aus cAMP und crp (catabolite repressor protein) notwendig. Auslöser für die cAMP Synthese ist die eintretende Kohlenstofflimitation, d.h. der während der Fed-Batch- Phase anhaltende Glucose-Mangelzustand.

Zur Überwachung und Beschreibung des Fermentationsverlaufs werden eine Reihe von Parametern aufgezeichnet. Hierzu zählen die Wachstumstemperatur ( $T$ ), der Fermenterüberdruck ( $p$ ), die Sauerstoffsättigung ( $\%O_2$ ), der pH Wert des Mediums, der Gasvolumenstrom ( $V_{Gas}$ ) sowie die Substratkonzentration ( $c_s$ ) innerhalb des Mediums. Während der Fermentation wird die nach der Zugabe des Induktors einsetzende Produktbildung über die emittierte Fluoreszenz des Fusionsproteins GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> verfolgt.

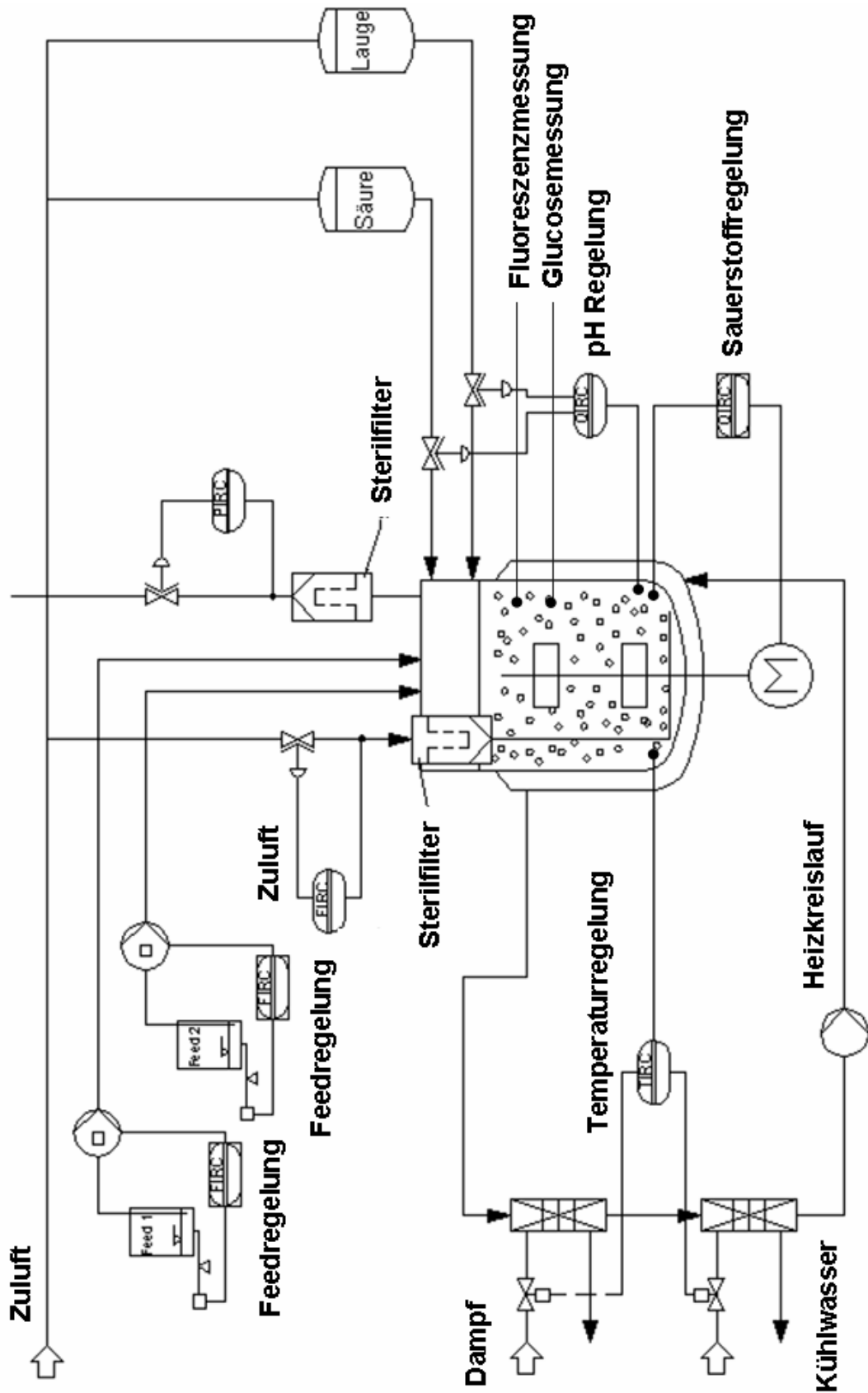


Abbildung 5-4: Der für die Hochzelldichte- Kultivierung eingesetzte Bio- reaktor. Darstellung des Bioreaktors mit den dazugehörigen Mess- und Re- gelparametern.

Über das beschriebene Hochzelldichte- Verfahren konnten durchschnittlich 100 g des rekombinanten Proteins synthetisiert werden, welches in einer Biotrockenmasse des Wirtsorganismus von 1,3 kg vorlag. In Abbildung 5-5 sind die Prozessverläufe zweier repräsentativer Fermentationen wiedergegeben. Der Gesamtprozess läuft über einen Zeitraum von 38 h, wobei die Fed-Batch- Phase auf 24 h begrenzt ist.

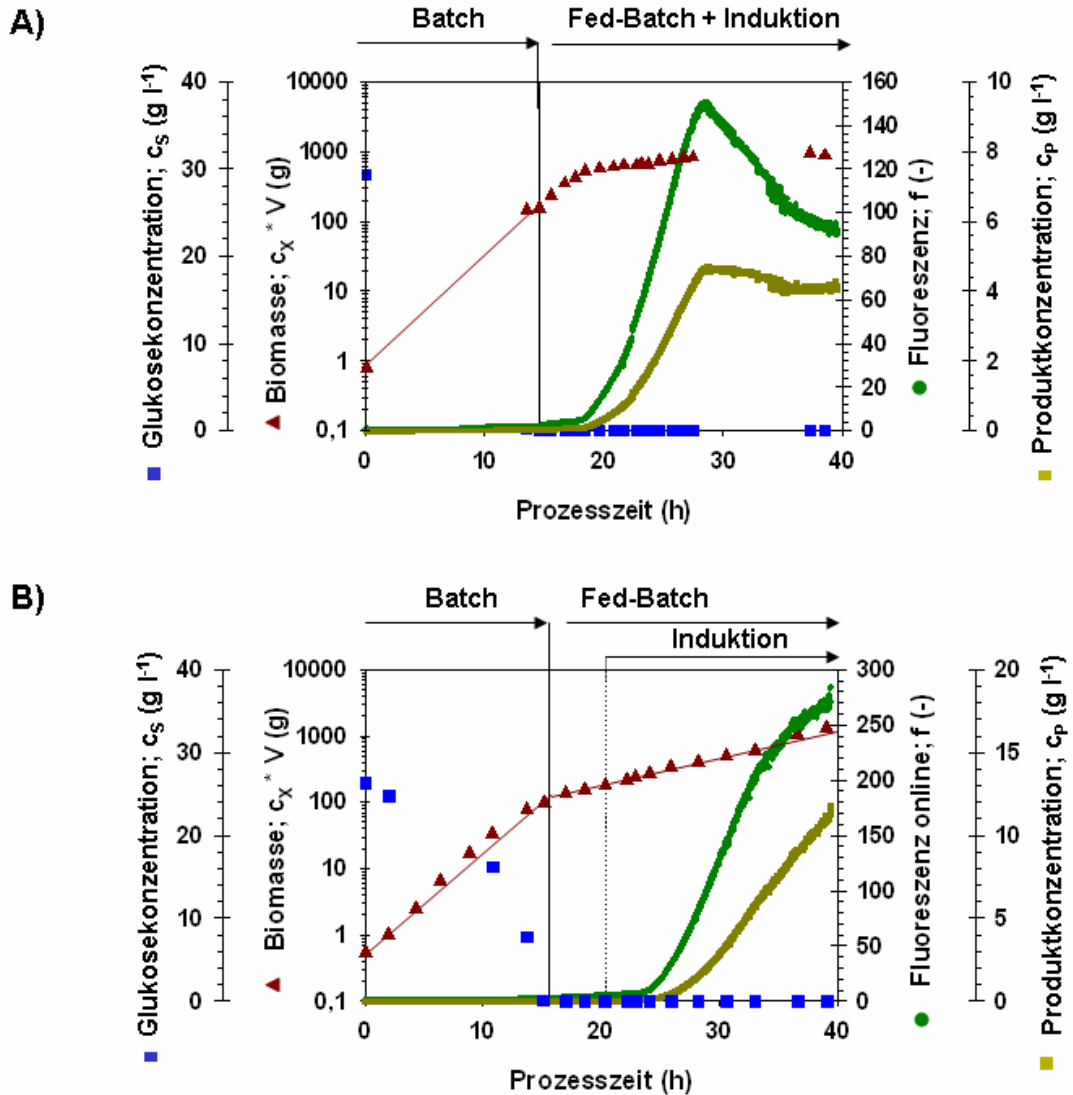


Abbildung 5-5: Dargestellt sind zwei repräsentative Prozessverläufe für die Hochzelldichte- Kultivierung von *E. coli* BW3110 pJOE4056 GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> auf Mineralsalzmedium bei 30 °C. Der Unterschied zwischen den beiden Prozessen ist in dem Zeitpunkt der Induktor Zugabe zu sehen. Der Start der Fed-Batch Phase erfolgt jeweils nach dem vollständigen Verbrauch, der in der Batch Phase vorgelegten Glukose. Abbildung A) zeigt den Verlauf der Fermentation nach Zugabe des Induktors 24 h vor Ende des Prozesses; Abbildung B) verdeutlicht den Verfahrensverlauf nach Zugabe des Induktors 18 h vor Prozessende. Gezeigt ist der Substratverlauf  $c_s$  (g l<sup>-1</sup>), der Verlauf der Biomasse  $c_x \cdot V$  (g), die online Fluoreszenzmessung  $f$  (-) sowie die daraus resultierende Produktkonzentration  $c_p$  (g l<sup>-1</sup>) über der Prozesszeit (h).

Die Glucosekonzentration sowie die Zunahme der Biomasse zeigen bei den in Abbildung 5-5 wiedergegebenen Hochzelldichte- Kultivierungen sehr ähnliche Verläufe. Die Absolutwerte der erreichten Biomassen differieren am Ende der Kultivierung um 300 g BTM. In beiden Fällen setzt die Produktbildung, die über die zunehmende Fluoreszenz gekennzeichnet ist, circa drei Stunden nach Zugabe des Induktors Rhamnose ein. Die gebildete Produktmenge des Fusionsproteins GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> errechnet sich mit Hilfe der in Abschnitt 3.2.3 dargestellten *in vitro*- Kalibrierung und einem anschließenden Abgleich der off- und online gemessenen Fluoreszenzwerte. Zu erwarten ist, dass im Laufe beider Fed-Batch- Kultivierungen Produktmengen in gleicher Größenordnung erreicht werden. Allerdings wird innerhalb der zweiten Fermentation mit  $c_p = 10 \text{ g l}^{-1}$  eine doppelt so hohe Produktkonzentration erreicht. Die Abweichung in den Produktendkonzentrationen ist nicht allein auf die Differenz der Biomassen am Ende der Fermentationen zurückzuführen. Der Unterschied zwischen den beiden Versuchen liegt in dem Zeitpunkt der Induktor- Zugabe für das, auf dem Rhamnose- Operon basierenden Expressionssystem. Der Zeitpunkt der Induktion sollte zunächst keinen Einfluss auf die Produktbildung nehmen. Allerdings kommt es gegen Ende der Fed-Batch- Kultivierung, genauer gesagt sechs Stunden vor Prozessende, im ersten Fall (Abbildung 5-5 A) zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals.

Vergleichbare Experimente mit dem Rhamnose induzierbaren Expressionssystem wurden von Wilms (Wilms et al. 2000) veröffentlicht. Dabei wurde die Auslegung einer Hochzelldichte- Fermentation für die Produktion einer L-N-Carbamoylase beschrieben. In der Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass die Induktorkonzentration einen erheblichen Einfluss, sowohl auf die gebildete Proteinmenge als auch auf die Produktbildungsrate hat. Bei einer Induktorkonzentration von  $2 \text{ g l}^{-1}$ , wie sie auch in den vorliegenden Hochzelldichte- Fermentationen gewählt wurde, wird eine maximale spezifische Enzymaktivität der N-L-Carbamoylase von  $1 \text{ U mg}^{-1}$  erreicht. Demgegenüber führt die Wahl von niedrigeren als auch höheren Induktorkonzentrationen wie z.B.  $0,5$  oder  $4 \text{ g l}^{-1}$  Rhamnose zu erheblich niedrigeren spezifischen Enzymaktivitäten von  $0,5$  bis  $0,7 \text{ U mg}^{-1}$ .

Die verringerte Produktkonzentration am Ende der Kultivierung kann unabhängig von der auftretenden Produktsenke betrachtet werden, die 18 h nach Zugabe des Induktors erfolgt. In der Veröffentlichung von Wilms (Wilms et al. 2001) wurde ebenfalls ein Absinken der spezifischen Enzymaktivität der N-L-Carbamoylase 15 h nach der Zugabe des Induktors Rhamnose beobachtet. Dies konnte teilweise auf die Bil-

dung von „Inclusion bodies“ und auf eine Inhibierung der rekombinanten Proteinbiosynthese einzelner Zellen zurückgeführt werden. Im vorliegenden Fall wird nicht die spezifische Enzymaktivität über der Prozesslaufzeit verfolgt, sondern die durch das Fusionsprotein emittierte Fluoreszenz aufgezeichnet. Die emittierte Fluoreszenz ist abhängig von der korrekten Proteinfaltung des GFP. Es zeigt sich, dass das GFP auch innerhalb von Einschlusskörpern Fluoreszenz emittiert. Diese Fluoreszenz ist allerdings nur bedingt proportional zu der in den Einschlusskörpern vorhandenen Proteinmenge. Beispielsweise fällt während der Expression von GFP-DSD4 unter Kultivierungstemperaturen von 37 °C und 30 °C annähernd die gleiche Proteinmenge in Form von „Inclusion bodies“ an. Dennoch ist die emittierte Fluoreszenz von „Inclusion bodies“ bei 37 °C geringer als bei 30 °C. Innerhalb der in Abbildung 5-5 A) dargestellten Hochzell-dichte Fermentation kann die Senke der Fluoreszenz und die daraus errechnete verringerte Produktkonzentration die Folge einer verstärkten Bildung von Einschlusskörpern sein. SDS-Gele aus dieser Fed-Batch-Kultivierung zeigen, dass im Laufe der Fermentation eine deutliche Zunahme der unlöslichen Fraktion des rekombinanten Proteins eintritt.

Aus den Ergebnissen der vorgestellten Fed-Batch-Kultivierungen wird ersichtlich, dass sich der Zeitpunkt der Zugabe, wie auch die Konzentration des Induktors Rhamnose entscheidend auf die gebildete Produktmenge auswirkt.

Wie bereits in Kapitel 4 beschrieben, gibt es unterschiedliche Faktoren, die das Expressionsniveau eines heterologen Gens beeinflussen. Hierbei können Faktoren, die sehr spezifisch für ein Gen bzw. das Genprodukt sind, von solchen unterschieden werden, die unabhängig von dem heterologen Gen Einfluss auf dessen Expression nehmen. Zu den erstgenannten Faktoren zählen z.B. die Proteinstabilität, die Proteinfaltung, die „codon usage“ innerhalb des Gens oder die Effektivität der Translationsinitiation. Auf diese Punkte wurde bei der Expressionsoptimierung der Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 näher eingegangen. Ein Einfluss, der mit etwas größerem Abstand zu dem Genprodukt zu sehen ist, kann z.B. die Promotorstärke des eingesetzten Expressionssystems sein. Generell werden negativ und positiv regulierte Promotoren für die heterologe Genexpression unterschieden. Der Vorteil des doppelt positiv regulierten Rhamnose Systems zeigt sich im Zusammenhang mit dem Einfluss des Induktionszeitpunkts. Über das strikt regulierte Rhamnose-Expressionssystem lässt sich auf sehr einfache Weise die in der Hochzell-dichte-Kultivierung maximal erreichbare Produktkonzentration verwirklichen. Hierzu ist lediglich eine Verschiebung des Induktionszeitpunktes um 5 h notwendig. Dies ist mit anderen Expressionssystemen, wie z.B. den *tac*- und *trc*-Promotoren,

die aus dem *lac*- Promotor hervorgehen, nicht ohne weiteres möglich. Negativ regulierte Systeme zeigen meist auf Grund einer unzureichenden Menge an Repressormolekülen bereits vor Zugabe des Induktors eine Basisexpression des heterologen Gens. In diesem Fall kann eine Wachstumsinhibierung des Wirtsorganismus noch im Verlauf der Kultivierung nicht ausgeschlossen werden.

### 5.3. Proteinaufreinigung

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels in Abbildung 5-1 dargestellt, stehen eine Vielzahl von Methoden für die Aufreinigung von Proteinen zur Verfügung. Der Einsatz mancher Methoden ist allerdings in hohem Maße von dem Produkt selbst abhängig. Beispielsweise spielen in diesem Zusammenhang die Stabilität, die Ladung oder auch der Aggregationszustand des Proteins eine Rolle. Generell lassen sich die Vorgehensweisen bei der Aufreinigung von intra- und extrazellulären Proteinen unterscheiden. Im vorliegenden Fall der Haloalkan Dehalogenase handelt es sich um ein intrazellulär synthetisiertes Produkt, so dass Wege des Zellaufschlusses, der Zelltrümmer- Abtrennung sowie der Grob- und Feinreinigung des Enzyms besprochen werden müssten.

Bei den heute in der Industrie angewandten Aufreinigungsverfahren werden häufig Adsorbtionschromatographien im Festbettverfahren eingesetzt. Festbettverfahren bedingen eine vollständige Abtrennung aller Feststoffe, so dass der Chromatographie in der Regel Fällungs-, Zentrifugations- und Mikrofiltrationsstufen vorausgehen (Petrides 2003). Die resultierenden mehrstufigen Aufarbeitungsprozesse führen zu hohen Produktverlusten, langen Prozesszeiten, sowie oftmals zu einem hohen Chemikalien- und Energieaufwand (Leuchtenberger 1998).

Für eine kostengünstigere Gestaltung des „Downstream- Processing“ ist die Entwicklung neuer Verfahren zur direkten Gewinnung von Bioprodukten aus feststoffhaltigen Biosuspensionen daher von großem Interesse. Im industriellen Maßstab werden für die Aufreinigung von Proteinen bislang vor allem die folgenden beiden Verfahren angewendet:

- Expanded Bed Adsorption (EBA) (Anspach et al. 1999; Brixius et al. 2005)
- Aqueous Two Phase Systems (ATPS) (Persson et al. 2005)

Beide Techniken haben zum Ziel, die lösliche Zielkomponente zu Beginn der Aufarbeitung in einem Schritt aus einer komplexen, feststoffhaltigen Suspension zu isolieren und aufzukonzentrieren. Eine neue, viel versprechende Technik ist das High

Gradient Magnetic Fishing' Verfahren (HGMF) (Dunnill and Lilly 1974, Hubbuch et al. 2001). Unter Verwendung spezieller magnetischer Affinitätssorbentien scheint das HGMF- Verfahren eine Alternative zu den beiden oben genannten Aufreinigungstechniken darzustellen.

Im Vordergrund des zu entwickelnden Gesamtprozesses für die Aufreinigung der Haloalkan Dehalogenase steht die Kostenminimierung des Herstellungsverfahrens über die Reduktion einzelner Prozessschritte. Aus dem Zellaufschluss der Biomasse ergibt sich, dass nicht nur lösliche Bestandteile, sondern auch größere Zelltrümmer in der Zellsuspension enthalten sind. In diesem Zusammenhang sollen die Vorteile der Magnettrenntechnik genutzt werden. Werden die Separationseigenschaften der Magnetpartikel mit Affinitätseigenschaften kombiniert, so kann in einem Schritt sowohl die Grob- als auch die Feinreinigung eines Proteins durchgeführt werden.

In den folgenden Abschnitten wird der sich der Produktion der Haloalkan Dehalogenase anschließende Aufreinigungsprozess diskutiert. Insbesondere wird auf die räumliche Nähe der sequentiell ablaufenden Prozessschritte eingegangen. Abschnitt 5.3.1 befasst sich mit dem Zellaufschluss der Mikroorganismen. Die Grob- und Feinreinigung des Enzyms sowie dessen Konditionierung wird in den Abschnitten 5.3.2 und 5.3.3 beschrieben.

### **5.3.1. Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle**

Für den Zellaufschluss von Mikroorganismen im technischen Maßstab stehen aus Kostengründen und in Hinblick auf die Produktausbeute nur wenige Methoden zur Verfügung. Vor allem mechanische Methoden, wie die Homogenisierung der Zellsuspension mittels eines Hochdruckhomogenisators oder einer Kugelmühle kommen in größerem Umfang zur Anwendung (Schutte and Kula 1990; Middelberg 1995).

Der Zellaufschluss wurde im vorliegenden Prozess über eine Rührwerkskugelmühle der Firma Netzsch mit einem Fassungsvermögen von 4,8 l realisiert. Aus den Gerätedimensionen ergibt sich, dass ein Zellaufschluss des gesamten Bioreaktorinhalts durch einen einmaligen Eintrag in die Rührwerkskugelmühle nicht möglich ist. Aus diesem Grund wird der Inhalt des Bioreaktors am Ende der Hochzelldichte- Kultivierung kontinuierlich im Kreislauf durch die Kugelmühle gepumpt. Durch das mehrmalige Passieren der Aufschlusskammer kann zudem ein erhöhter Wärmeeintrag in die Zellsuspension vermieden werden. Diese Vorgehensweise minimiert das Risiko der

Hitzedenaturierung von Proteinen. Ein detailliertes Anlagenschema zeigt die Abbildung 5-6.

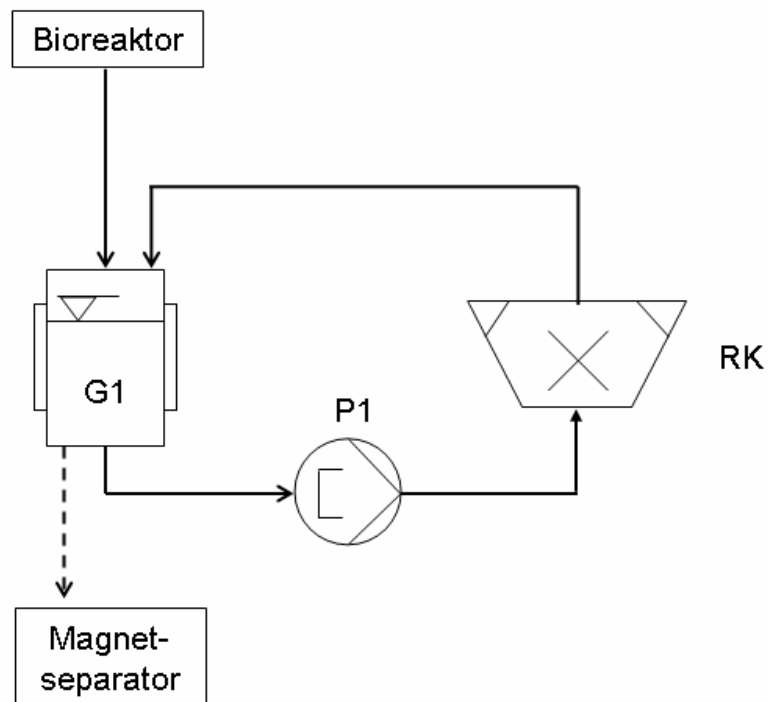


Abbildung 5-6: **Fließschema für den Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle.** Der Inhalt des Bioreaktors gelangt in die gekühlte Vorlage (G1). Von dort aus wird die Zellsuspension über eine Schlauchpumpe (P1) in die gekühlte Rührwerkskugelmühle (RK) gepumpt und wieder in die Vorlage zurückgeführt.

Der Zellaufschlussgrad kann über direkte oder indirekte Methoden ermittelt werden. Direkte Methoden, zu denen beispielsweise die Ermittlung intakter Zellen zählt, sind meist zeitintensiver und stärker fehlerbehaftet als indirekte Methoden, bei denen z.B. die Freisetzung von Enzymen über eine Aktivitätsbestimmung gemessen wird. Der Aufschlussgrad ist durch die Gleichung 5-2 definiert. Er ist demnach sehr stark von der oft nur schwierig zu bestimmenden maximalen Konzentration der Messgröße abhängig. Im vorliegenden Fall wird der Aufschlussgrad über die freigesetzte Proteinmenge während des Zellaufschlusses bestimmt. Die maximal erreichbare Proteinkonzentration wird hierbei auf 30 % der Biotrockenmasse festgesetzt.



$$A = \frac{(c - c_0)}{(c_{\max} - c_0)} \cdot 100(\%) \quad (5-2)$$

Darin bedeuten

- $c$  (g l<sup>-1</sup>) die gemessene Proteinkonzentration,  
 $c_0$  (g l<sup>-1</sup>) die anfängliche Proteinkonzentration und  
 $c_{\max}$  (g l<sup>-1</sup>) die maximal erreichbare Proteinkonzentration.

Im Verlauf des Zellaufschlusses werden Proben entnommen und diese auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Nach einer Aufschlusszeit von 60 min konnte kein weiterer Anstieg der Proteinkonzentration gemessen werden, so dass nach dieser Zeit der Zellaufschluss beendet wird (Abbildung 5-7). Der Rohextrakt wird direkt nach Ende des Zellaufschlusses 1:1 mit Extraktionspuffer verdünnt und in einen gekühlten Vorlagenbehälter der HGMF-Anlage überführt.

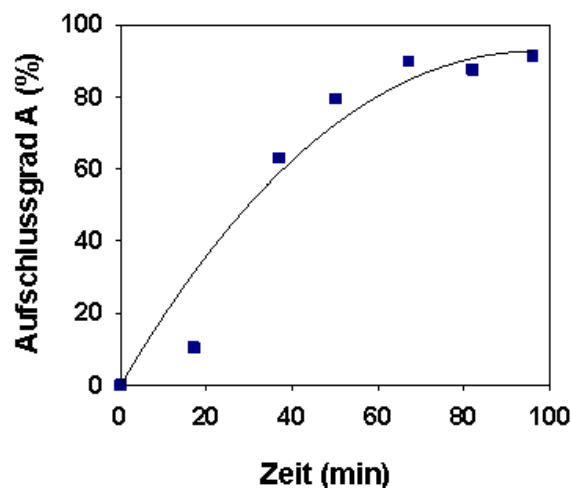


Abbildung 5-7: **Verlauf des Aufschlussgrades A (%) über der Zeit.** Der Zellaufschluss der *E. coli* BW3110 Suspension erfolgt mittels einer Rührwerkskugelmühle. Der Aufschlussgrad errechnet sich aus den während des Aufschlusses gemessenen Proteinkonzentrationen im Überstand.

### 5.3.2. Proteinaufreinigung mittels Magnettrenntechnik

Über die magnetischen Eigenschaften der eingesetzten MPVA Partikel der Firma Chemagen Biopolymer Technologie AG, verbunden mit Affinitätseigenschaften der daran immobilisierten Iminodiessigsäure (IDA)-Gruppen gelingt es, die Grob- und Feinreinigung des rekombinanten Proteins in einem einzigen Prozessschritt durchzuführen. Der Chelatbildner IDA wurde ursprünglich in der „Immobilised Metal Affini-

ty Chromatography“ eingesetzt (Porath and Olin 1983). Das Prinzip der IMAC beruht auf der Affinität der Aminosäure Histidin zu zweiwertigen Metallionen, wie z.B. Kobalt oder Kupfer, welche an die IDA- Gruppe gekoppelt sind (Abbildung 5-8).

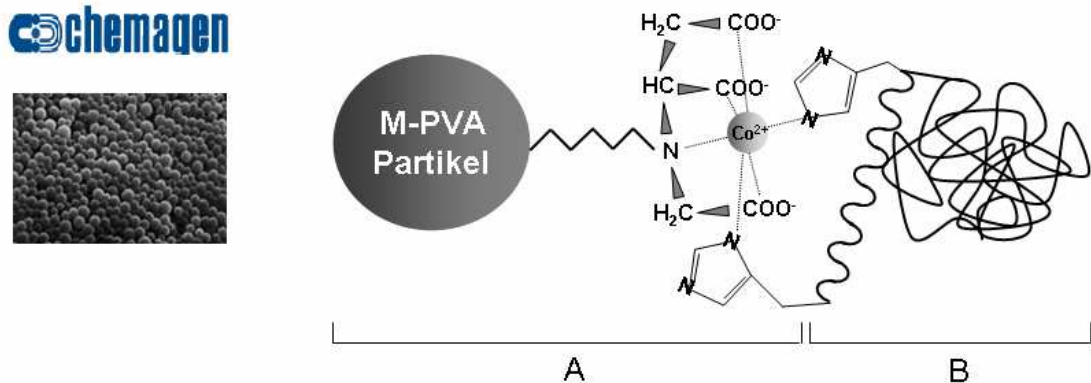


Abbildung 5-8: **M-PVA-Partikel der Firma Chemagen Biopolymer Technologie AG**, welche mit einer Iminodiessigsäuregruppe funktionalisiert ist. Schematische Darstellung des (A) funktionalisierten M-PVA Partikels mit (B) dem rekombinanten His-getagtem Protein.

Über die Methode, der auf der Affinitätstrenntechnik basierenden Magnetaufreinigung, innerhalb des Downstream- Prozesses der Haloalkan Dehalogenase, lassen sich drei Aufreinigungsstufen eliminieren.

- (1) Die Biomasseabtrennung nach der Hochzelldichte-Kultivierung über Zentrifugation,
- (2) die Abtrennung von Zelltrümmern nach dem Zellaufschluss über Filtrations- oder Zentrifugationsschritte, sowie
- (3) die Grobreinigung des rekombinanten Proteins aus der Zellsuspension über Fällungs- oder Extraktionsschritte.

Äquivalent zu diesem Verfahren ist die so genannte EBA- Chromatographie. Entgegen der Chromatographie im Festbettverfahren können hier ebenfalls Schritte wie die Abtrennung von Zelltrümmern und die Grobreinigung des Proteins in einer Prozessstufe erfolgen. Deshalb soll die Magnettrenntechnik im Rahmen der Diskussion mit der EBA- Technik verglichen werden.

### 5.3.2.1. Versuche im Labormaßstab

Vor der Aufreinigung des Biokatalysators in der vollautomatisierten HGMP-Anlage werden zunächst einige Versuche im Labormaßstab durchgeführt, um eine Sorptionsisotherme für das rekombinante Protein zu gewinnen. Über die Sorptions-

isotherme lassen sich Aussagen über die maximale Bindungskapazität der eingesetzten Magnetpartikelcharge in Bezug auf das Fusionsprotein GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> treffen.

Der Einfluss der Zielproteinkonzentration im Rohextrakt auf die Bindungskapazität kann über die Aufnahme einer Sorptionsisotherme gezeigt werden. Hieraus ergibt sich auch die für das Zielprotein maximale Sorptionskapazität  $q_{max}$ , bezogen auf die eingesetzten Magnetpartikel der Charge 28/29/87. Die Werte für die Sorptionskapazität  $q^*$  und die Proteinkonzentration  $c_0$  von GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> im Rohextrakt werden über Aufreinigungsversuche mit 2 mg Magnetpartikeln je Ansatz ermittelt (Abschnitt 3.2.4). Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt sowie im Sorptionsüberstand wird mittels Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die aus diesen Daten ermittelte Sorptionsisotherme nach Langmuir ist in Abbildung 5-9 dargestellt. Hierfür wird, die an die Partikel gebundene GFP-DhaA<sup>CYYF</sup>-Konzentration ( $q^*$ ) gegen die im Rohextrakt verbleibende GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> Konzentration ( $c^*$ ) aufgetragen. Der Parameter  $q^*$  ergibt sich in diesem Zusammenhang aus der von dem Magnetpartikel eluierten Proteinkonzentration. Die Berechnung der Langmuir-Parameter erfolgt mittels einer nichtlinearen Regression mit dem Programm Sigma Plot 2000 nach folgender Gleichung:

$$q^* = \frac{q_{max} \cdot c^*}{K_d + c^*} \quad \left( \frac{mg \text{ Protein}}{g \text{ Partikel}} \right) \quad (5-3)$$

Dabei steht

$q_{max}$  (mg g<sup>-1</sup>) für die maximale Sorptionskapazität,

$c^*$  (g l<sup>-1</sup>) für die im Rohextrakt verbleibende Proteinkonzentration und

$K_d$  (g l<sup>-1</sup>) für die Dissoziationskonstanten.

Die Langmuir-Parameter  $q_{max}$  und  $K_d$  geben Aufschluss über die maximale Partikelkapazität für GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> und die Affinität des Proteins zu dem Magnetpartikel. Für  $q_{max}$  ergibt sich ein Wert von 36 mg GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> pro Gramm Partikel während der  $K_d$ -Wert bei 0,4 g l<sup>-1</sup> liegt. Die Dissoziationskonstante  $K_d$  ist vergleichbar mit dem  $K_M$ -Wert innerhalb der Michaelis-Menten Kinetik. Das bedeutet je kleiner der  $K_d$ -Wert ausfällt, desto größer ist die Affinität des rekombinanten Proteins zu dem Adsorbens ausgeprägt (Hubbuch et al. 2002).

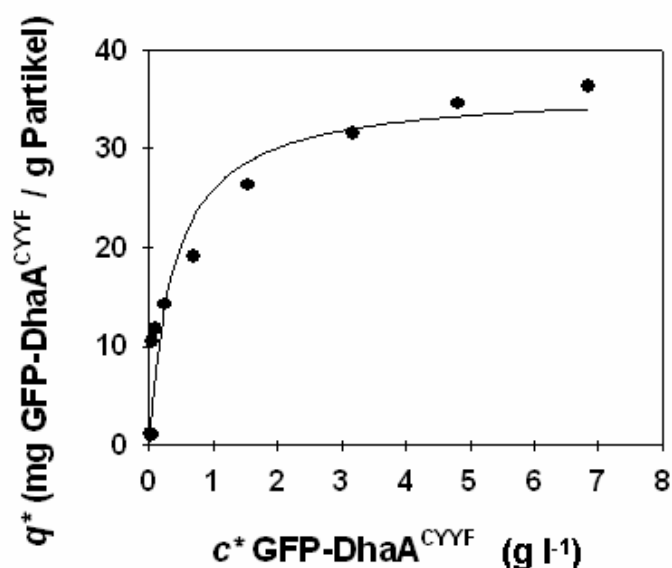


Abbildung 5-9: Sorptionsisotherme nach Langmuir für das Fusionsprotein GFP-DhaA<sup>CYYF</sup>. Dargestellt ist die Sorptionskapazität  $q^*$  (mg Protein/g Partikel) über der im Rohextrakt verbleibenden Proteinkonzentration  $c^*$  (g l<sup>-1</sup>). Die Versuche werden mit je 1 ml Rohextrakt und 2 mg MPVA-IDA Partikel der Charge 28/29/87 durchgeführt, wobei unterschiedliche Verdünnungen des Rohextrakts erstellt werden.

Die experimentell bestimmten Langmuir Parameter hängen im hohen Maße von dem eingesetzten magnetischen Grundpartikel, von dessen Funktionalisierung sowie von der für die Aufreinigung eingesetzten Proteinsuspension ab (Franzreb et al. 2006). Bei einem Vergleich von Langmuir-Parameter aus der Literatur ist darauf zu achten, dass zunächst lediglich Vergleichssysteme gewählt werden, bei denen die Aufreinigung des Zielproteins aus Mehrkomponenten-Proteinlösungen erfolgte. Am Beispiel des rekombinanten Proteins GFP-His<sub>6</sub> konnte gezeigt werden, dass innerhalb von Ein- und Mehrkomponentensystemen erhebliche Unterschiede bei den Dissoziationskonstanten  $K_d$  auftreten (Ebner 2006). Adsorptionsstudien im Batch Ansatz aus komplexen Proteinlösungen wurden beispielsweise für die Proteine Trypsin (Heeboll-Nielsen 2002), Lactoferrin (Meyer 2004), Lactoperoxidase (Heeboll-Nielsen et al. 2004) und für das bereits genannte rekombinante GFP-His<sub>6</sub> durchgeführt. Eine Zusammenstellung der in diesen Arbeiten genutzten Magnetpartikel, sowie die für diese Systeme ermittelten Langmuir-Parameter sind in Tabelle 5-1 gegeben. Aus diesen Daten geht hervor, dass die maximale Sorptionskapazität  $q_{max}$  für die Haloalkan Dehalogenase an die eingesetzten PVA-Partikel in der selben

Größenordnung liegt wie bei den Proteinen in den vorstehend genannten Beispielen. Die Dissoziationskonstante für GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> ist hingegen gegenüber den  $K_d$ -Werten der anderen Systeme mit 0,4 g l<sup>-1</sup> relativ hoch.

Tabelle 5-1: **Langmuir Parameter unterschiedlicher Proteine aus Mehrkomponenten-Adsorptionsstudien.** PGFA (Polyglutaraldehyd), PVA (Polyvinylalkohol), p-Ab (p-Aminobenz-amid). Die angegebenen Literaturdaten beziehen sich auf (1) (Heeboll-Nielsen 2002), (2) (Heeboll-Nielsen et al. 2004), (3) (Meyer 2004), (4) (Ebner 2006) und (5) diese Arbeit.

Protein	Extrakt	Grundpartikel	Ligand	Ø (µm)	$K_d$ (g l <sup>-1</sup> )	$q_{max}$ (mg g <sup>-1</sup> )	Literatur
Trypsin	Molke Hydrolysat	PGAF	p-Ab	0,5-1,5	0,013	55	(1)
Lactoperoxidase	Molke	PGAF	-SO <sub>3</sub>	0,5-1,5	7,7·10 <sup>-4</sup>	8	(2)
Lactoferrin	Molke	PGAF	-SO <sub>3</sub>	0,5-1,5	2,1·10 <sup>-4</sup>	12,6	(3)
GFP-His <sub>6</sub>	<i>E. coli</i> Homogenisat	PVA	IDA-Cu	1,5	0,047	92	(4)
GFP-DhaA <sup>CYYF</sup>	<i>E. coli</i> Homogenisat	PVA	IDA-Cu	1,5	0,4	36	(5)

Anhand von weiteren untersuchten Partikelchargen der Firma Chemagen Biopolymer Technologie AG konnte gezeigt werden, dass die maximale Sorptionskapazität des Fusionsproteins GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> auf das Doppelte (70 – 80 mg g<sup>-1</sup>) gesteigert werden kann. Ein Ansatz zur Verbesserung der Proteinaufreinigung mit Hilfe der Magnettrenntechnik kann deshalb auf dem Gebiet der Magnetpartikelentwicklung gesehen werden, welche noch ein erhebliches Potential in sich birgt.

### 5.3.2.2. Versuche im halbtechnischen Maßstab

Im Rahmen der Magnetseparation im halbtechnischen Maßstab wird die so genannte „High Gradient Magnetic Fishing“ (HGMF) (Dunnill and Lilly 1974, Hubbuch et al. 2001) Methode genutzt. Die für die HGMF- Methode genutzten Anlagen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Magnetseparator beinhalten, der im Durchfluss- Verfahren betrieben werden kann. Das Kernstück der HGMF- Anlage bildet ein in sich abgeschlossenes Kreislaufsystem, in das der Magnetseparator als auch eine Pumpe integriert ist (Abbildung 5-10). Innerhalb dieses abgeschlossenen Systems findet das, für die einzelnen Wasch- und Elutionsschritte, erforderliche wiederholende Separieren und Suspendieren der Magnetpartikel statt.

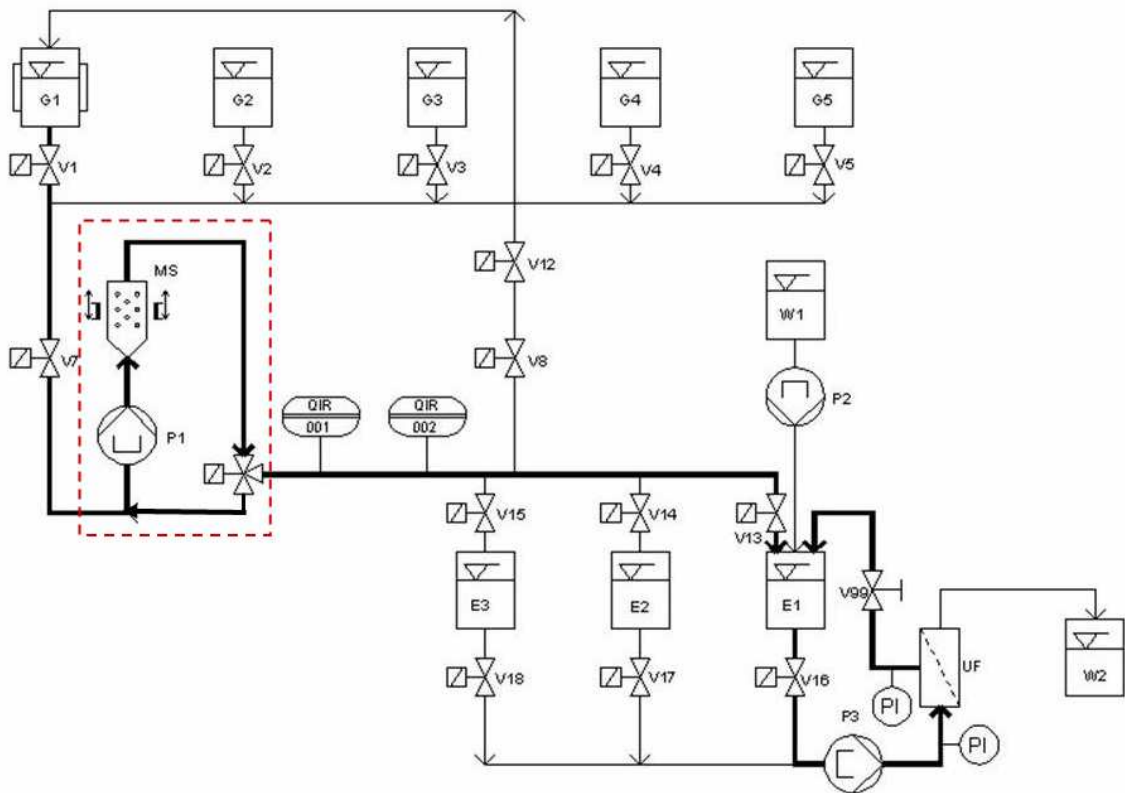


Abbildung 5-10: **Voll automatisierte HGMF-Anlage zur Aufreinigung von 5 l Rohextrakt pro Reinigungszyklus.** Darin bedeuten: G1-G5: Vorlagenbehälter für Magnetpartikel, Equilibrierungs- und Elutionspuffer, die Kupferlösung sowie für den Rohextrakt; E1-E3: Vorlagengefäße für das Eluat, Retentat und den Abfall; V<sub>x</sub>: Magnetventil Nr. x; P1-P3: Schlauchpumpen; MS: Separationskassette mit Permanentmagnet; UF: Cross-Flow Filtrationskassette; QIR 001 und QIR 002: Fluoreszenz- und UV-Sonde; W1 und W2: Vorlagenbehälter für Filtrationspuffer und Filtrat; PI: Manometer. Das abgeschlossene Kreislaufsystem, in dem die Sorption und Desorption der Partikel im magnetischen Feld erfolgt, ist rot umrandet. Die Anlage wurde in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Karlsruhe konzipiert. Der Anlagenbau wurde von A. Hauck (Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart) durchgeführt. Die Anlage selbst wurde im Rahmen der Dissertation von Ebner (Ebner 2006) automatisiert. Detaillierte Angaben zu der Separationsanlage sind dem Abschnitt 3.2.4 dieser Arbeit zu entnehmen.

Für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> innerhalb der HGMF- Anlage lassen sich anhand der Sorptionsisotherme Arbeitspunkte bzw. Aufreinigungsstrategien festlegen. Generell lassen sich zwei Strategien unterscheiden:

- (1) Es kann zum einen im Bereich der maximalen Sorptionskapazität der Partikel gearbeitet werden. Dies bedeutet, dass das Zielprotein in dem aufzuarbeitenden Rohextrakt im Überschuss vorliegen muss. Bei dieser Aufreinigungsstrategie wird in Kauf genommen, dass die Ausbeute des Gesamtprozesses sinkt.
- (2) Eine zweite Aufreinigungsstrategie ist darauf ausgerichtet, eine möglichst hohe Ausbeute aus dem Prozess zu ziehen. Die in diesem Fall vorgelegte Zielproteinkonzentration im Zellrohextrakt muss dabei der maximalen Sorptionskapazität der eingesetzten Magnetpartikel entsprechen. Möchte man an diesem Punkt arbeiten, so bewegt man sich auf der Sorptionsisotherme (Abbildung 5-9) in Richtung einer geringeren Sorptionskapazität  $q^*$ .

In den durchgeführten Versuchen wurde zunächst im Bereich der maximalen Sorptionskapazität der Partikel gearbeitet, so dass eine geringe Ausbeute innerhalb des Gesamtprozesses zu erwarten ist. Das Verhältnis zwischen der von der Partikelmenge  $m_p$  zu sorbierenden Zielproteinmenge und der eingesetzten Menge an Zielprotein im Rohextrakt beschreibt die Ausbeute  $Y_{Ads}$  des Adsorptionsprozesses, die während der Aufreinigung erreicht werden kann (Gleichung 5-4). Die Ausbeute errechnet sich aus der Sorptionskapazität  $q^*$  und der eingesetzten Partikelmenge  $m_p$ , dividiert durch das Produkt aus der Konzentration  $c_0$  des Zielproteins im Rohextrakt und dem Aufreinigungsvolumen  $V_0$ .

$$Y_{Ads} = \frac{q^* \cdot m_p}{c_0 \cdot V_0} \left( \frac{\text{g adsorbiertes Protein}}{\text{g Protein im Rohextrakt}} \right) \quad (5-4)$$

Dabei steht

- $q^*$  (mg g<sup>-1</sup>) für die Sorptionskapazität,
- $m_p$  (g) für die eingesetzte Partikelmenge,
- $c_0$  (g l<sup>-1</sup>) für die Konzentration des Zielproteins im Rohextrakt und
- $V_0$  (l) für das gewählte Aufreinigungsvolumen.

Die Sorptionskapazität  $q^*$  ist als Quotient des Produkts der maximalen Sorptionskapazität  $q_{max}$  und der nach der Sorption verbleibenden Proteinkonzentration im Roh-

extrakt  $c^*$  und der Summe aus Dissoziationskonstanten  $K_d$  und  $c^*$  definiert (Gleichung 5-3). Mit den Langmuir-Parametern  $q_{max}$  und  $K_d$ , die innerhalb der Versuche im Labormaßstab ermittelt wurden, können theoretische Ausbeuten für unterschiedliche Mengen an eingesetzten Magnetpartikeln und Rohextraktvolumina errechnet werden. Auf Grundlage dieser Parameter wird der Aufreinigungsprozess in der HGMF- Anlage ausgelegt. Unter der Annahme, dass im Bereich der maximalen Sorptionskapazität gearbeitet wird, können theoretisch mit 100 g Magnetpartikeln aus 5 l Rohextrakt  $Y_{Ads} = 168$  mg adsorbiertes Protein pro Gramm eingesetztem Zielprotein aufgereinigt werden. Dies entspricht einer Gesamtproteinmenge von 3,5 g pro Aufreinigungszyklus.

Der Aufreinigungsprozess des rekombinanten Proteins wird nach erfolgtem Zellaufschluss mittels Kugelmühle in vier aufeinander folgenden Aufreinigungszyklen durchgeführt. Unter einem Aufreinigungszyklus sind die nachstehenden Schritte zu verstehen, die innerhalb der HGMF- Anlage ablaufen:

- (1) Die Adsorption des rekombinanten Proteins an die Magnetpartikel,
- (2) die Entfernung von Fremdprotein und Zelltrümmer durch Waschschriffe einschließlich der Elution des Zielproteins von den Partikeln und
- (3) die Bereitstellung der Magnetpartikel für einen neuen Aufreinigungszyklus.

Wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, werden die einzelnen Schritte eines Aufreinigungszyklus über ein rechnergestütztes Programm gesteuert. Für die oben beschriebenen Einzelschritte werden hierbei die Programm-Module HP\_1 bis HP\_3 durchlaufen. Einmalig vor dem ersten Aufreinigungszyklus werden innerhalb des Programm- Moduls HP\_0 die Magnetpartikel mit  $Cu^{2+}$  Ionen beladen. Der ebenfalls einmalig ablaufende Schritt nach dem letzten Aufreinigungszyklus dient der Reinigung und Rückgewinnung der Partikel aus der Anlage (HP\_4) (Abbildung 5-11).



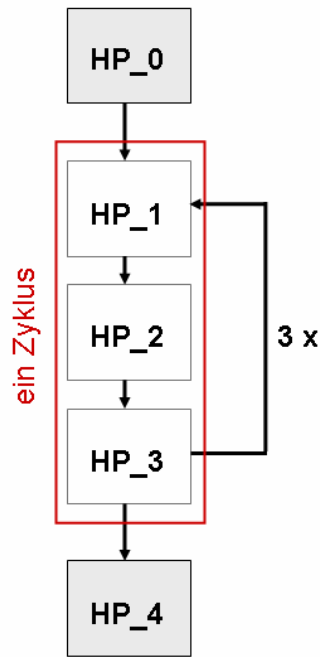


Abbildung 5-11: **Abfolge der einzelnen Programm-Module während des Betriebs der HGMF-Anlage für die Aufreinigung von GFP-DhaA<sup>CYYF</sup>**. Ein Aufreinigungszyklus setzt sich aus den drei Modulen HP\_1, HP\_2 und HP\_3 zusammen. In den einzelnen Modulen wird der Rohextrakt in die Anlage geleitet, die Sorption des Zielproteins an die Magnetpartikel sowie die Abtrennung von Fremdprotein erfolgt, das Zielprotein wird von dem Sorbens eluiert und die Partikel für einen neuen Zyklus vorbereitet. Für jeden Aufreinigungszyklus wird neuer Rohextrakt in die Anlage eingebracht. Das vorgelagerte und nachgelagerte Modul HP\_0 bzw. HP\_4 wird innerhalb des Aufreinigungsprozesses lediglich einmal durchlaufen und dient der Einbringung und Rückführung der Magnetpartikel aus dem Vorlagengefäß in die HGMF-Anlage und umgekehrt.

Die aus der Fed-Batch Kultivierung stammenden 12 l Zellsuspension wurden zunächst wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben aufgeschlossen, mit Extraktionspuffer verdünnt und in das Vorlagengefäß G5 der HGMF-Anlage übererführt (Abbildung 5-10). Zu Beginn eines jeden Zyklus werden ausgehend von diesem Vorlagengefäß während des Programm-Moduls HP\_1 jeweils 5 l Rohextrakt in die Anlage gepumpt, woraus sich ergibt, dass die eingesetzte Gesamtproteinmenge zu Beginn jedes Aufreinigungszyklus gleich ist. Die in der Anlage vorliegenden Magnetpartikeln werden in diesem ersten Schritt zusammen mit dem Rohextrakt in das Vorlagengefäß G1 überführt, in dem die Adsorption des rekombinanten Proteins an die Magnetpartikel innerhalb von 1-2 Minuten stattfindet. Die nachfolgenden Schritte werden vollständig in dem Kreislaufsystem der HGMF-Anlage durchgeführt, in dem sich der Magnetseparator befindet. Die Magnetpartikel werden daher nach dem Adsorptionsvorgang zunächst aus dem Vorlagengefäß in dieses Kreislaufsystem eingebracht. Die Separation der Partikel erfolgt hierbei innerhalb des Magnetseparators über eine sich im Magnetfeld befindliche Filtermatrix (3.2.4). Das Befüllen dieses Systems mit z.B. Extraktionspuffer verdrängt automatisch den davor enthaltenen überschüssigen Rohextrakt, der in das Abfallgefäß E3 geleitet wird. Die erneute Suspension der Partikel innerhalb eines Waschschrittes kann dadurch erreicht werden, dass die neu eingebrachte Pufferlösung mittels hoher Durchflussgeschwindigkeiten von  $12 \text{ l min}^{-1}$  in dem geschlossenen Kreislaufsystem zirkuliert. Wichtig ist dabei, dass sich die Separationsmatrix außerhalb des magnetischen Feldes befindet. In einem Wechsel von Sorption und Desorption der Partikel in und außerhalb des magnetischen Feldes

werden die einzelnen Programm- Module eines Zyklus durchlaufen, in denen unterschiedliche Pufferlösungen zum Waschen und Eluieren der Partikel in das Kreislaufsystem eingebracht werden. Am Ende eines Aufreinigungszyklus werden die Magnetpartikel wieder in das Vorlagengefäß G1 überführt, um anschließend zu Beginn des nächsten Zyklus mit neuem Rohextrakt versetzt zu werden.

Die Ergebnisse der vier nacheinander durchgeführten Aufreinigungszyklen sind in Tabelle 5-2 und Tabelle 5-3 zusammengestellt. Die Reinheitsgrade der einzelnen Elutionsfraktionen sind über densitometrische Auswertungen von SDS-Gelen ermittelt worden.

Anhand der im Rohextrakt verbleibenden Zielproteinkonzentration  $c^*$ , die sich aus der Differenz zwischen eingesetzter Zielproteinkonzentration  $c_0$  und der aufgereinigten Konzentration an GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> errechnet werden kann, ergibt sich, dass die Sorptionskapazität der Partikel statt bei  $q_{max} = 36 \text{ mg g}^{-1}$  bei durchschnittlich  $q^* = 32 \text{ mg g}^{-1}$  lag. Hieraus ergibt sich aber auch, dass lediglich ein geringer Anteil von ursprünglich 100 g eingesetzten Partikeln als Adsorbens zur Verfügung gestanden haben muß. Die durchschnittlich an der Adsorption teilnehmenden Magnetpartikel lag bei der errechneten Sorptionskapazität  $q^*$  bei 22 g.

**Tabelle 5-2: Errechnete Sorptionskapazitäten  $q^*$ , die sich innerhalb der vier Aufreinigungszyklen ergeben.** Angegeben ist die je Zyklus eingesetzte Konzentration an GFP-DhaA<sup>CYYF</sup>, die aufgereinigte Proteinkonzentration  $c_p$ , sowie die sich daraus ergebende verbleibende Proteinkonzentration im Rohextrakt  $c^*$  und die Sorptionskapazität  $q^*$ . Aus diesen Daten lässt sich die an der Adsorption teilnehmende Partikelmenge  $m_p$  errechnen.

	$c_0$ GFP-DhaA <sup>CYYF</sup> (g l <sup>-1</sup> )	$c_p$ GFP-DhaA <sup>CYYF</sup> (g l <sup>-1</sup> )	$c^*$ GFP-DhaA <sup>CYYF</sup> (g l <sup>-1</sup> )	$q^*$ (mg g <sup>-1</sup> )	$m_p$ <sup>(1)</sup> (g)
Zyklus 1	3,88	0,28	3,60	32,4	30
Zyklus 2	3,88	0,18	3,70	32,5	19
Zyklus 3	3,88	0,26	3,62	32,4	26
Zyklus 4	3,88	0,15	3,73	32,5	16

<sup>(1)</sup> Die Berechnung von  $m_p$  erfolgt nach folgender Gleichung:

$$m_p = \frac{c_p \cdot V}{q^*} \quad (\text{g}) \quad \text{mit} \quad q^* = \frac{q_{\max} \cdot (c_0 - c_p)}{K_d + (c_0 - c_p)} \quad (\text{mg g}^{-1}) \quad (5-5)$$

Tabelle 5-3: **Ergebnisse der Proteinaufreinigung von GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> mittels der HGMF-Anlage.** Der Versuch ist je Zyklus mit 5 l Rohextrakt und mit anfänglich 100 g MPVA-Partikeln der Charge 28/29/87 durchgeführt worden. Angegeben sind die Werte für den zu Beginn jedes Aufreinigungszyklus eingesetzten Rohextrakt als auch die Werte für die einzelnen Elutionsfraktionen der vier Zyklen. Die Elution des rekombinanten Proteins von den Partikeln erfolgte hierbei mit Imidazol haltigem Puffer.

		Gesamt- protein (g l <sup>-1</sup> )	GFP- DhaA <sup>CYYF</sup> (g l <sup>-1</sup> )	V (l)	Y <sub>Ads</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	Ausbeute (%)	Rein- heitsgrad (%)
Zyklus 1	Rohextrakt	13,7	3,9	5,0	-	100	28
	Eluat	0,4	0,28	3,5	50,1	7,1	79
Zyklus 2	Rohextrakt	13,7	3,9	5,0	-	100	28
	Eluat	0,37	0,18	3,5	31,8	4,5	77
Zyklus 3	Rohextrakt	13,7	3,9	5,0	-	100	28
	Eluat	0,63	0,26	3,3	43,4	6,7	73
Zyklus 4	Rohextrakt	13,7	3,9	5,0	-	100	28
	Eluat	0,38	0,15	3,4	26,1	3,8	76

Anhand der Aufreinigungsdaten wird ersichtlich, dass die theoretische erwartete Produktmenge von 3,6 g Protein je Zyklus nicht erreicht werden konnte. Dies zeigt, dass an Stelle der eingesetzten 100 g Partikel deutlich weniger am Aufreinigungsprozess teilgenommen haben müssen. Geht man von der in Tabelle 5-2 errechneten Partikelmenge aus, die je Zyklus an dem Adsorptionsvorgang teilnimmt, so ergibt sich, dass durchschnittlich 38 mg rekombinantes Protein pro Gramm des eingesetzten Zielproteins gebunden hat. Die Ausbeute innerhalb der einzelnen Zyklen, die sich aus dem aufgereinigten Protein bezogen auf die eingesetzte Menge an rekombinantem Protein ergibt, fällt mit 3,8 % bis 7,1 % sehr gering aus. Die geringe Ausbeute ist auf die gewählte Prozessstrategie zurückzuführen, in der ein Verlust auf Grund des Überangebots an Zielprotein zu Gunsten von  $q_{max}$  in Kauf genommen wird. Die verringerte Ausbeute ist entweder auf eine verringerte Sorptionskapazität  $q^*$  der Partikel zurückzuführen, oder wie zuvor beschrieben an einer geringeren Magnetpartikelmenge  $m_p$ , die während des Adsorptionsprozesses in dem Vorlagengefäß G1 vorhanden war, fest zu machen. Ständen wie zuvor angenommen 100 g der Magnetpartikel während des Adsorptionsvorgangs zur Verfügung, dann würde sich am Beispiel des ersten Zyklus eine Sorptionskapazität der Partikel von  $q^* = 9,7 \text{ mg g}^{-1}$  ergeben. Allerdings konnte im Verlauf der Aufreinigungszyklen beobachtet werden, dass sowohl Partikel aus der Anlage ausgetragen wurden, als auch

Probleme bei der Partikelrückführung auftraten. Dies lässt vermuten, dass sowohl eine geringere Sorptionskapazität der Partikel als auch eine Abnahme des Adsorbens zu der geringen Ausbeute führte.

Um einen Vergleich mit anderen HGMF-Studien anstellen zu können, sind in Tabelle 5-4 einige bekannte Aufreinigungsprozesse, die mittels Magnettrenntechnik durchgeführt wurden, aufgelistet. Gegenüber den dort präsentierten erzielten Proteinaufreinigungsergebnissen, fällt die im Rahmen der durchgeführten Experimente erzielte Aufreinigungsausbeute gering aus. Dies resultiert daraus, dass im Verhältnis zu der im Rohextrakt vorliegende Zielproteinmenge zu wenige Magnetpartikel eingesetzt wurden. Das heißt auch bei einer maximalen Sorptionskapazität der Partikel von  $q_{max} = 36 \text{ mg g}^{-1}$  hätte lediglich eine Ausbeute von 18,5 % erreicht werden können. Direkt vergleichbar ist dieser Aufreinigungsprozess mit der Aufreinigung von GFP-His<sub>6</sub> aus *E. coli* Homogenisat (Ebner 2006), die in der gleichen Anlage und mit den selben Magnetpartikeln durchgeführt worden ist. In den beiden Fällen standen während der Adsorptionsphase der Aufreinigung je Zyklus 220 mg GFP-His<sub>6</sub> bzw. 194 mg GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> pro g Partikel zu Verfügung. Die maximale Partikelkapazität  $q_{max}$  ist allerdings für GFP-His<sub>6</sub> mehr als doppelt so hoch als für GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> (Tabelle 5-1), was die deutlich geringere Ausbeute des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Prozesses erklärt. Eine Erhöhung der Proteinausbeute kann über eine Reduktion der eingesetzten Menge des aufzureinigenden Proteins bei gleich bleibender Partikelmenge erreicht werden. So wurde z.B. bei der in Tabelle 5-4 erstgenannten Aufreinigung von GFP-His<sub>6</sub> (Ebner 2006) eine Ausbeute von 66 % erzielt, in dem das Verhältnis von eingesetztem Zielprotein zu Magnetpartikeln von 220 auf 117 mg GFP-His<sub>6</sub> pro g Partikel reduziert wurde. Die bislang beste Ausbeute innerhalb der in Tabelle 5-4 aufgeführten HGMF- Aufreinigungen wurde mit 75 % in der Veröffentlichung von Holschuh (Holschuh 2005) beschrieben.

Tabelle 5-4: **Proteinaufreinigung mittels HGMF-Systemen.** In der Tabelle sind die Proteinmenge im Rohextrakt  $c_0$  ( $\text{mg l}^{-1}$ ), die eingesetzte Partikelkonzentration  $m_P$  ( $\text{g l}^{-1}$ ), das Volumen des Rohextraktes  $V_0$  (l), sowie die Ausbeute und die Reinheit von aufgereinigten Proteinlösungen aufgelistet. Referenzen: 1) (Heeboll-Nielsen 2002); 2) (Meyer 2004), 3) (Holschuh 2005), 4) (Ebner 2006).

System	Partikel/ Ligand	$c_0$ ( $\text{mg l}^{-1}$ )	$m_P$ ( $\text{g l}^{-1}$ )	$V_0$ (L)	Ausbeute (%)	Reinheit (%)	Referenz
Trypsin aus Molkehydrolysat	PGAF/ $\rho$ -Ab	84	5,0	0,055	75	-	1)
Lactoferrin aus Molke	PGAF/ $\text{SO}_3$	106	5,0	2,2	47	26	2)
Ig2b Antikörper aus Mäusen	MagPrep/ ProteinA	20	1,0	100	75	-	3)
GFP-His <sub>6</sub> aus <i>E. coli</i> Homogenisat	PVA/ IDA-Cu	2540	21,6	2,25	66	95	4)
GFP-His <sub>6</sub> aus <i>E. coli</i> Homogenisat	PVA/ IDA-Cu	4880	22,1	5,6	25	98	4)
GFP-DhaA <sup>CYF</sup> aus <i>E. coli</i> Homogenisat	PVA/ IDA-Cu	3880	20,0	5,0	4	76	diese Arbeit

Aus der Tabelle 5-4 geht hervor, dass die HGMF-Methode ein sehr breites Spektrum bezüglich des zur Anwendung kommenden Maßstabs bietet. Die in Kooperation mit dem Forschungszentrum Karlsruhe entwickelte HGMF-Anlage stellt derzeit die zweitgrößte Anlage dieser Art dar, mit deren Hilfe 5 l Rohextrakt innerhalb eines Aufreinigungszykluses bearbeitet werden können.

Sowohl die Rückführung der Magnetpartikel aus der Anlage in die Vorlage während des Programm- Moduls HP\_3, als auch die Abscheidung der Partikel an der Separationsmatrix, stellen die Problempunkte der hier zur Anwendung kommenden HGMF- Anlage dar. Beispielsweise konnte die Rückführung der Magnetpartikel bei der am Forschungszentrum Karlsruhe stehenden kleineren HGMF- Anlage mit einem Separationsvolumen von 0,3 l (Ebner 2006) durch die Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit innerhalb des geschlossenen Kreislaufsystems oder durch eine Übertragung von Druckluftvibrationen auf die Separationskassette eliminiert werden. Diese Maßnahmen haben allerdings bei der vorliegenden größeren HGMF-Anlage (Separationsvolumen 5-6 l) nicht ausgereicht, um eine vollständige Rückführung der Partikel zu gewährleisten. Dies bedeutet, dass eine Neukonzipierung des Gesamtverfahrens zur Abscheidung der Magnetpartikel vorgenommen werden

muss. Im Unterschied zu den so genannten Kugelseparatoren, mit denen am Forschungszentrum Karlsruhe bereits gearbeitet wird, ist in dieser Arbeit ein anderes Konzept in Betracht gezogen worden. In diesem Fall wird die Separationskassette innerhalb der HGMF- Anlage durch ein Gefäß ersetzt, in dem die Magnetpartikel während des gesamten Aufreinigungsprozesses verbleiben. Bei diesem alternativen Verfahren können wie in der ursprünglich eingesetzten HGMF-Anlage Partikelmengen von 100 g und mehr für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen eingesetzt werden.

Erste Versuche mit diesem alternativen Verfahren sind mit dem Modellprotein GFP-His<sub>6</sub> durchgeführt worden. Mit der einfachen Batch- Verfahrensweise können ca. 2,2 g des Modellproteins mit 50 g Partikeln innerhalb eines Zyklus aufgereinigt werden, wobei die Ausbeute bei 30 % lag. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Batch-Verfahrensweise in Hinblick auf mehrere hintereinander ablaufende Aufreinigungszyklen eine Verbesserung des Verfahrens bewirkt. Die Probleme bei der Partikelrückführung, sowie das Problem, dass Partikel aus der Anlage ausgetragen werden, können eliminiert werden. Dies führt zu einer gleich bleibenden Menge des Adsorbens und somit zu einer gleich bleibenden Ausbeute im Verlauf von mehreren nacheinander durchgeführten Aufreinigungszyklen. Vergleicht man die Ergebnisse von Ebner (Ebner 2006), die in der ursprünglich konzipierten HGMF- Anlage erhalten wurden mit denen der Batch- Verfahrensweise, so stellt man fest, dass sich diese Verfahren hinsichtlich der aufgereinigten Proteinmenge im ersten Zyklus nicht wesentlich unterscheiden. Da innerhalb des Batch Verfahrens zu Beginn mit einer höheren Produktkonzentration im Rohextrakt gearbeitet wurde, liegt die Ausbeute unterhalb der bei Ebner (Ebner 2006) erreichten Ausbeute von 66 %. Die Vorteile der Batch- Verfahrensweise zeigen sich daher erst im Verlauf von mehreren Zyklen, wenn im Rahmen der ursprünglichen HGMF- Anlage ein Partikelverlust eintritt. Es ist allerdings auch darauf hinzuweisen, dass die Separationskapazität der Filterkassette im Verlauf vieler Aufreinigungen gesunken ist. Das heißt zu dem Zeitpunkt als die Batch-Verfahrensweise untersucht wurde, wurden mit der ursprünglich konzipierten HGMF- Anlage mit der selben Magnetpartikelcharge und dem gleichen Modellprotein deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt als es noch in der Arbeit von Ebner der Fall war. Ein direkter Vergleich zwischen einer Aufreinigung von GFP in der ursprünglich konzipierten HGMF-Anlage und der Batch Aufreinigung zeigt, dass durch die Anwendung des Batch-Verfahrens eine Verringerung der benötigten Pufferlösungsmengen möglich ist, was die Ökonomie des Prozesses nennenswert verbessert. Da sich der Zeitaufwand für die Proteinaufreinigung beim Einsatz der neu

konzipierten Batch-Anlage unwesentlich ändert, die Produktausbeute sich aber im Verlauf mehrerer Zyklen erhöht, führt dieser Verfahrenswechsel zu einer Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute. Für die vollständige Automatisierung des Prozesses müssen allerdings weitere Versuche durchgeführt werden.

Diese ersten Versuche zeigen daher, dass die Batch-Verfahrensweise eine Alternative zu dem bislang verfolgten Durchflussprinzip der HGMF-Anlage darstellt.

Tabelle 5-5: **Vergleich zweier auf der Magnettrenntechnik basierenden Aufreinigungsverfahren am Beispiel der Aufreinigung des Modellproteins GFP-His<sub>6</sub>.** Vergleichend sind die Ergebnisse von Ebner (Ebner 2006) und die Ergebnisse des Batch-Verfahrens dargestellt.

		HGMF Anlage	Batch-Verfahren
$V_o$	(l)	2,25	2,0
$c_o$ GFP-His <sub>6</sub>	(g l <sup>-1</sup> )	2,54	3,73
$m_P$	(g)	48,6	50,0
$q_{max}$	(mg g <sup>-1</sup> )	92,0	92,0
$K_d$	(g l <sup>-1</sup> )	0,047	0,047
$c^*$	(g l <sup>-1</sup> )	0,86	2,61
$q^*$	(mg g <sup>-1</sup> )	87,0	90,4
Aufgereinigtes GFP-His <sub>6</sub> (g)		1,68	2,2
Ausbeute (%)		66,0	30,0
$\Sigma$ benötigten Puffer (l)		37,0	19,0

Aufgrund der vorliegenden Langmuir- Parameter von GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> sind gegenüber dem Modellprotein GFP-His<sub>6</sub> auch bei der Batch Aufreinigung niedrigere Produktmengen innerhalb eines Aufreinigungszyklus zu erwarten. Grund dafür ist die deutlich geringere maximale Sorptionskapazität von  $q_{max} = 36 \text{ mg g}^{-1}$  der Partikel für GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> und die daraus resultierende höhere Dissoziationskonstante  $K_d$ . Dennoch stellt die Batch- Verfahrensweise, aus den oben genannten Gründen eine gute Alternative für die Aufreinigung von GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> dar.

### 5.3.3. Konditionierung des rekombinanten Proteins

Die Aufreinigung über die Magnettrenntechnik hat gezeigt, dass das aufgereinigte Protein in verdünnter Form vorliegt und in hohem Maße mit Kupferionen verunreinigt ist, die sich während der Elution von der Oberfläche der Magnetpartikel lösen. Darüber hinaus wird für den späteren Einsatz des Biokatalysators in einem Festbettreaktor das Enzym auf einer Matrix immobilisiert. Bezüglich dieser Immobilisierung sind weitere Faktoren zu berücksichtigen, so dass nach der Aufreinigung zweckmä-

ßiger Weise eine Konditionierung des Biokatalysators vorgenommen werden sollte. Diese Konditionierung erfolgt in einem Cross-Flow Verfahren über eine Filtrationseinheit der Firma Amersham Bioscience, die am Ende der Aufreinigungsanlage integriert ist (Abbildung 5-12). Die Filtrationseinheit ist aus zwei Kwick Lab Ultrafiltrationsmembranen (UFELA 0010 010 ST 01, Amersham Bioscience) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa und einer Membranfläche von je 0,12 m<sup>2</sup> aufgebaut, so dass das Fusionsprotein aus GFP und DhaA<sup>CYYF</sup>, welches eine Größe von 60 kDa aufweist, zurückgehalten wird. Über diesen am Ende des Aufreinigungsverfahrens stehenden Prozessschritt können drei Aspekte für die Konditionierung des Enzyms berücksichtigt werden.

- (1) eine Abreicherung der Cu<sup>2+</sup> Ionen,
- (2) eine Aufkonzentrierung des Produkts und
- (3) eine Umpufferung des Enzyms in ein für die Immobilisierung günstiges Puffersystem.

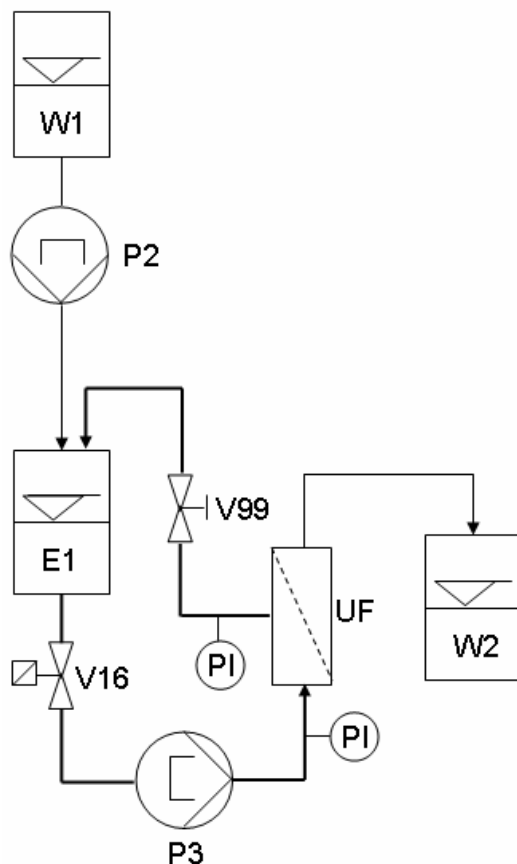


Abbildung 5-12: **Darstellung der in die Proteinaufreinigungsanlage integrierten Filtrationseinheit.** Die Proteinlösung wird, ausgehend von dem Vorlagengefäß (E1), mittels der Schlauchpumpe (P3) über zwei Ultrafiltrationsmembranen (UF) der Firma Amersham Bioscience (Kwick LabUFELA 0010 010 ST 01) geleitet. Das Permeat wird in den Abfallbehälter (W2) überführt und das Retentat in den Vorlagenbehälter zurückgeführt. Für die Umpufferung des Proteins wird aus dem Vorlagengefäß W1 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 in die Anlage gepumpt. Vor und nach der Filtrationseinheit sind Manometer (PI) installiert. Eine manuelle Einstellung der Filtrationsrate erfolgt über das Ventil V99.

Die Eluatfraktionen jedes einzelnen Aufreinigungszyklus mit einem jeweiligen Gesamtvolumen von 4,2 l werden über die Filtrationseinheit auf ein Volumen von 2,2 l reduziert. Anschließend erfolgt die Umpufferung der Proteinlösung, wobei der Eluti-



onspuffer durch einen 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 ersetzt wird. Der Fitrationsdruck im Zustrom und der Retentionsdruck betragen während des Prozesses 1,4 bar bzw. 0,6 bar. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 5-6 zusammengestellt.

Tabelle 5-6: **Ergebnisse zur Aufkonzentrierung und Umpufferung der GFP-DhaA<sup>CYYF</sup>-Proteinlösung.** Der Prozess wurde als Cross-Flow Verfahren mit zwei Ultrafiltrationsmebranen durchgeführt und ist an die HGMF-Proteinaufreinigungsanlage angeschlossen. Die aus den vier Aufreinigungszyklen stammenden Proteinlösungen werden einzeln aufkonzentriert und umpuffert.

		Fraktionen			Reinheit (%)
		Eluat	Konzentrat	Endprodukt	
Zyklus 1	GFP-DhaA <sup>CYYF</sup> (g)	1,0	1,0	1,1	88
Zyklus 2	GFP-DhaA <sup>CYYF</sup> (g)	0,6	0,65	0,8	78
Zyklus 3	GFP-DhaA <sup>CYYF</sup> (g)	0,9	0,85	0,9	73
Zyklus 4	GFP-DhaA <sup>CYYF</sup> (g)	0,5	0,54	0,6	80

Während der durchgeführten Ultrafiltration tritt im Rahmen der Messgenauigkeit kein Proteinverlust auf. Allerdings hat sich im Verlauf von weiteren Filtrationen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, gezeigt, dass während der Filtration ein Proteinverlust zwischen 0,5 und 15 % auftreten kann. Dies ist auf eine Denaturierung des Proteins während der Filtration zurückzuführen, die trotz einer Kühlung des Vorlagengefäßes eintritt. Eine zweite Ursache für den Proteinverlust ist in der Adsorption des Proteins an der Filtrationsmembran zu sehen. Diese Proteinadsorption ist reversibel und kann durch mehrmaliges Spülen der Membran am Ende des Prozesses aufgehoben werden.

Durchschnittlich liegt der Zeitbedarf für die Filtration bei etwa 8 min pro Liter des aus der Aufreinigung stammenden eingesetzten Eluats. Für die Aufkonzentrierung des Eluats von 4,2 l auf 2,2 l und die anschließende Umpufferung gegen 8 l des für die Immobilisierung vorgesehenen Puffers, sind somit ca. 80 min erforderlich. Dies ent-

spricht in etwa der Zeit, die für einen Aufreinigungszyklus benötigt wird, so dass es möglich ist, die Proteinaufreinigung und die Filtration simultan zu betreiben.

Die Eluatfraktionen der Proteinaufreinigung weisen eine intensive Blaufärbung auf, welche auf das sich von den Partikeln ablösende Kupfer zurückzuführen ist. Über  $\text{Cu}^{2+}$  Bestimmungen, die am Forschungszentrum Karlsruhe durchgeführt wurden, konnten die über die Ultrafiltration gewünschte Abreicherung der  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen quantifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass nach der Filtration in dem Endprodukt eine Kupferkonzentration, abhängig von der anfänglich enthaltenen Menge an Kupferionen ( $c_{\text{Cu}^{2+}}^{\text{a}} = 40 - 50 \text{ mg l}^{-1}$ ), zwischen 4 und 15  $\text{mg l}^{-1}$  vorliegt. Diese drei bis zehnfach verringerte Konzentration an Kupferionen wirkt sich hinsichtlich der Immobilisierung des Enzyms nicht mehr störend aus.

#### **5.4. Fazit aus den Ergebnissen des Produktions- und Downstream-Prozesses**

Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit kann in der Bereitstellung der verschiedenen Haloalkan Dehalogenasen für die Umsetzung von 1,2,3-Trichlorpropan (TCP) in einem Festbettreaktor gesehen werden. Der Festbettreaktor ist in eine „Miniplant“ implementiert, die im Rahmen der Dissertation von Samorski (Samorski 2006) entworfen, gebaut und charakterisiert wurde. Limitierend bei der Umsetzung des TCP zu 2,3-Dichlor-1-propanol (DCH) erweisen sich die  $k_{\text{cat}}$ -Werte der Haloalkan Dehalogenasen. Bedingt durch die geringen Umsatzraten der Enzyme muss in einem Festbettreaktor eine relativ große Menge des Biokatalysators in immobilisierter Form vorgelegt werden. Deshalb wurde der Fermentationsprozess und vor allem die nachfolgende Aufreinigung des Enzyms darauf ausgelegt, zwischen 5 und 10 g des Biokatalysators mit einem Reinheitsgrad  $>80 \%$  für die Immobilisierung bereitzustellen. Diese Menge an immobilisiertem Biokatalysator entspricht einer kompletten Füllung des in der „Miniplant“ eingesetzten Festbettreaktors.

Die fermentative Herstellung der Haloalkan Dehalogenasen  $\text{DhaA}^{\text{CYYF}}$  und DSD4 erfolgte über eine Hochzelldichte-Fermentation mit exponentieller Zufütterungsrate über einen Zeitraum von 36 Stunden. Dieses Verfahren wurde bereits für den eingesetzten *E. coli* Stamm BW3110, verbunden mit einem Rhamnose induzierbaren Expressionssystem, zur Herstellung einer L-N-Carbamoylase von Wilms (Wilms et al. 2001) beschrieben. Bei diesem Verfahren wurden Zelldichten von  $>100 \text{ g Biotrockenmasse (BTM) pro Liter}$  erreicht, wobei 3,8  $\text{g l}^{-1}$  des Enzyms synthetisiert wurden. Im Fall der Haloalkan Dehalogenase  $\text{DhaA}^{\text{CYYF}}$  konnte über eine Verzögerung

der Induktorzugabe die Produktkonzentration verdoppelt werden. Hierbei wurde der Induktion 5 h nach Beginn der Fed-Batch Phase zugesetzt. Bei der in Abschnitt 5.2 gezeigten Hochzelldichte-Fermentation zur Produktion von GFP-DhaA<sup>CYYF</sup> wurden Produktkonzentrationen von  $c_P = 10 \text{ g l}^{-1}$  erreicht. Zu beachten ist hierbei, dass es sich um ein Fusionsprotein handelt. Bei etwa gleicher Größe der beiden Proteine (GFP = 29 kDa; DhaA<sup>CYYF</sup> = 32 kDa) entfällt lediglich die Hälfte des Produkts auf den Biokatalysator. Die Fusion der Haloalkan Dehalogenase mit GFP diene lediglich einer vereinfachten Validierung des Fermentations- und Downstream- Prozesses. Die nachfolgenden Fermentationen für die Herstellung der Haloalkan Dehalogenase DSD4 wurden ohne Fusion mit dem Fluoreszenzmarker durchgeführt.

Der Downstream Prozess des Biokatalysators wurde über die HGMF-Technik realisiert. Diese Technik eröffnet die Möglichkeit Verfahrensschritte der zweiten und dritten Aufreinigungsphase in die erste zu integrieren, und so die Gesamtkosten des Downstream-Prozesses zu senken.

Das Grundprinzip der angewandten HGMF-Technik beruht auf einer Affinitätsadsorption des rekombinanten Proteins an das magnetisierbare Trägermaterial über einen Histidin- Tag. Aus der Literatur sind weitere magnetische Sorbentien bekannt, bei denen die Kopplung der aufzureinigenden Proteine über Protein A (Holschuh 2005) oder über SO<sub>3</sub>-Gruppen (Meyer 2004) vorgenommen wird. Zudem gibt es von einer Reihe von Herstellern nicht- funktionalisierte sowie funktionalisierte Magnetpartikel von unterschiedlicher Größe, Porosität und Remanenz zu kaufen (Chemagen Biopolymer Technologie AG, Miltenyi Biotec, u.a.). Die Proteinaufreinigung mittels Magnettrenntechnik ist heute noch vorwiegend auf Anwendungen im Labormaßstab beschränkt. Die Isolierung von Proteinen (Abudiab and Beitle 1998; Schuster et al. 2000; Hubbuch and Thomas 2002) und DNA (Oster et al. 2001) oder die Anwendung in der medizinischen Diagnostik (Olsvik et al. 1994; Lea et al. 2004) stellen einige interessante Beispiele dar.

Die im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit dem Forschungszentrum Karlsruhe konzipierte Aufreinigungsanlage, stellt derzeit die zweitgrößte Proteinaufreinigungsanlage auf Basis der HGMF-Technik dar. Erst vor kurzem wurde eine Proteinaufreinigungsanlage auf Grundlage der HGMF-Technik in der Literatur vorgestellt, mit der 100 l Rohextrakt zur Aufreinigung von ProteinA bearbeitet werden können (Holschuh 2005). Weitere aus der Literatur bekannte Aufreinigungsanlagen bewegen sich in Maßstäben von 100 ml (Heeboll-Nielsen 2002) bis hin zu 2 l (Meyer 2004).

Maßstabsvergrößerungen der Separationsmatrix, welche das Kernstück der in Abschnitt 5.3.2.2 beschriebenen Anlage bildet, wurden auf Basis einer am Forschungszentrum Karlsruhe in Anwendung befindlichen Separationskassette durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit konnte die Aufreinigung von nennenswerten Mengen der Haloalkan Dehalogenase in mehreren aufeinander folgenden Aufreinigungszyklen durchgeführt werden. Allerdings weist die vollautomatisierte Proteinaufreinigungsanlage im Betrieb einige verfahrenstechnische Probleme auf, was die Proteinaufreinigung im Gramm-Maßstab zunächst einschränkt. Grund hierfür sind die beim „Scale-up“ bedingten Veränderungen der Strömungsverhältnisse innerhalb der Separationskassette. Diese verursachen erhebliche Probleme bei der Partikelseparation und der Partikelrückgewinnung. Anstelle der ursprünglich angestrebten 5 bis 10 Gramm des Biokatalysators konnten lediglich 3,0 g in vier Aufreinigungszyklen isoliert werden. Die Ausbeuten fallen in dem realisierten Prozess, auf Grund der gewählten Prozessstrategie, mit 5 % gering aus. Die Proteinausbeute lässt sich allerdings durch Wiederverwendung der Sorptionsüberstände, durch Änderung der Prozessparameter (z.B.  $c_0$  oder  $m_p$ ) oder durch eine Änderung des Prozessablaufs merklich erhöhen. Der Zeitbedarf für den gesamten Downstream-Prozess liegt für einen Aufreinigungszyklus bei 4 Stunden. Da der Zellaufschluss einmalig durchgeführt wird verringert sich der Zeitaufwand für jeden nachfolgenden Zyklus um eine Stunde. Zudem kann die Ultrafiltration des aus dem ersten Aufreinigungszyklus stammenden Eluats parallel zu dem zweiten Aufreinigungszyklus in der HGMF-Anlage erfolgen. Insgesamt ist daher mit der ursprünglich konzipierten Aufreinigungsanlage ein Zeitbedarf von 8,5 h für die Aufreinigung von 3,0 g des rekombinanten Proteins zu rechnen, was einer Produkt-Zeit Ausbeute von 0,35 g Protein pro Stunde entspricht.

Tabelle 5-7: **Zusammensetzung des Zeitbedarfs für einen Aufreinigungszyklus in der vollautomatisierten HGMF-Anlage.** Aufgezeigt ist der Zeitbedarf für die Fermentation und den Downstream Prozess. Die Ultrafiltration kann parallel zum nachfolgenden Aufreinigungszyklus verlaufen.

Zeitbedarf	1 Aufreinigungszyklus
Hochzelldichte- Fermentation	36,0 h
Zellaufschluss (Kugelmühle)	1,0 h
HGMF- Aufreinigung	1,5 h
Ultrafiltration	1,5 h
$\Sigma$ (Zeitbedarf für einen Aufreinigungszyklus)	4,0 h

Auf Grund der erwähnten Probleme bei dem Betrieb der HGMF-Anlage wurde eine Maßstabsvergrößerung auf Grundlage der HGMF-Technik durchgeführt, bei dem die Magnetpartikel während des Aufreinigungsprozesses in einem Gefäß verbleiben. Versuche zeigen, dass über diese einfache Batch-Verfahrensweise 2,2 g des Modellprotein GFP-His<sub>6</sub> mit 50 g Partikeln innerhalb eines Zykluses aufgereinigt werden können. Die Ausbeute innerhalb dieses Prozesses lag bei 30 %. Die Sorptionskapazität der Partikel lag mit  $q^* = 90,4 \text{ mg g}^{-1}$  nahe bei  $q_{max}$ . Nachfolgende Proteinaufreinigungen für die Haloalkan Dehaloagenase DSD4 wurden ausschließlich mit Hilfe dieser Batch-Verfahrensweise durchgeführt.

Direkt zu vergleichen mit dem HGMF-Verfahren ist die Expanded Bed Adsorption. Der Unterschied dieser Verfahren liegt vornehmlich in der Art des Trägermaterials, an das rekombinante Proteine via Affinitätstags binden können. Ein Vergleich zwischen der EBA- und HGMF- Technik zur Proteinaufreinigung wurde in einer Ökologie Studie der DECHEMA im Rahmen des Projekts „Einsatz der Magnetrenntechnologie bei der Biokatalyse und Bioproduktaufarbeitung“ angestellt. Grundlage hierfür war zum einen der von Amersham Biosciences veröffentlichte Kostenvergleich zwischen einem konventionellen Festbettverfahren und der EBA-Technik (Amersham-Biosciences 2001) und zum anderen die in aus der Arbeit von Ebner (Ebner 2006) mit dem HGMF-Verfahren gewonnenen Daten. Vor allem im Bereich der Investitions- und Betriebskosten schneidet hier die HGMF-Technik um ein Zwei- bzw. Vierfaches besser ab als das EBA-Verfahren. Es scheint daher lohnend, die in der Arbeit aufgezeigten technischen Probleme der vorgestellten HGMF- Anlage durch alternative Verfahren zu lösen. Hierbei können unter Anderem unterschiedliche Prinzipien zur Partikelrückhaltung, wie z.B. Kugelseparatoren zum tragen kommen.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die weiße Biotechnologie befasst sich mit der Verfahrensentwicklung zur Herstellung neuer Produkte sowie mit dem Ersatz von klassisch-chemischen Produktionsverfahren durch die Biokatalyse. Der im Rahmen dieser Arbeit betrachtete Prozess zur Herstellung von Epichlorhydrin (ECH) (siehe Abbildung 1-2, Seite 1-5) geht mit einer Nebenproduktbildung von Trichlorpropan einher, welche die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses herabsetzt (Gray et al. 2003). Die chemische Synthese von Epichlorhydrin ausgehend von Propylen erfolgt über einen Hauptsyntheseweg, der über die Bildung von Dichlorpropanol verläuft. Als Nebenprodukt entsteht bei diesem Prozess die prochirale Verbindung 1,2,3-Trichlorpropan (TCP). TCP ist toxisch und muss als Abfallprodukt teuer entsorgt werden. Eine Möglichkeit zur Vermeidung der Entsorgung von TCP kann in der Rückführung dieser Verbindung in den Hauptprozess gesehen werden. Hierfür muss TCP enzymatisch über eine Haloalkan Dehalogenase in 2,3-Dichlor-1-propanol (DCH) umgewandelt werden. Die biokatalytische Umsetzung des TCP ist allein in Hinblick auf die Rückführung bzw. auf die Abfallvermeidung nicht rentabel. Allerdings lässt sich über die biokatalytische Umsetzung des prochiralen TCP über Haloalkan Dehalogenasen chirales (R) oder (S)-DCH synthetisieren. Dieses kann wiederum auf chemischem Wege zu (R) oder (S)-ECH umgesetzt und zur Synthese von Feinchemikalien verwendet werden, was zu einer bedeutenden Wertsteigerung des zunächst als Abfallprodukt angesehenen TCPs führt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, unterschiedliche Haloalkan Dehalogenasen für die Umsetzung von TCP innerhalb einer „Miniplant“ in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu stellen. Mit eingeschlossen war hierbei sowohl die Expressionsoptimierung von Haloalkan Dehalogenasen im jeweiligen Wirtsorganismus, wie auch die Produktion und Aufreinigung des Biokatalysators im Gramm- Maßstab. Die zur Verfügung gestellten Haloalkan Dehalogenasen stammten von der Firma DOW Chemicals (San Diego, USA). Diese wurden im Hinblick auf ihre Enzym- Aktivität und DCH bezogene Enantioselektivität am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart modifiziert. Das Projekt ist durch eine simultane Vorgehensweise gekennzeichnet. So ist der gesamte Fermentations- und Downstream- Prozess mit einer Haloalkan Dehalogenase (DhaA bzw. DhaA<sup>CYYF</sup>) etabliert worden, die sich zwar durch einen geringen ee- Wert auszeichnet, aber problemlos in hohen Konzentrationen in *E. coli* synthetisiert werden kann. Gleichzeitig wurden für die hin-

sichtlich des ee- Wertes interessanteren Haloalkan Dehalogenasen (DSD4, DSD4<sup>H107V</sup> bzw. DSD49) Expressionsstudien durchgeführt und anschließend die aus der Fermentation und Aufreinigung von DhaA gewonnen Erkenntnisse auf diese Prozesse übertragen. Der Ausgangspunkt aller Haloalkan Dehalogenasen war die Expression dieser ausgehend von einem *rha*<sub>BAD</sub> - Promotor in dem Wirtsorganismus *E. coli* BW3110.

Die für die Haloalkan Dehalogenasen DSD4, DSD4<sup>H107V</sup> und DSD49 durchgeführten Expressionsstudien lassen sich in experimentelle (Abschnitt 4.2) und modellgestützte Ansätze (Abschnitt 4.3), die mit einer Änderung der Aminosäure- oder Nukleinsäuresequenz einhergehen, unterteilen. Hierbei wurde versucht, über die unterschiedlichen Ansätze neben dem vordergründigen Ziel der Expressionsoptimierung des aktiven Zielproteins, auch die Ursachen für die Bildung von „Inclusion bodies“ oder für die verminderte Produktkonzentration herauszuarbeiten.

Auf experimenteller Ebene wurde vor allem durch den Einsatz eines *E. coli* B Stamms an Stelle des ursprünglichen *E. coli* K12 Derivats, gekoppelt an eine Verminderung der Kultivierungstemperatur, die Synthese der Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 signifikant verbessert (Abschnitt 4.2.3). Über deren Expression in *E. coli* BL21(*rha*<sup>-</sup>) konnte die Produktmenge um den Faktor zehn gesteigert werden. Trotz einer vermehrten Bildung von Einschlusskörpern, führte dies dennoch zu einer um den Faktor drei erhöhten Bildung an aktivem Enzym. Eine Ausnahme bildete die Punktmutante DSD4<sup>H107V</sup>, die ausgehend von DSD4 erstellt wurde. Die Proteinmenge dieses Enzyms ließ sich zwar auch wie bei den vorangegangenen Haloalkan Dehalogenasen, mit Hilfe des *E. coli* B Stamms signifikant steigern, jedoch ist es nicht möglich, ausreichende Mengen des löslichen Enzyms herzustellen, um eine Umsetzung des Substrats TCP nachweisen zu können. Der in Abschnitt 4.2.2 beschriebene Einsatz von chemischen Chaperonen führt dazu, dass die Löslichkeit der Punktmutante DSD4<sup>H107V</sup> von 5 % auf 80 % gesteigert wurde. Jedoch konnte aufgrund der geringen Menge des synthetisierten Proteins ein Nachweis der Enzymaktivität nicht erbracht werden. Zielführend im Fall von DSD4<sup>H107V</sup> war die in Abschnitt 4.2.4 beschriebene Fusion des Proteins mit dem Maltosebindeprotein (MBP). Im Vergleich zu dem Standardprotein MBP-GFP konnte die synthetisierte Gesamtproteinmenge von MBP-DSD4<sup>H107V</sup> gegenüber DSD4<sup>H107V</sup> von 55 % auf 95 % angehoben werden. Gleichzeitig erhöhte sich die Proteinlöslichkeit von 5 % auf 75 %. Allerdings ist auch in diesem Fall keine Umsetzung des 1,2,3-Trichlorpropan detektierbar. Die Fusion mit MBP kann sich hierbei konformati-

onsbedingt, störend auf die Aktivität des Enzyms auswirken. Demgegenüber konnte aber für das Fusionsprotein MBP-DSD4 ein Vollumsatz des Substrats in das Produkt 2,3-Dichlor-1-propanol detektiert werden.

Die im Abschnitt 4.2 beschriebenen Ergebnisse basieren auf experimentellen Ansätzen. Im Rahmen dieser Versuchsreihen konnten signifikante Verbesserungen der heterologen Proteinexpression für die Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD49 erzielt werden. Allerdings sind aus diesen Ansätzen heraus keine klaren Aussagen darüber zu treffen, welche Faktoren bei der Proteinfaltung von DSD4<sup>H107V</sup> im Einzelnen ausschlaggebend sind. Die Hypothese, dass eine zu hohe Produktkonzentration im Zytoplasma den alleinigen Grund für eine fehlerhafte Proteinfaltung darstellt, kann für die Haloalkan Dehalogenasen DSD4 und DSD4<sup>H107V</sup> als widerlegt gelten.

Im Abschnitt 4.3 wurde versucht, weitere Einflüsse auf die Proteinfaltung von DSD4, DSD4<sup>H107V</sup> und DSD49 ausfindig zu machen. Hierbei wurde in der Regel ein Vergleich zu der Haloalkan Dehalogenase DhaA gezogen, welche bereits zu Beginn der Arbeiten eine hohe Expression in dem Wirtsorganismus *E. coli* BW3110 zeigte. Im Vordergrund der Betrachtungen stand zunächst die „codon usage“ der unterschiedlichen Haloalkan Dehalogenasen in Bezug auf den Wirtsorganismus *E. coli*. Es zeigte sich, dass die CAI- Werte aller genutzten Dehalogenasen in hohem Maße von hoch exprimierten Proteinen in *E. coli* abweichen. Zudem besitzen DhaA, DSD4 sowie DSD49 in gleichem Maß eine Reihe seltener Codons. Eine Komplementierung von tRNAs seltener Codons hatte auf die Expression der Haloalkan Dehalogenasen jedoch keinen Effekt. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass die erheblich unterschiedlichen mRNA- Strukturen der Haloalkan Dehalogenasen DhaA, DSD4 und DSD49 sowohl Einfluss auf die Proteinexpression als auch auf die Modulation der Proteinfaltung nehmen.

Änderung innerhalb der Aminosäuresequenz wurden nach dem Modell von Wilkinson und Harrison, am Beispiel der Haloalkan Dehalogenase DSD4 durchgeführt. Die insgesamt 17 Modifikationen innerhalb der Aminosäuresequenz von DSD4<sup>syn1</sup> führten jedoch unerwartet zu einer Verschlechterung des Faltungsprozesses. Die Modifikationen wurden in Anlehnung an die Aminosäuresequenz von DhaA vollzogen, wobei der Anteil an geladenen und hydrophoben Aminosäuren in Loop- Regionen verändert wurde. Ein Eingriff in die Aminosäuresequenz ist nicht nur hinsichtlich einer Veränderung der Enzymaktivität, der Enantioselektivität oder der Substratspe-



zifität als kritisch zu betrachten, sondern auch in Bezug auf die Proteinfaltung. Das Modell von Wilkinson und Harrison wurde bis dato lediglich auf die Vorhersage der Löslichkeit von unmodifizierten Proteinen angewandt, d.h. auf Proteine eines Organismus, die nicht nachträglich einer gerichteten oder ungerichteten Mutagenese unterzogen wurden. Offenbar können die Ergebnisse dieses Modells nicht auf die synthetisch hergestellte und modifizierte Variante DSD4<sup>syn1</sup> übertragen werden.

Die ausgehend von der Haloalkan Dehalogenase DSD4 am Institut für Technische Biochemie erzeugte Punktmutante DSD4<sup>H107V</sup> lässt erkennen, dass bereits durch den Austausch einer einzigen Aminosäure der Anteil an löslichem Protein von 50 % auf 5 % herabgesetzt wird. Da es sich hier um einen Aminosäureaustausch handelt, können durchaus strukturelle Veränderungen während des Faltungsprozesses des Proteins erwartet werden. Histidin, das durch Valin an Position 107 innerhalb des katalytischen Zentrums ausgetauscht wurde, gehört auf Grund seiner biochemischen Eigenschaften einer anderen Gruppe von Aminosäuren an als Valin. Überraschenderweise löst indes auch der Austausch von Histidin gegen histidinähnliche Aminosäuren, wie Lysin oder Arginin Veränderungen während des Faltungsprozesses aus, die jeweils in einem inaktiven Protein münden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass auch die Nukleinsäuresequenz Einfluss auf die Proteinfaltung nimmt. Deshalb wurde desweiteren untersucht, ob über eine Änderung des Translationsprofils von DSD4 die Proteinfaltung beeinflusst werden kann (Abschnitt 4.3.3). Da es sich hierbei um einen Austausch von synonymen Codons handelt, wirken sich die in diesem Bereich durchgeführten Modifikationen ausschließlich auf der Nukleinsäureebene aus. Das Translationsprofil von DSD4 wird im Rahmen des Möglichen an das Profil von DhaA angepasst. Die dadurch stark beeinflusste mRNA-Struktur sowie das geänderte Translationsprofil nehmen dennoch weder in positiver noch negativer Hinsicht Einfluss auf den Faltungsprozess der Haloalkan Dehalogenase DSD4.

Im Abschnitt 4.3.4 wurde desweiteren gezeigt, dass sich nicht nur der Faltungsprozess von Proteinen sondern auch die im Zytoplasma befindliche Produktmenge über die Nukleinsäuresequenz manifestiert. Dies wurde über die Einführung der beiden synonymen Codons AAA und AAG der Aminosäure Lysin an Position 107 deutlich. Das erste dieser beiden Codons bewirkte, dass das neu synthetisierte Polypeptid nicht in Form von „Inclusion bodies“ ausfällt, sondern für Proteasen zugänglich ist und dadurch bedingt abgebaut wird. Dies drückte sich in einer geringeren

Produktkonzentration aus, und ging einher mit einer Inhibierung des Wachstums, verbunden mit einer Verminderung der Biomassenendkonzentration.

Der Faltungsprozess eines Proteins ist *in vivo* an unterschiedlichste Faktoren geknüpft. Die in Abschnitt 4.3 angestellten detaillierten Betrachtungen, zum einen von Aminosäuren an Position 107 der Haloalkan Dehalogenase DSD4, zum anderen von synonymen Codons, lässt den Schluss zu, dass der Faltungsprozess von Proteinen über eine Vielzahl von Faktoren moduliert wird. Hierbei sind neben der Aminosäuresequenz auch Faktoren auf der Ebene der Nukleinsäuresequenz zu berücksichtigen. Beispiele hierfür sind die mRNA- Sekundärstruktur, die Translationselongationsraten, die „codon usage“ bzw. die Wahl synonymer Triplets oder die Konzentration an vorhandener tRNA. Da viele der genannten Faktoren miteinander verknüpft sind, gelingt es offenbar in dem hier vorliegenden Fall nicht, nur durch die Betrachtung eines Einzelfaktors Einfluss auf den Faltungsprozess zu nehmen. Daraus folgt, dass es keine universelle Vorgehensweise gibt, um den Faltungsprozess während der heterologen Proteinsynthese in einer positiven Weise zu beeinflussen.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Herstellung von Haloalkan Dehalogenasen im halbertechnischen Maßstab für die Umsetzung von TCP, welche in einem Festbettreaktor durchgeführt werden sollte. Das Herstellungsverfahren umfasst sowohl den eigentlichen Produktionsprozess des Enzyms, wie auch die Aufreinigung des Biokatalysators aus dem Fermentationsrohextrakt, welche den kostentreibenden Faktor darstellt. Da es sich bei Haloalkan Dehalogenasen um technische Enzyme handelt, sollte ein möglichst kostengünstiger Weg zur Aufreinigung dieser Enzyme aufgezeigt werden. Dies ist durch die Einsparung von einzelnen Prozessschritten während des Downstream- Prozesses realisiert worden.

Die Produktion des Biokatalysators wurde über eine Hochzelldichte- Fermentation mit dem Wirtsorganismus *E. coli* über ein Rhamnose induzierbares Expressionssystem in Anlehnung an die Arbeiten von Wilms (Wilms et al. 2001) realisiert. Mit diesem im Abschnitt 5.2 beschriebenen Prozess gelang es, innerhalb eines Fermentationsdurchlaufs circa  $10 \text{ g l}^{-1}$  der Haloalkan Dehalogenase innerhalb eines Zeitraums von 36 h herzustellen.

Der zweite und kostenintensivere Schritt des Herstellungsverfahrens ist, wie oben bereits erwähnt, der so genannte Downstream- Prozess des Biokatalysators. Die ursprünglich aus der Mineralaufarbeitung bekannte ‚High Gradient Magnetic Field‘ (HGFMF)- Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um eine direkte Aufreinigung von Proteinen aus Zellrohextrakt durchzuführen. Diese Technik basiert auf

magnetischen Sorbentien, welche mit aus der Proteinaufreinigung bekannten Affinitätsliganden funktionalisiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden IDA funktionalisierte Magnetpartikel der Firma Chemagen Technologie AG (Baesweiler) eingesetzt, die für die Aufreinigung von „Histidin- getagten“ Proteinen geeignet sind. Über die HGMF- Technik lassen sich ähnlich wie bei der ‚Expanded Bed Adsorption‘ (EBA) Chromatographie- Schritte der ersten Aufreinigungsphase, wie beispielsweise die Biomassenabtrennung, die Zelltrümmerabtrennung oder erste Aufkonzentrierungsverfahren, vermeiden. Die Möglichkeit eine gleichzeitige Grob- und Feinreinigung von Proteinen direkt aus dem Zellrohextrakt durchzuführen, führt zu einer erheblichen Kostenersparnis im gesamten Aufreinigungsprozess. Die ursprünglich konzipierte Proteinaufreinigungsanlage, wie sie in Abbildung 5-10 des Abschnitts 5.3 gezeigt ist, wies während des Betriebs erhebliche Schwachstellen auf. Sowohl die Separation der Partikel an der Abscheidematrix, wie auch die anschließende Rückführung der Partikel aus der Separationskassette in die Vorlagebehälter, waren mit einem hohen Verlust an Partikeln behaftet. Bedingt durch diese Probleme konnten in der ursprünglichen Anlage mit 100 g Magnetpartikeln durchschnittlich nur 0,35 g des Biokatalysators pro Stunde aufgereinigt werden.

Aufgrund der problembehafteten Partikelseparation wurde der Kernbereich der Anlage, d.h. die Separationskassette durch ein einfaches Gefäß ersetzt, in dem die Abscheidung der Partikel in der Art eines Batch- Ansatzes erfolgte. Durch den Verbleib der Partikel in einem Separationsgefäß während des gesamten Aufreinigungsprozesses wird ein Partikelverlust vermieden. Diese Modifikation der ursprünglichen Aufreinigungsanlage ermöglicht, in den bisher durchgeführten Versuchen 2 g des Modellproteins GFP-His<sub>6</sub> mit der Hälfte der ursprünglich 100 g eingesetzten Magnetpartikeln innerhalb eines Aufreinigungszyklus zu isolieren. Zu beachten ist hier, dass die maximale Partikelkapazität  $q_{max}$  für GFP-His<sub>6</sub> doppelt so hoch ist wie für das Fusionsprotein GFP-DhaA. Positiv festzuhalten bleibt, dass über mehrere Zyklen hinweg das Batch- Verfahren, auf Grund des vermiedenen Partikelverlusts, eine Möglichkeit bietet die Proteinausbeute des Prozesses konstant zu halten.

Im Vordergrund von weiterführenden Arbeiten stehen vor allem zwei Entwicklungsalternativen für die Proteinaufreinigung mittels HGMF im technischen Maßstab. Eine dieser Möglichkeiten liegt in der Art der Prozessführung selbst begründet. Es muss sowohl die Entwicklung von verbesserten Separationsmatrices vorangetrieben als auch, alternativ dazu, die Weiterentwicklung und Automatisierung der erwähnten Batch- Aufreinigung gefördert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Weiterentwick-

lung der HGMF- Aufreinigungstechnik liegt auf dem Gebiet der magnetischen Sorbentien, die noch ein erhebliches Entwicklungspotential beinhalten. Im Verlauf der Arbeit wurden unterschiedliche Partikelchargen der Firma Chemagen Technologie AG untersucht. Die maximalen Sorptionskapazitäten  $q_{max}$  differierten hierbei um den Faktor zwei, so dass in weiterführenden Arbeiten ein besonderes Augenmerk auf den reproduzierbaren Herstellungsprozess der Magnetpartikel gelegt werden sollte.

## 7. Anhang

### 7.1. DNA-Sequenzen

- Nukleinsäuresequenz von *dsd4*

```

Start                                     dsd 4 →
1  atg agc gaa gaa gcg atc tcg gcc ctc gac ccg cat cca cgc aag aaa cag
   m  s  e  e  a  i  s  a  l  d  p  h  p  r  k  k  q
52  gaa ctg ctc ggc acc tcg atg tct tat gtc gat acc ggg act ggc gag ccg
   e  l  l  g  t  s  m  s  y  v  d  t  g  t  g  e  p
103 gtg gtg ttc ctg cac ggc aat cca acc tcc tcg tac ttg tgg cgg aac gtg
   v  v  f  l  h  g  n  p  t  s  s  y  l  w  r  n  v
154 att cca cat gtc gcg ccg gtc gcc agg tgc atc gct ccc gac ctg atc ggg
   i  p  h  v  a  p  v  a  r  c  i  a  p  d  l  i  g
205 atg gga gcg tca ggg cct tcc tct agc ggc aac tac acg ttc gcc gat cat
   m  g  a  s  g  p  s  s  s  g  n  y  t  f  a  d  h
256 gcg cga cat ctc gat gcg ctc ctc gac gcg att ttg cca aag ggc cag ctc
   a  r  h  l  d  a  l  l  d  a  i  l  p  k  g  q  l
307 agc ttg gtg gtg cac gac tgg gga tcg gcg ctg ggc ttc cac tgg gcc aat
   s  l  v  v  h  d  w  g  s  a  l  g  f  h  w  a  n
358 cgc aat ccg gat ccg gta agg gga atc gcc tac atg gaa gcg att gtg cga
   r  n  r  d  r  v  r  g  i  a  y  m  e  a  i  v  r
409 ccg gtg ctg tgg tcg gag tgg ccc gaa cgt gcc cga gac att ttc aag acg
   p  v  l  w  s  e  w  p  e  r  a  r  d  i  f  k  t
460 ctg cga act ccg gcc ggc gaa gag atg att ctc aaa aac aac gta ttc gtg
   l  r  t  p  a  g  e  e  m  i  l  k  n  n  v  f  v
511 gag ccg atc ctg ccc ggc agc gtc ttg cgc aaa ttg agc tcc gaa gaa atg
   e  r  i  l  p  g  s  v  l  r  k  l  s  s  e  e  m
562 gac aat tat cgc ccg ccc ttt cgc gac gca gga gaa tcg ccg ccg cca aca
   d  n  y  r  r  p  f  r  d  a  g  e  s  r  r  p  t
613 ctc acg tgg ccg cgt cag att ccg atc gag ggt gag ccg gcc gac gtg gtg
   l  t  w  p  r  q  i  p  i  e  g  e  p  a  d  v  v
664 gaa atc gtg cag aaa tat tcc gag tgg ctg gca cag agc gcg gtg ccc aaa
   e  i  v  q  k  y  s  e  w  l  a  q  s  a  v  p  k
715 ctg ctc gtg aat gcg gag ccg gga gcg att ttg ata ggc gcg cag cgc gag
   l  l  v  n  a  e  p  g  a  i  l  i  g  a  q  r  e
766 ttt tgt cac caa tgg ccg aat cag cgc gaa gtc acg gtc aag ggc gta cac
   f  c  h  q  w  p  n  q  r  e  v  t  v  k  g  v  h
817 ttc atc cag gaa gat tcc ccg cac gag atc ggg cga gcg atc gca gac tgg
   f  i  q  e  d  s  p  h  e  i  g  r  a  i  a  d  w
868 tac cga gga atc taa →
   y  r  g  i  -

```

Bei der Nukleinsäuresequenz von *dsd4*<sup>H107V</sup> befindet sich an Position 107 an Stelle von *cac* das Codon *gtg*.

Die in den Nukleinsäuresequenzen von *dsd4<sup>syn1</sup>* und *dsd4<sup>syn2</sup>* unterlegten Codons wurden im Zuge der Mutagenesen verändert.

- Nukleinsäuresequenz *dsd4<sup>syn1</sup>*

```

      Start                               dsd4syn1
1  cat atg agc gaa gaa gcg atc tcg gcc ctc gac ccg cat cca cgc aag aaa
   h m s e e a i s a l d p h p r k k
                                     Mut1
52  cag gaa ctg ctc ggc acc tcg atg tct tat gtc gat acc ggg gat ggc gag
   q e l l l g t s m s y v d t g d g e
                                     Mut2
103 ccg gtg gtg ttc ctg cac ggc aat cca acc tcc tcg tac ttg tgg cgg aac
   p v v f l h g n p t s s y l w r n
                                     Mut3-5
154 gtg att cca cat gtc gcg ccg gtc gcc agg tgc atc gct ccc gac ctg atc
   v i p h v a p v a r c i a p d l i
                                     Mut6-8
205 ggg atg gga gcg tca gac cct tcc tct gac ctc gat tac acg ttc gcc gat
   g m g a s d p s s d l d y t f a d
                                     Mut9
256 cat gcg cga cat ctc gat gcg ctc ctc gac gcg att ttg cca ttg gaa gag
   h a r h l d a l l d a i l p l e e
                                     Mut10-11
307 ctc agc ttg gtg gtg cac gac tgg gga tcg gcg ctg ggc ttc cac tgg gcc
   l s l v v h d w g s a l g f h w a
                                     Mut12
358 aat cgc aat ccg gat cgg gta agg gga atc gcc tac atg gaa gcg att gtg
   n r n p d r v r g i a y m e a i v
                                     Mut13
409 cct atc gtg ctg tgg gac gag tgg ccc gaa cgt gcc cga gac att ttc aag
   p i v l w d e w p e r a r d i f k
                                     Mut14
460 acg ctg cga act ccg gcc ggc gaa gag atg att ctc aaa cag aac gta ttc
   t l r t p a g e e m i l k q n v f
                                     Mut15 Mut16
511 gtg gag cgg atc ctg ccc ggc tgc gtc ttg cgc ccg ttg acg tcc gaa gaa
   v e r i l p g c v l r p l t s e e
                                     Mut17
562 atg gac aat tat cgc cgg ccc ttt ctc gac gca gga gaa tcg cgg cgg cca
   m d n y r r p f l d a g e s r r p
613 aca ctc acg tgg ccg cgt cag att ccg atc gag ggt gag ccg gcc gac gtg
   t l t w p r q i p i e g e p a d v
664 gtg gaa atc gtg cag aaa tat tcc gag tgg ctg gca cag agc gcg gtg ccc
   v e i v q k y s e w l a q s a v p
715 aaa ctg ctc gtg aat gcg gag ccg gga gcg att ttg ata ggc gcg cag cgc
   k l l v n a e p g a i l i g a q r
766 gag ttt tgt cac caa tgg ccg aat cag cgc gaa gtc acg gtc aag ggc gta
   e f c h q w p n q r e v t v k g v
817 cac ttc atc cag gaa gat tcc ccg cac gag atc ggg cga gcg atc gca gac
   h f i q e d s p h e i g r a i a d
                                     Stop
868 tgg tac cga gga atc taa
   w y r g i -

```

- Nukleinsäuresequenz *dsd4*<sup>syn2</sup>

```

Start                                     dsd4syn2 →
1  atg tca gaa gaa gcg atc agc gcg ctc gac ccc cat cca cgc aag aag caa
   m s e e a i s a l d p h p r k k q
52  gaa cta ctg ggc acc agc atg agc tac gtc gat act gga acc ggc gag cct
   e l l g t s m s y v d t g t g e p
103  gtg gtg ttc ctg cac ggt aac cgg acc tgg tcc tac ctg tgg cgc aac gtg
   v v f l h g n p t s s y l w r n v
154  atc cgg cat gta gca cgg gtg gcg cgg tgc att gct cca gac ctg atc ggg
   i p h v a p v a r c i a p d l i g
205  atg gga gcg tgg ggt cct agc tct agt ggt aac tat aca ttc gcg gac cac
   m g a s g p s s s g n y t f a d h
256  gct cgg cat ctc gat gcc ctc ctt gat gcc att ctt cca aaa ggc caa ctc
   a r h l d a l l d a i l p k g q l
307  tca ctg gtc gtg cac gac tgg ggc tca gct ctc gga ttc cac tgg gcc aat
   s l v v h d w g s a l g f h w a n
358  cgc aat cgc gat cgg gtc cgc ggt att gca tac atg gaa gcg atc gtg cgc
   r n r d r v r g i a y m e a i v r
409  ccg gtg ctc tgg agt gaa tgg cct gaa cgt gcc cgt gac atc ttc aaa act
   p v l w s e w p e r a r d i f k t
460  ctc cgg acc cca gct ggc gag gat atg atc ctt aaa aac aac gtc ttc gtg
   l r t p a g e e m i l k n n v f v
511  gag aga atc ctc cgg ggg agc gtc ctc cgt aaa ctt agt agt gag gag atg
   e r i l p g s v l r k l s s e e m
562  gac aat tat cgc cgg cca ttc aga gac gcg ggt gag tgg cga agg cca acc
   d n y r r p f r d a g e s r r p t
613  ctt act tgg ccc cgc caa atc ccc atc gag ggt gag ccc gcg gat gtg gtc
   l t w p r q i p i e g e p a d v v
664  gag atc gtc caa aag tac agc gaa tgg ctg gcg cag tca gcg gtc cgg aag
   e i v q k y s e w l a q s a v p k
715  ttg ttg gtg aac gcg gaa ccc ggc gct att ctt atc ggt gcc cag cga gaa
   l l v n a e p g a i l i g a q r e
766  ttt tgt cat cag tgg ccc aac cag agg gaa gtg acg gtg aaa gga gtg cac
   f c h q w p n q r e v t v k g v h
817  ttc atc cag gaa gac agc ccg cac gaa atc ggc agg gcg atc gcg gat tgg
   f i q e d s p h e i g r a i a d w
868  tac agg ggt atc taa
      v r q i -

```

- Nukleinsäuresequenz von *dsd49*

```

Start                                     dsd49 →
1  atg agc gag atc tcc ccg aaa gag ccc atg gac aag aag cac atc ccc gta
   m s e i s p k e p m d k k h i p v
52  ctc gga aaa tcg atg gcg tac cgg gac gta ggt gag gga gac ccg atc gtc
   l g k s m a y r d v g e g d p i v
103 ttc ctg cac ggc aac ccc acc tcg tcg tat ctc tgg cgc aac atc atc ccc
   f l h g n p t s s y l w r n i i p
154 cac ctc gag ccg cat gca cgc tgc atc gcg ccg gat ctc atc gga atg gga
   h l e p h a r c i a p d l i g m g
205 gat tcg gag aag ctc gag ccg agc gga ccg gac cgc tat cgc ttc atc gaa
   d s e k l e p s g p d r y r f i e
256 cat cgc gaa tat ctc gat ggt ttc ttc gag gct ctg gcc ctg caa cag aac
   h r e y l d g f f e a l a l q q n
307 gtc acc ctc gtc gtc cac gac tgg ggc tcc ggg ctg ggc ttc gat tgg gcc
   v t l v v h d w g s g l g f d w a
358 aac ccg aat ccg gag cgc atc aag ggg atc gct tat atg gag gcc atc gtt
   n r n r e r i k g i a y m e a i v
409 cgc ccg ctc agc tgg caa gac tgg ccc gac gac gcc cgc gcg gtc ttt cag
   r p l s w q d w p d d a r a v f q
460 ggt ttt cgc tcc gaa gca gga gag tcg atg gtg atc gag aag aac gtc ttc
   g f r s e a g e s m v i e k n v f
511 gtc gaa ccg gtc ctg ccc agc tcg gtc ctg ccg acg ctc cgt gac gag gag
   v e r v l p s s v l r t l r d e e
562 atg gag gtc tat cgc aga ccg ttt caa gac gcc gga gaa tca agg cgc ccg
   m e v y r r p f q d a g e s r r p
613 acc ctc acc tgg ccc cgc cag atc ccg atc gag ggg gag ccg gag gat gtg
   t l t w p r q i p i e g e p e d v
664 acc gag atc gcg agc gcg tac agc gcg tgg atg gcc gag aac gat ctc ccc
   t e i a s a y s a w m a e n d l p
715 aag ctc ttc gtt aac gcc gag ccg ggc gcg atc ctg atc ggt ccg cag cgc
   k l f v n a e p g a i l i g p q r
766 gag ttc tgc cgc acg tgg aag aat caa cgc gaa gtc acg gta agc ggt agc
   e f c r t w k n q r e v t v s g s
817 cac ttc atc cag gag gac tct ccg cac gaa atc ggc gac gcg att gca ggc
   h f i q d s p h e i g d a i a g
868 tgg tac gcg gat ctc
   w y a d l

```



- Nukleinsäuresequenz von *dhaA*

```

      Start                                     dhaA →
1  atg tca gaa atc ggt aca ggc ttt ccc ttc gac ccc cat tat gtg gaa gtc
   m  s  e  i  g  t  g  f  p  f  d  p  h  y  v  e  v
52  ctg ggc gag cgt atg cac tac gtc gat gtt gga ccg cgg gat ggc acg cct
   l  g  e  r  m  h  y  v  d  v  g  p  r  d  g  t  p
103  gtg ctg ttc ctg cac ggt aac ccg acc tcg tcc tac ctg tgg cgc aac atc
   v  l  f  l  h  g  n  p  t  s  s  y  l  w  r  n  i
154  atc ccg cat gta gca ccg agt cat cgg tgc att gct cca gac ctg atc ggg
   i  p  h  v  a  p  s  h  r  c  i  a  p  d  l  i  g
205  atg gga aaa tcg gac aaa cca gac ctc gat tat ttc ttc gac gac cac gtc
   m  g  k  s  d  k  p  d  l  d  y  f  f  d  d  h  v
256  cgc tac ctc gat gcc ttc atc gaa gcc ttg ggt ttg gaa gag gtc gtc ctg
   r  y  l  d  a  f  i  e  a  l  g  l  e  e  v  v  l
307  gtc atc cac gac tgg ggc tca gct ctc gga ttc cac tgg gcc aag cgc aat
   v  i  h  d  w  g  s  a  l  g  f  h  w  a  k  r  n
358  ccg gaa ccg gtc aaa ggt att gca tgt atg gaa ttc atc ccg cct atc ccg
   p  e  r  v  k  g  i  a  c  m  e  f  i  r  p  i  p
409  acg tgg gac gaa tgg ccg gaa ttc gcc cgt gag acc ttc cag gcc ttc ccg
   t  w  d  e  w  p  e  f  a  r  e  t  f  q  a  f  r
460  acc gcc gac gtc ggc cga gag ttg atc atc gat cag aac gct ttc atc gag
   t  a  d  v  g  r  e  l  i  i  d  q  n  a  f  i  e
511  ggt gtg ctc ccg aaa tgc gtc gtc cgt ccg ctt acg gag gtc gag atg gac
   g  v  l  p  k  c  v  v  r  p  l  t  e  v  e  m  d
562  cac tat cgc gag ccc ttc ctc aag cct gtt gac cga gag cca ctg tgg cga
   h  y  r  e  p  f  l  k  p  v  d  r  e  p  l  w  r
613  ttc ccc aac gag atc ccc atc gcc ggt gag ccc gcg aac atc gtc gcg ctc
   f  p  n  e  i  p  i  a  g  e  p  a  n  i  v  a  l
664  gtc gag gca tac atg aac tgg ctg cac cag tca cct gtc ccg aag ttg ttg
   v  e  a  y  m  n  w  l  h  q  s  p  v  p  k  l  l
715  ttc tgg ggc aca ccc ggc gta ctg atc ccc ccg gcc gaa gcc gcg aga ctt
   f  w  g  t  p  g  v  l  i  p  p  a  e  a  a  r  l
766  gcc gaa agc ctc ccc aac tgc aag aca gtg gac atc ggc ccg gga ttg cac
   a  e  s  l  p  n  c  k  t  v  d  i  g  p  g  l  h
817  tac ctc cag gaa gac aac ccg gac ctt atc ggc agt gag atc gcg cgc tgg
   y  l  q  e  d  n  p  d  l  i  g  s  e  i  a  r  w
868  ctc ccc gca ctc gag taa
      Stop →
      l  p  a  l  e  -

```

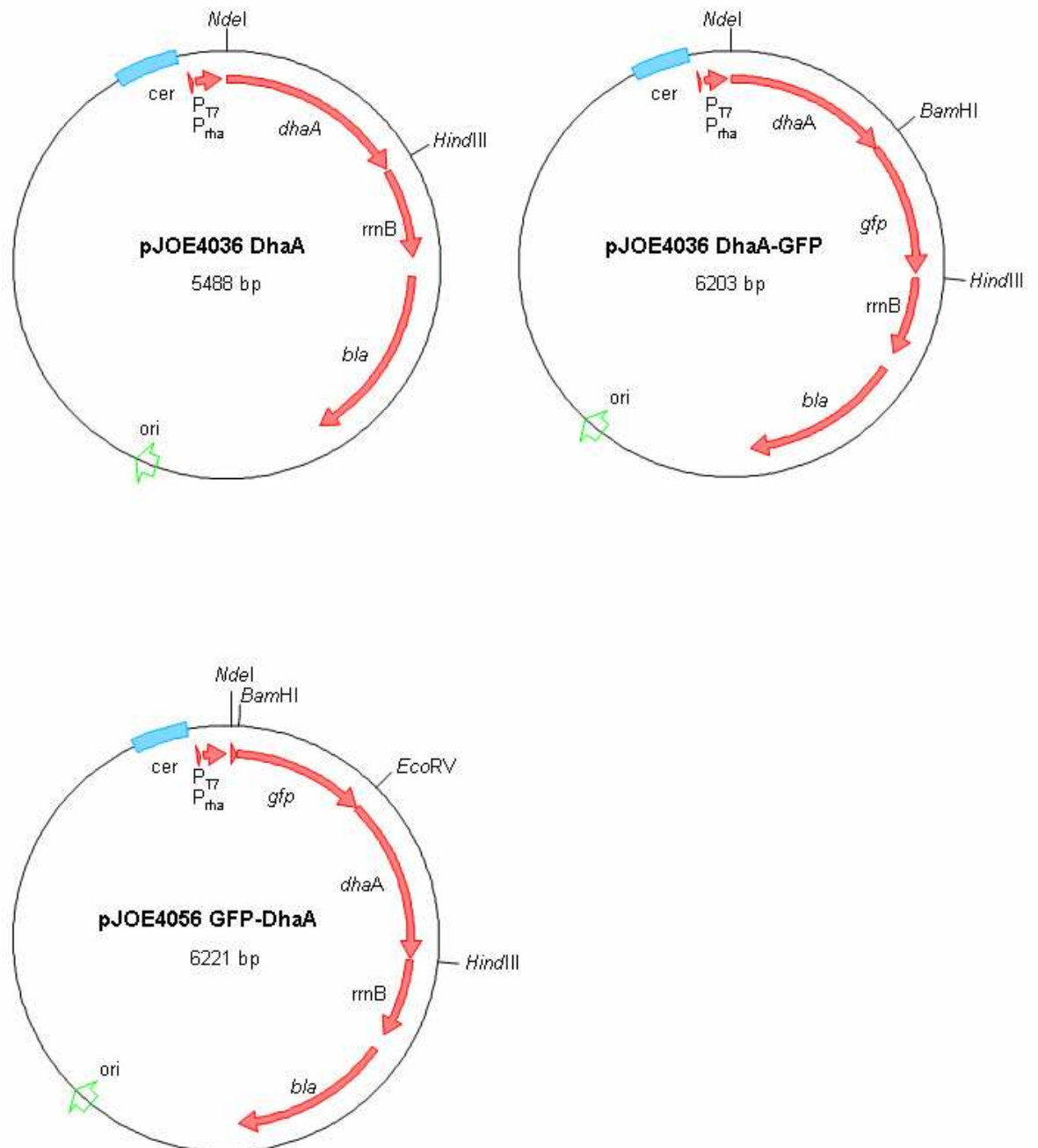
Im Fall der Variante *dhaA*<sup>CYYF</sup> sind die Codons *tgc* und *tac* an Position 176 bzw. 273 gegen die Triplets *tac* und *ttc* ausgetauscht.



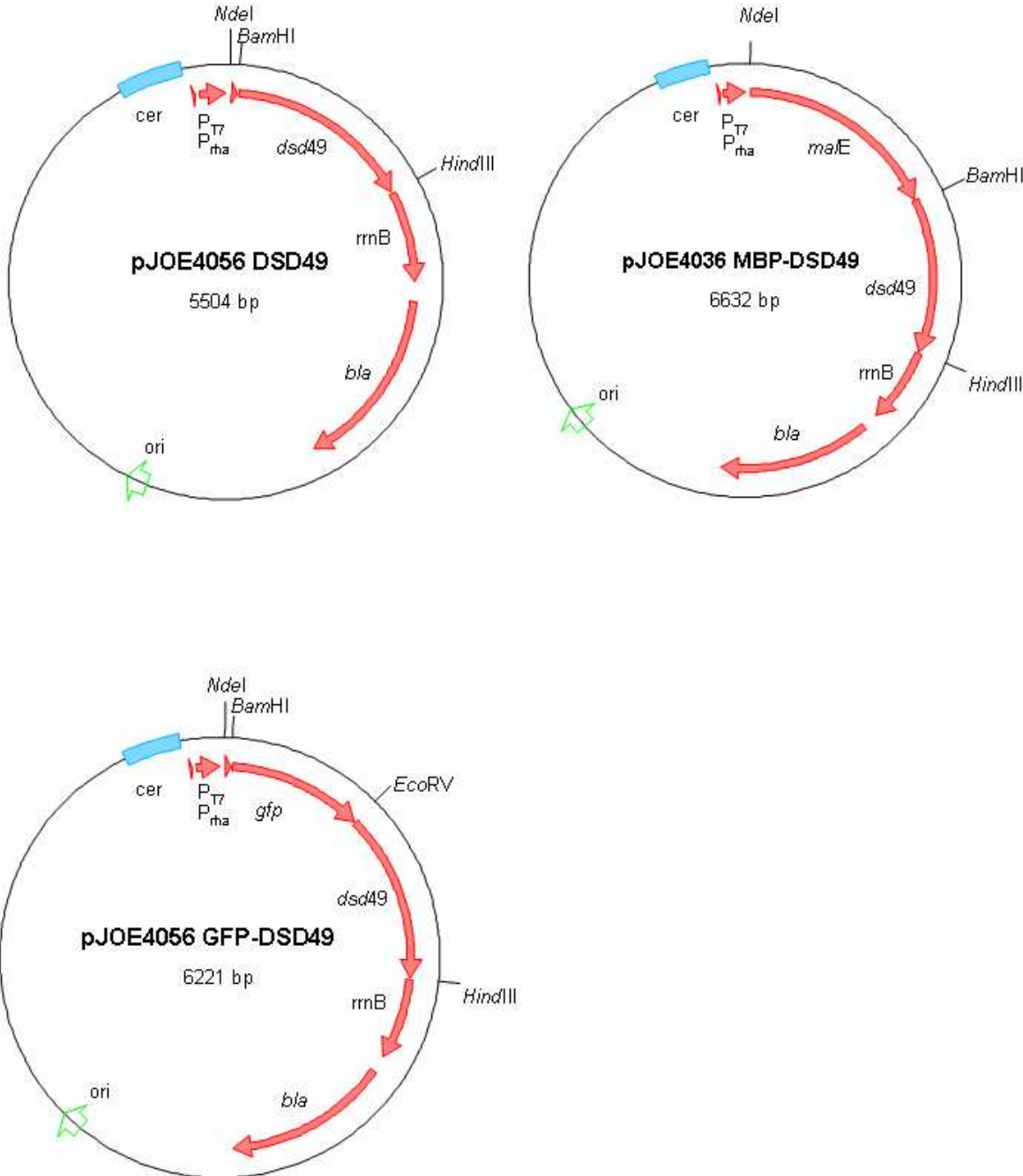
## 7.2. Plasmidkarten

Im Folgenden sind die aus dieser Arbeit hervorgehenden Plasmide in Form von Plasmidkarten aufgezeigt.

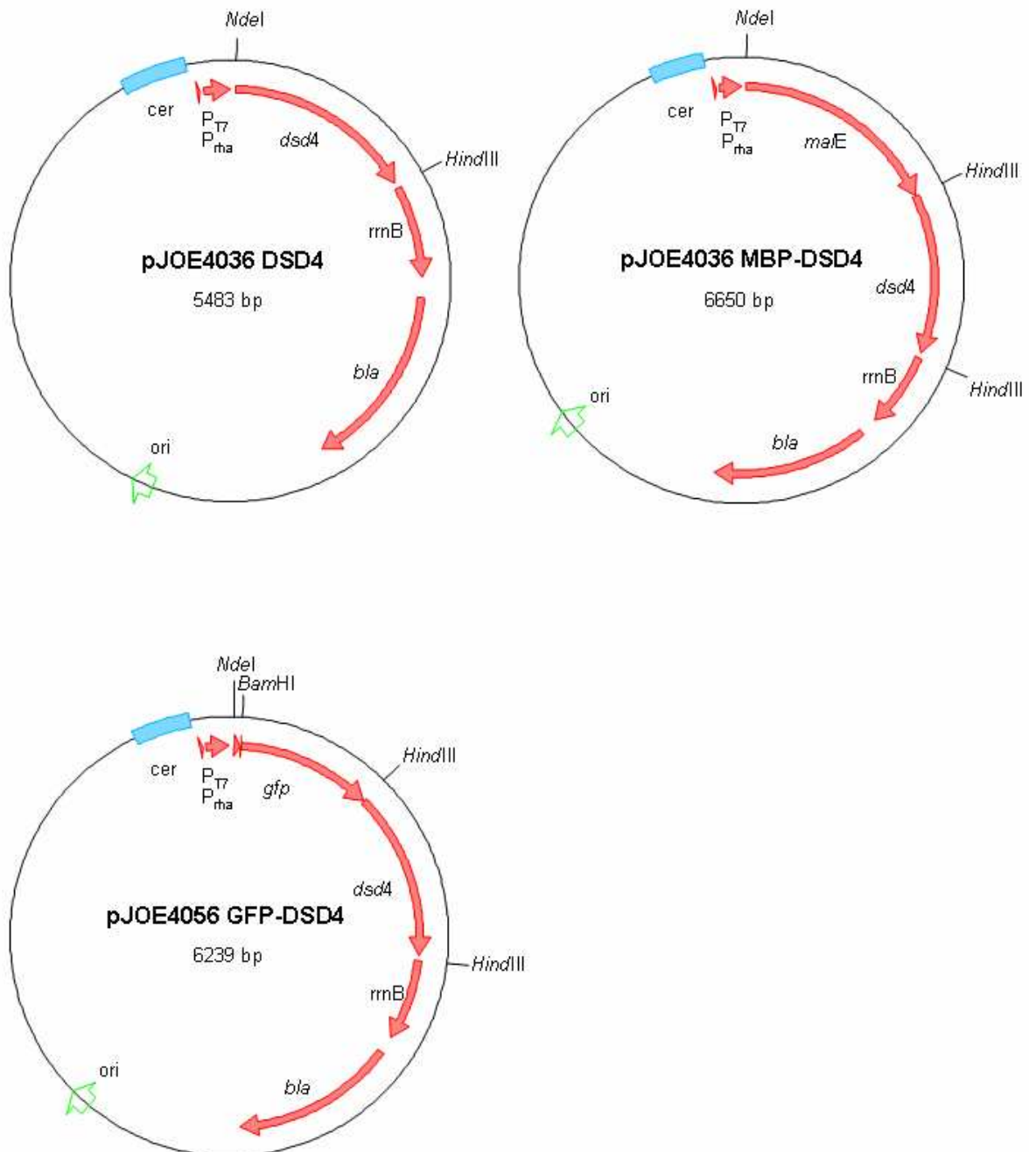
- Konstrukte mit der Haloalkan Dehalogenase DhaA



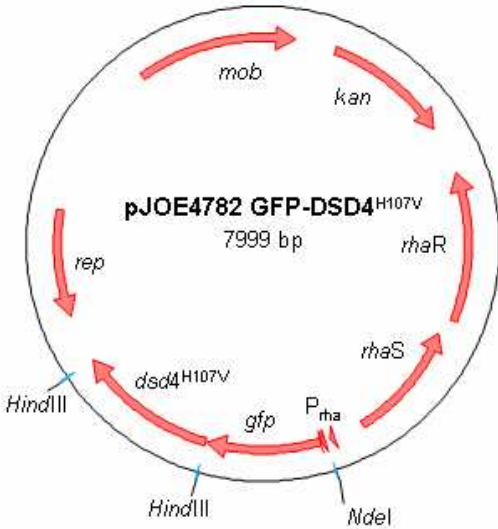
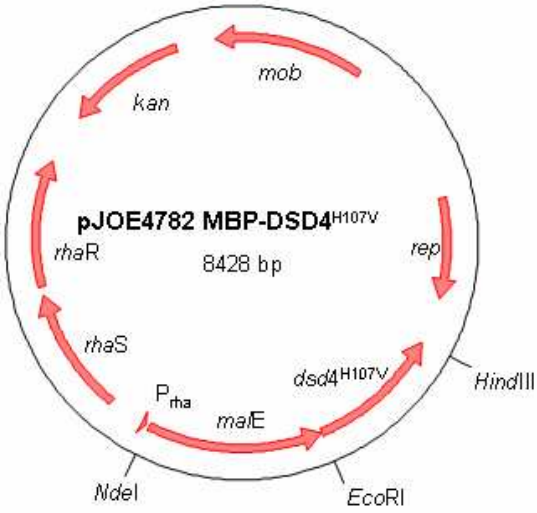
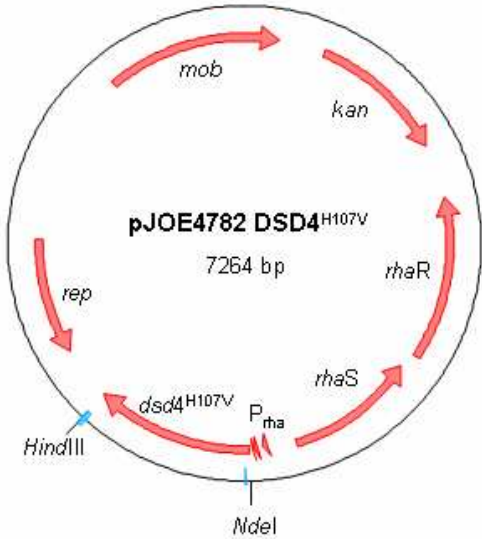
- Plasmide für die Expression der Haloalkan Dehalogenase DSD49



- Konstrukte für die Expression von DSD4



- Plasmide für die Expression von DSD4<sup>H107V</sup> in *E. coli* und *P. putida*



### 7.3. Abkürzungen

$(k_{TEL})_{eff}$	Codon spezifische Translationselongationsrate (AS s <sup>-1</sup> )
°C	Grad Celsius
$\mu$	spezifische Wachstumsrate (h <sup>-1</sup> )
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BTM	Biotrockenmasse (g)
CAI	Codon Adaption Index
$c_p$	Produktkonzentration (g l <sup>-1</sup> )
$c_0$	eingesetzte Proteinmenge (g l <sup>-1</sup> )
$c_s$	Substratkonzentration (g l <sup>-1</sup> )
$c^*$	verbleibende Proteinkonzentration im Rohextrakt (g l <sup>-1</sup> )
CV-CV'	Löslichkeitsindex (-)
$c_x$	Biomassekonzentration (g l <sup>-1</sup> )
DCH	2,3-Dichlor-1-propanol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECH	Epichlorhydrin
EDTA	Ethylendiamintetracetat
ee	Enantiomereüberschuss (%)
EtOH	Ethanol
$E_x$	Extinktion der Wellenlänge x nm
$f$	“folding index”
$F(t)$	Volumenstrom des Feeds (l h <sup>-1</sup> )
g	Gramm
GFP	Green Fluorescence Protein
GTP/CTP/UTP/ATP	Guanosin-/Cytosin-/Uracil-/Adenosin-5'-triphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>VE</sub>	vollentionisiertes Wasser
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton

l	.....Liter
LB	.....Luria Bertani Medium
M	.....Mol pro Liter
mg	.....Milligramm
min	.....Minute
ml	.....Milliliter
$m_p$	.....Partikelmenge
$M_R$	.....Remanenz ( $Am^2 kg^{-1}$ )
MW	.....Molekulargewicht
MWM	.....Molekular Weight Marker
Nal	.....Nalidixin
$n_j^{aa_i}$	.....Häufigkeit, mit der ein Codon innerhalb einer Aminosäure auftritt
$n_j^t$	.....Anteil eines einzelnen Codons innerhalb des Genoms von <i>E. coli</i>
OD <sub>500</sub>	.....optische Dichte bei 500 nm
$q^*$	.....Partikelkapazität (mg Protein g <sup>-1</sup> Partikel)
$q_{max}$	.....maximale Partikelkapazität (mg Protein g <sup>-1</sup> Partikel)
s	.....Sekunde
T	.....Temperatur (°C)
TCP	.....1,2,3-Trichlorpropan
$T_M$	.....Schmelztemperatur von Primern (°C)
Upm	.....Umdrehungen pro Minute
V	.....Volt bzw. Volumen
$Y_{Ads}$	.....Menge adsorbiertes Protein pro Gramm eingesetztem Protein



---

## 8. Literaturverzeichnis

- Abudiab, T. and R. R. Beitle, Jr. (1998). "Preparation of magnetic immobilized metal affinity separation media and its use in the isolation of proteins." J Chromatogr A **795**(2): 211-7.
- Adzhubei, A. A., I. A. Adzhubei, I. A. Krashennnikov and S. Neidle (1996). "Non-random usage of 'degenerate' codons is related to protein three-dimensional structure." FEBS Lett **399**(1-2): 78-82.
- Altenbuchner, J., T. Stumpp and B. Wilms (2000). "Ein neues L-Rhamnose induzierbares Expressionssystem für *E. coli*." Biospektrum **1/2000**: 33-36.
- Amann, E., J. Brosius and M. Ptashne (1983). "Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*." Gene **25**(2-3): 167-78.
- Amersham-Biosciences (2001). "Cost comparison: expanded bed adsorption (EBA) vs conventional recovery in the industrial scale processing of proteins." Amersham Biosciences Application Note **18-1150-21**: 1-6.
- Andersson, S. G. and C. G. Kurland (1990). "Codon preferences in free-living microorganisms." Microbiol Rev **54**(2): 198-210.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." Science **181**(96): 223-30.
- Anspach, F. B., D. Curbelo, R. Hartmann, G. Garke and W. D. Deckwer (1999). "Expanded-bed chromatography in primary protein purification." J Chromatogr A **865**(1-2): 129-44.
- Arnold, S. (2003). Kinetic Modelling of Gene Expression - from linear genome sequence to nonlinear cellular dynamics. Institut für Bioverfahrenstechnik. Stuttgart, Universität Stuttgart.
- Arnold, S., Siemann-Herzberg, M., Schmid, J., Reuss, M. (2005). "Model-based inference of gene expression dynamics from sequence information." Adv Biochem Eng Biotechnol **100**: 89-179.
- Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Ruckert, F. C. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey and K. N. Timmis (1981). "Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*." Gene **16**(1-3): 237-47.
- Baneyx, F. (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." Curr Opin Biotechnol **10**(5): 411-21.
- Baneyx, F. and M. Mujacic (2004). "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*." Nat Biotechnol **22**(11): 1399-408.
- Barth, S., M. Huhn, B. Matthey, A. Klimka, E. A. Galinski and A. Engert (2000). "Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions." Appl Environ Microbiol **66**(4): 1572-9.

- Bianchi, A. A. and F. Baneyx (1999). "Hyperosmotic shock induces the sigma32 and sigmaE stress regulons of *Escherichia coli*." Mol Microbiol **34**(5): 1029-38.
- Blackwell, J. R. and R. Horgan (1991). "A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form." FEBS Lett **295**(1-3): 10-2.
- Boschke, E., Steingroewer, J., Bley, T. (2005). "Einsatz der Biomagnetischen Separation zur mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Lebensmitteln." Chemie Ingenieur Technik **77**(7):912-19.
- Bosma (2002). "Biodegradation of 1,2,3-trichloropropane through directed evolution and heterologous expression of a haloalkane dehalogenase gene." Appl Environ Microbiol **68**(7): 3582-7.
- Bosma, T., M. G. Pikkemaat, J. Kingma, J. Dijk and D. B. Janssen (2003). "Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of halopropane conversion by a rhodococcus haloalkane dehalogenase." Biochemistry **42**(26): 8047-53.
- Bott, M., S. Buchholz, T. Daußmann, E. Flaschel, R. Gent, M. Karos, A. Liese, E. Renken, M. Reuss, A. Scriba, D. Sell, C. Syldatk, R. Takors, R. Ulber and H. Zinke (2004). "Weiße Biotechnologie: Chancen für Deutschland." Positionspapier der DECHEMA e.V.: 1-68.
- Bourot, S., O. Sire, A. Trautwetter, T. Touze, L. F. Wu, C. Blanco and T. Bernard (2000). "Glycine betaine-assisted protein folding in a lysA mutant of *Escherichia coli*." J Biol Chem **275**(2): 1050-6.
- Bowden, G. A., A. M. Paredes and G. Georgiou (1991). "Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*." Biotechnology (N Y) **9**(8): 725-30.
- Brixius, P., I. Mollerup, O. E. Jensen, M. Halfar, J. Thommes and M. R. Kula (2005). "Expanded bed adsorption as a primary recovery step for the isolation of the insulin precursor MI3 process development and scale up." Biotechnol Bioeng.
- Brodsky, L.I., Vasiliev A.V., Kalaidzidis Ya.L., OsipovYu.S., Tatuzov R.L., Feranchuk, S.I., Drachev V.A. (1992). "GeneBee: the program package for biopolymer structure analysis." Dimacs **8**: 127-139.
- Brunak, S. and J. Engelbrecht (1996). "Protein structure and the sequential structure of mRNA: alpha-helix and beta-sheet signals at the nucleotide level." Proteins **25**(2): 237-52.
- Caldas, T., N. Demont-Caulet, A. Ghazi and G. Richarme (1999). "Thermoprotection by glycine betaine and choline." Microbiology **145 ( Pt 9)**: 2543-8.
- Cereghino, J. L. and J. M. Cregg (2000). "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." FEMS Microbiol Rev **24**(1): 45-66.
- Cha, H. J., C. F. Wu, J. J. Valdes, G. Rao and W. E. Bentley (2000). "Observations of green fluorescent protein as a fusion partner in genetically engineered *Escherichia coli*: monitoring protein expression and solubility." Biotechnol Bioeng **67**(5): 565-74.
- Chan, S. J., J. Weiss, M. Konrad, T. White, C. Bahl, S. D. Yu, D. Marks and D. F. Steiner (1981). "Biosynthesis and periplasmic segregation of human proinsulin in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(9): 5401-5.

- 
- Chapman, T. (2005). "Protein purification: pure but not simple." Nature **434**(7034): 795-8.
- Chen, H. Z. and G. Zubay (1983). "Prokaryotic coupled transcription-translation." Methods Enzymol **101**: 674-90.
- Choi, J. H. and S. Y. Lee (2004). "Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*." Appl Microbiol Biotechnol **64**(5): 625-35.
- Chung, C. T., S. L. Niemela and R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-5.
- Cole, P. A. (1996). "Chaperone-assisted protein expression." Structure **4**(3): 239-42.
- Corisdeo, S. and B. Wang (2004). "Functional expression and display of an antibody Fab fragment in *Escherichia coli*: study of vector designs and culture conditions." Protein Expr Purif **34**(2): 270-9.
- Cortazzo, P., C. Cervenansky, M. Marin, C. Reiss, R. Ehrlich and A. Deana (2002). "Silent mutations affect in vivo protein folding in *Escherichia coli*." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 537-41.
- Crombie, T., J. C. Swaffield and A. J. Brown (1992). "Protein folding within the cell is influenced by controlled rates of polypeptide elongation." J Mol Biol **228**(1): 7-12.
- Curran, J. F. and M. Yarus (1989). "Rates of aminoacyl-tRNA selection at 29 sense codons *in vivo*." J Mol Biol **209**(1): 65-77.
- Davis, G. D., C. Elisee, D. M. Newham and R. G. Harrison (1999). "New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*." Biotechnol Bioeng **65**(4): 382-8.
- Deana, A., R. Ehrlich and C. Reiss (1996). "Synonymous codon selection controls *in vivo* turnover and amount of mRNA in *Escherichia coli bla* and *ompA* genes." J Bacteriol **178**(9): 2718-20.
- Derman, A. I., W. A. Prinz, D. Belin and J. Beckwith (1993). "Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*." Science **262**(5140): 1744-7.
- di Guan, C., P. Li, P. D. Riggs and H. Inouye (1988). "Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein." Gene **67**(1): 21-30.
- Diamant, S., N. Eliahu, D. Rosenthal and P. Goloubinoff (2001). "Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses." J Biol Chem **276**(43): 39586-91.
- Dong, H., L. Nilsson and C. G. Kurland (1995). "Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction." J Bacteriol **177**(6): 1497-504.
- Dravis (2001). "Haloalkane hydrolysis with an immobilized haloalkane dehalogenase." Biotechnol Bioeng **75**(4):416-23.: 416-23.

- Dunnill, P., Lilly, M.D., (1974) "Purification of enzymes using magnetic bio-affinity materials." Biotechnol Bioeng **16**: 987-989.
- Ebner, N. (2006). "Einsatz von Magnettrenntechnologie bei der Bioproduktaufarbeitung." PhD thesis, Institut für Technische Chemie – Bereich Wasser- und Geotechnologie, Karlsruhe, Forschungszentrum Karlsruhe in der Helmholtz-Gemeinschaft.
- Egan, S. M. and R. F. Schleif (1993). "A regulatory cascade in the induction of *rha<sub>BAD</sub>*." J Mol Biol **234**(1): 87-98.
- Etchegaray, J. P. and M. Inouye (1999). "Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*." J Biol Chem **274**(15): 10079-85.
- Etschmann, M. M., D. Sell and J. Schrader (2005). "Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation." Biotechnol Bioeng **92**(5): 624-34.
- Fahnert, B., H. Lilie and P. Neubauer (2004). "Inclusion bodies: formation and utilisation." Adv Biochem Eng Biotechnol **89**: 93-142.
- Feldman, D. E. and J. Frydman (2000). "Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones." Curr Opin Struct Biol **10**(1): 26-33.
- Festel, G., J. Knöll, H. Götz and H. Zinke (2004). "Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemischen Industrie." Chemie Ingenieur Technik **76**(3): 307-312.
- Fetzner, S. (1998). "Bacterial dehalogenation." Appl Microbiol Biotechnol **50**(6): 633-57.
- Franzreb, M., N. Ebner and M. Siemann-Herzberg (2003). "Magnettechnologie in der Bioproduktaufreinigung." Transkript Sonderband Biokatalyse: 112-115.
- Franzreb, M., M. Siemann-Herzberg, T. J. Hobley and O. R. T. Thomas (2006). "Protein purification using magnetic adsorbent particles." Applied Microbiology and Biotechnology **70**: 505-516.
- Frazzetto, G. (2003). "White biotechnology." EMBO Rep **4**(9): 835-7.
- Goldstein, M. A. and R. H. Doi (1995). "Prokaryotic promoters in biotechnology." Biotechnol Annu Rev **1**: 105-28.
- Gray, K. A., T. H. Richardson, D. E. Robertson, P. E. Swanson and M. V. Subramanian (2003). "Soil-based gene discovery: a new technology to accelerate and broaden biocatalytic applications." Adv Appl Microbiol **52**: 1-27.
- Gu, W., T. Zhou, J. Ma, X. Sun and Z. Lu (2004). "The relationship between synonymous codon usage and protein structure in *Escherichia coli* and *Homo sapiens*." Biosystems **73**(2): 89-97.
- Guisez, Y., J. Robbens, E. Remaut and W. Fiers (1993). "Folding of the MS2 coat protein in *Escherichia coli* is modulated by translational pauses resulting from mRNA secondary structure and codon usage: a hypothesis." J Theor Biol **162**(2): 243-52.

- 
- Gupta, S. K., S. Majumdar, T. K. Bhattacharya and T. C. Ghosh (2000). "Studies on the relationships between the synonymous codon usage and protein secondary structural units." Biochem Biophys Res Commun **269**(3): 692-6.
- Haldimann, A., L. L. Daniels and B. L. Wanner (1998). "Use of new methods for construction of tightly regulated arabinose and rhamnose promoter fusions in studies of the *Escherichia coli* phosphate regulon." J Bacteriol **180**(5): 1277-86.
- Hale, R. C., M. J. La Guardia, E. P. Harvey, M. O. Gaylor, T. M. Mainor and W. H. Duff (2001). "Flame retardants. Persistent pollutants in land-applied sludges." Nature **412**(6843): 140-1.
- Hall, M. N., J. Gabay, M. Debarbouille and M. Schwartz (1982). "A role for mRNA secondary structure in the control of translation initiation." Nature **295**(5850): 616-8.
- Hannig, G. and S. C. Makrides (1998). "Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*." Trends Biotechnol **16**(2): 54-60.
- He, F. T., Y. Z. Nie, B. J. Chen, T. D. Qiao, D. M. Fan, R. F. Li, Y. S. Kang and Y. Zhang (2002). "Expression and identification of recombinant soluble single-chain variable fragment of monoclonal antibody MC3." World J Gastroenterol **8**(2): 258-62.
- Heeboll-Nielsen, A. (2002). High gradient magnetic fishing: Support functionalisation and application for protein recovery from unclarified bioprocess liquors. BioCentrum DTU. Lyngby, Technical University of Denmark.
- Heeboll-Nielsen, A., M. Dalkiaer, J. J. Hubbuch and O. R. Thomas (2004). "Superparamagnetic adsorbents for high-gradient magnetic fishing of lectins out of legume extracts." Biotechnol Bioeng **87**(3): 311-23.
- Hirschbein, B. L. and G. M. Whitesides (1982). "Affinity separation of enzymes from mixtures containing suspended soils - Comparison of magnetic and nonmagnetic techniques." Appl. Biochem. Biotechnol. **7**: 157-176.
- Ho, J. G. and A. P. Middelberg (2004). "Estimating the potential refolding yield of recombinant proteins expressed as inclusion bodies." Biotechnol Bioeng **87**(5): 584-92.
- Hoffmann, C. (2002). Einsatz magnetischer Separationsverfahren zur biotechnologischen Produktaufarbeitung. Institut für Technische Chemie – Bereich Wasser- und Geotechnologie. Karlsruhe, Forschungszentrum Karlsruhe in der Helmholtz-Gesellschaft.
- Hoffmann, F. and U. Rinas (2000). "Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*." Biotechnol Prog **16**(6): 1000-7.
- Hoffmann, F. and U. Rinas (2001). "On-line estimation of the metabolic burden resulting from the synthesis of plasmid-encoded and heat-shock proteins by monitoring respiratory energy generation." Biotechnol Bioeng **76**(4): 333-40.
- Hoffmann, F. and U. Rinas (2004). "Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*." Adv Biochem Eng Biotechnol **89**: 73-92.
- Holloway, P., K. L. Knoke, J. T. Trevors and H. Lee (1998). "Alteration of the substrate range of haloalkane dehalogenase by site-directed mutagenesis." Biotechnol Bioeng **59**(4): 520-3.
-

- Holm, L. (1986). "Codon usage and gene expression." Nucleic Acids Res **14**(7): 3075-87.
- Holmquist, M. (2000). "Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms." Curr Protein Pept Sci **1**(2): 209-35.
- Holschuh, K. S., A. (2005). "Preparative purification of antibodies with protein A - an alternative to conventional Chromatography." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **293**: 345-348.
- Hubbuch, J.J., Matthiesen, D.B., Hopley, T.J., Thomas, O.R.T. (2001). "High gradient magnetic separation versus expanded bed adsorption: a first principle comparison " Bioseparation **10**: 803-808.
- Hubbuch, J., T. Linden, E. Knieps, J. Thommes and M. R. Kula (2002). "Dynamics of protein uptake within the adsorbent particle during packed bed chromatography." Biotechnol Bioeng **80**(4): 359-68.
- Hubbuch, J. J. and O. R. Thomas (2002). "High-gradient magnetic affinity separation of trypsin from porcine pancreatin." Biotechnol Bioeng **79**(3): 301-13.
- Ikemura, T. (1981). "Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system." J Mol Biol **151**(3): 389-409.
- Ito, T. and G. Wagner (2004). "Using codon optimization, chaperone co-expression, and rational mutagenesis for production and NMR assignments of human eIF2 alpha." J Biomol NMR **28**(4): 357-67.
- Jaenicke, R. (1993). "What does protein refolding in vitro tell us about protein folding in the cell?" Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **339**(1289): 287-94; discussion 294-5.
- Jana, S. and J. K. Deb (2005). "Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*." Appl Microbiol Biotechnol.
- Janssen, D. B. (2004). "Evolving haloalkane dehalogenases." Curr Opin Chem Biol **8**(2): 150-9.
- Janssen, D. B., A. Scheper, L. Dijkhuizen and B. Witholt (1985). "Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10." Appl Environ Microbiol **49**(3): 673-7.
- Jaworski, J., B. Erickson, J. Vetter and O. Wolf (2001). "The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability." OECD Report: 1-149.
- Jones, P. G., R. A. VanBogelen and F. C. Neidhardt (1987). "Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*." J Bacteriol **169**(5): 2092-5.
- Kabsch, W. and C. Sander (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." Biopolymers **22**(12): 2577-637.
- Kagawa, N. and Q. Cao (2001). "Osmotic stress induced by carbohydrates enhances expression of foreign proteins in *Escherichia coli*." Arch Biochem Biophys **393**(2): 290-6.

- 
- Kane, J. F. (1995). "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*." Curr Opin Biotechnol **6**(5): 494-500.
- Kapust, R. B. and D. S. Waugh (1999). "*Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused." Protein Sci **8**(8): 1668-74.
- Katsuki, T. and K. B. Sharpless (1980). "The First Practical Method for Asymmetric Epoxidation." J. Am. Chem. Soc. **102**: 5974-5976.
- Kiefhaber, T., R. Rudolph, H. H. Kohler and J. Buchner (1991). "Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation." Biotechnology (N Y) **9**(9): 825-9.
- Kolter, T. and M. Wendeler (2003). "Chemical chaperones--a new concept in drug research." ChemBiochem **4**(4): 260-4.
- Komar, A. A., T. Lesnik and C. Reiss (1999). "Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during *in vitro* translation." FEBS Lett **462**(3): 387-91.
- Krashennikov, I. A., A. A. Komar and I. A. Adzhubei (1989). "[Role of the code redundancy in determining cotranslational protein folding]." Biokhimiia **54**(2): 187-200.
- Kube, J., C. Brokamp, R. Machielsen, J. van der Oost and H. Markl (2006). "Influence of temperature on the production of an archaeal thermoactive alcohol dehydrogenase from *Pyrococcus furiosus* with recombinant *Escherichia coli*." Extremophiles.
- Lea, T., F. Vartdal, K. Nustad, S. Fuderud, A. Berge, T. Ellingsen, R. Schmid, P. Stenstad and J. Ugelstad (2004). "Monosized, magnetic polymer particles: Their use in separation of cells and subcellular components, and the study of lymphocyte function *in vitro*." Journal of Molecular Recognition **1**(1): 9-18.
- Leuchtenberger, A. (1998). Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie. Stuttgart, B.G. Teubner Stuttgart.
- Liljenstrom, H. and G. von Heijne (1987). "Translation rate modification by preferential codon usage: intragenic position effects." J Theor Biol **124**(1): 43-55.
- Linn, S. and J. A. Imlay (1987). "Toxicity, mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide." J Cell Sci Suppl **6**: 289-301.
- Luria, S. E., J. N. Adams and R. C. Ting (1960). "Transduction of lactose-utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles." Virology **12**: 348-90.
- Makrides, S. C. (1996). "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*." Microbiol Rev **60**(3): 512-38.
- Marek, J., J. Vevodova, I. K. Smatanova, Y. Nagata, L. A. Svensson, J. Newman, M. Takagi and J. Damborsky (2000). "Crystal structure of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26." Biochemistry **39**(46): 14082-6.
- Masunaga, S., T. Takasuga and J. Nakanishi (2001). "Dioxin and dioxin-like PCB impurities in some Japanese agrochemical formulations." Chemosphere **44**(4): 873-85.

- Mathews, D. H., J. Sabina, M. Zuker and D. H. Turner (1999). "Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure." J Mol Biol **288**(5): 911-40.
- Mattes, R. (2001). "The production of improved tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*." Semin Thromb Hemost **27**(4): 325-36.
- Mattick, K. L., R. J. Rowbury and T. J. Humphrey (2003). "Morphological changes to *Escherichia coli* O157:H7, commensal *E. coli* and *Salmonella* spp in response to marginal growth conditions, with special reference to mildly stressing temperatures." Sci Prog **86**(Pt 1-2): 103-13.
- McNulty, D. E., B. A. Claffee, M. J. Huddleston, M. L. Porter, K. M. Cavnar and J. F. Kane (2003). "Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*." Protein Expr Purif **27**(2): 365-74.
- Meyer, A. (2004). Einsatz magnetotechnologischer Trennverfahren zur Aufarbeitung von Molkereiprodukten. Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik. Karlsruhe, Universität Karlsruhe.
- Middelberg, A. P. (1995). "Process-scale disruption of microorganisms." Biotechnol Adv **13**(3): 491-551.
- Nagata, Y., K. Miyauchi, J. Damborsky, K. Manova, A. Ansorgova and M. Takagi (1997). "Purification and characterization of a haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26." Appl Environ Microbiol **63**(9): 3707-10.
- Neubauer, P., L. Häggström and S. O. Enfors (1995). "Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth yield in *Escherichia coli* glucose limited fed-batch cultivations." Biotechnology and Bioengineering **47**(2): 139-146.
- Newman, J., T. S. Peat, R. Richard, L. Kan, P. E. Swanson, J. A. Affholter, I. H. Holmes, J. F. Schindler, C. J. Unkefer and T. C. Terwilliger (1999). "Haloalkane dehalogenases: structure of a *Rhodococcus* enzyme." Biochemistry **38**(49): 16105-14.
- Nierlich, D. P. and G. J. Murakawa (1996). "The decay of bacterial messenger RNA." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **52**: 153-216.
- Ohnuma, T., M. Yagi, T. Yamagami, T. Taira, Y. Aso and M. Ishiguro (2002). "Molecular cloning, functional expression, and mutagenesis of cDNA encoding rye (*Secale cereale*) seed chitinase-c." Biosci Biotechnol Biochem **66**(2): 277-84.
- Ollis, D. L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag and et al. (1992). "The alpha/beta hydrolase fold." Protein Eng **5**(3): 197-211.
- Olsvik, O., T. Popovic, E. Skjerve, S. Cudjoe, E. Hornes, J. Ugelstad and M. Uhlen (1994). "Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology." Clinical Microbiology Reviews **7**(1): 43-54.
- Oresic, M. and D. Shalloway (1998). "Specific correlations between relative synonymous codon usage and protein secondary structure." J Mol Biol **281**(1): 31-48.



- 
- Oster, J., J. Parker and L. a Brassard (2001). "Polyvinyl-alcohol-based magnetic beads for rapid and efficient separation of specific or unspecific nucleic acid sequences." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **225**(1): 145-150.
- Ou, W. B., Y. D. Park and H. M. Zhou (2001). "Molecular mechanism for osmolyte protection of creatine kinase against guanidine denaturation." Eur J Biochem **268**(22): 5901-11.
- Parales, R. E., N. C. Bruce, A. Schmid and L. P. Wackett (2002). "Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (b3)." Appl Environ Microbiol **68**(10): 4699-709.
- Pedersen, S. (1984). "*Escherichia coli* ribosomes translate *in vivo* with variable rate." Embo J **3**(12): 2895-8.
- Persson, J., D. C. Andersen and P. M. Lester (2005). "Evaluation of different primary recovery methods for *E. coli*-derived recombinant human growth hormone and compatibility with further down-stream purification." Biotechnol Bioeng **90**(4): 442-51.
- Petrides, D. (2003). Bioprocess Design and Economics. Bioseparations Science and Engineering. H. R. G., P. W. Todd, S. R. Rudge and D. Petrides, Oxford University Press: 1-17.
- Porath, J. and B. Olin (1983). "Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions." Biochemistry **22**(7): 1621-30.
- Pries, F., A. J. van den Wijngaard, R. Bos, M. Pentenga and D. B. Janssen (1994). "The role of spontaneous cap domain mutations in haloalkane dehalogenase specificity and evolution." J Biol Chem **269**(26): 17490-4.
- Purvis, I. J., A. J. Bettany, T. C. Santiago, J. R. Coggins, K. Duncan, R. Eason and A. J. Brown (1987). "The efficiency of folding of some proteins is increased by controlled rates of translation *in vivo*. A hypothesis." J Mol Biol **193**(2): 413-7.
- Ramachandiran, V., G. Kramer, P. M. Horowitz and B. Hardesty (2002). "Single synonymous codon substitution eliminates pausing during chloramphenicol acetyl transferase synthesis on *Escherichia coli* ribosomes *in vitro*." FEBS Lett **512**(1-3): 209-12.
- Rinas, U. (1996). "Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*." Biotechnol Prog **12**(2): 196-200.
- Sachdev, D. and J. M. Chirgwin (2000). "Fusions to maltose-binding protein: control of folding and solubility in protein purification." Methods Enzymol **326**: 312-21.
- Safarik, I. and M. Safarikova (2004). "Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides." BioMagnetic Research and Technology **2**(7): 1-17.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samorski, M. (2006). Immobilisierung von Haloalkan Dehalogenasen und Prozessentwicklung der enzymkatalysierten Produktion von optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol. Institut für Bioverfahrenstechnik. Stuttgart, Universität Stuttgart.

- Sanden, A. M., I. Prytz, I. Tubulekas, C. Forberg, H. Le, A. Hektor, P. Neubauer, Z. Pragai, C. Harwood, A. Ward, A. Picon, J. T. De Mattos, P. Postma, A. Farewell, T. Nystrom, S. Reeh, S. Pedersen and G. Larsson (2003). "Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins." Biotechnol Bioeng **81**(2): 158-66.
- Schanstra, J. P., J. Kingma and D. B. Janssen (1996). "Specificity and kinetics of haloalkane dehalogenase." J Biol Chem **271**(25): 14747-53.
- Schlottmann, U. (2002). "1,2-Dichloroethane - SIDS Initial Assessment Report." 1-203.
- Schmidt, M., E. Viaplana, F. Hoffmann, S. Marten, A. Villaverde and U. Rinas (1999). "Secretion-dependent proteolysis of heterologous protein by recombinant *Escherichia coli* is connected to an increased activity of the energy-generating dissimilatory pathway." Biotechnol Bioeng **66**(1): 61-7.
- Schuster, M., E. Wasserbauer, C. Ortner, K. Graumann, A. Jungbauer, F. Hammerschmid and G. Werner (2000). "Short cut of protein purification by integration of cell-disrupture and affinity extraction." Bioseparation **9**(2): 59-67.
- Schutte, H. and M. R. Kula (1990). "Pilot- and process-scale techniques for cell disruption." Biotechnol Appl Biochem **12**(6): 599-620.
- Seo, J. H., D. G. Kang and H. J. Cha (2003). "Comparison of cellular stress levels and green-fluorescent-protein expression in several *Escherichia coli* strains." Biotechnol Appl Biochem **37**(Pt 2): 103-7.
- Sharp, P. M. and W. H. Li (1987). "The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications." Nucleic Acids Res **15**(3): 1281-95.
- Shiloach, J., J. Kaufman, A. S. Guillard and R. Fass (1996). "Effect of Glucose Supply Strategy on Acetate Accumulation, Growth and Recombinant Protein Production by *Escherichia coli* BL21 (DE3) and *Escherichia coli* JM109." Biotechnology and Bioengineering **49**: 421-428.
- Shin, C. S., M. S. Hong, D. Y. Kim, H. C. Shin and J. Lee (1998). "Growth-associated synthesis of recombinant human glucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*." Appl Microbiol Biotechnol **49**(4): 364-70.
- Shinde, U. and M. Inouye (1996). "Propeptide-mediated folding in subtilisin: the intramolecular chaperone concept." Adv Exp Med Biol **379**: 147-54.
- Simon, R., U. Prierer and A. Pühler (1983). "A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria." BioTechnology **1**: 784-791.
- Solomovici, J., T. Lesnik and C. Reiss (1997). "Does *Escherichia coli* optimize the economics of the translation process?" J Theor Biol **185**(4): 511-21.
- Sorensen, H. P. and K. K. Mortensen (2005). "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*." J Biotechnol **115**(2): 113-28.
- Sorensen, H. P., H. U. Sperling-Petersen and K. K. Mortensen (2003). "A favorable solubility partner for the recombinant expression of streptavidin." Protein Expr Purif **32**(2): 252-9.

- 
- Sorensen, M. A. and S. Pedersen (1991). "Absolute *in vivo* translation rates of individual codons in *Escherichia coli*. The two glutamic acid codons GAA and GAG are translated with a threefold difference in rate." J Mol Biol **222**(2): 265-80.
- Spalding, B. J. (1991). "Downstream processing: key to slashing production costs 100 fold." Biotechnology (N Y) **9**(3): 229-3, 232, 235.
- Stucki, G. and M. Thüer (1995). "Experiences of a Large-Scale Application of 1,2-Dichloroethane Degrading Microorganisms for Groundwater Treatment." Environ. Sci. Technol. **29**: 2339-2345.
- Summers, D. K. and D. J. Sherratt (1988). "Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site." Embo J **7**(3): 851-8.
- Swanson, P. E. (1999). "Dehalogenases applied to industrial-scale biocatalysis." Curr Opin Biotechnol **10**(4): 365-9.
- Tanford, C., K. C. Aune and A. Ikai (1973). "Kinetics of unfolding and refolding of proteins. 3. Results for lysozyme." J Mol Biol **73**(2): 185-97.
- Thanaraj, T. A. and P. Argos (1996). "Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA." Protein Sci **5**(10): 1973-83.
- Tobin, J. F. and R. F. Schleif (1987). "Positive regulation of the *Escherichia coli* L-rhamnose operon is mediated by the products of tandemly repeated regulatory genes." J Mol Biol **196**(4): 789-99.
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D. and Arakawa, T. (2003). "Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginin." Biochem Biophys Res Commun **312**(4): 1383-6.
- Tsumoto, K., D. Ejima, I. Kumagai and T. Arakawa (2003). "Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies." Protein Expr Purif **28**(1): 1-8.
- Ukai, H., S. Inui, S. Takada, J. Dendo, J. Ogawa, K. Isobe, T. Ashida, M. Tamura, K. Tabuki and M. Ikeda (1997). "Types of organic solvents used in small- to medium-scale industries in Japan; a nationwide field survey." Int Arch Occup Environ Health **70**(6): 385-92.
- Vallejo, L. F. and U. Rinas (2004). "Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins." Microb Cell Fact **3**(1): 11.
- van de Walle, M. and J. Shiloach (1998). "Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation." Biotechnol Bioeng **57**(1): 71-8.
- Varenne, S., J. Buc, R. Lloubes and C. Lazdunski (1984). "Translation is a non-uniform process. Effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains." J Mol Biol **180**(3): 549-76.
- Vasina, J. A. and F. Baneyx (1997). "Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* *cspA* and *tac* promoter systems." Protein Expr Purif **9**(2): 211-8.

- Verschueren, K. H., J. Kingma, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, D. B. Janssen and B. W. Dijkstra (1993). "Crystallographic and fluorescence studies of the interaction of haloalkane dehalogenase with halide ions. Studies with halide compounds reveal a halide binding site in the active site." Biochemistry **32**(35): 9031-7.
- Villaverde, A. and M. M. Carrio (2003). "Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies." Biotechnol Lett **25**(17): 1385-95.
- Vind, J., M. A. Sorensen, M. D. Rasmussen and S. Pedersen (1993). "Synthesis of proteins in *Escherichia coli* is limited by the concentration of free ribosomes. Expression from reporter genes does not always reflect functional mRNA levels." J Mol Biol **231**(3): 678-88.
- Weickert, M. J., M. Pagratis, C. B. Glascock and R. Blackmore (1999). "A mutation that improves soluble recombinant hemoglobin accumulation in *Escherichia coli* in heme excess." Appl Environ Microbiol **65**(2): 640-7.
- Welch, W. J. and C. R. Brown (1996). "Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding." Cell Stress Chaperones **1**(2): 109-15.
- Widersten, M. (1998). "Heterologous expression in *Escherichia coli* of soluble active-site random mutants of haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 by co-expression of molecular chaperonins GroEL/ES." Protein Expr Purif **13**(3): 389-95.
- Wilkinson, D. L. and R. G. Harrison (1991). "Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*." Biotechnology (N Y) **9**(5): 443-8.
- Wilms, B., A. Hauck, M. Reuss, C. Syldatk, R. Mattes, M. Siemann and J. Altenbuchner (2001). "High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli rha<sub>BAD</sub>* promoter." Biotechnol Bioeng **73**(2): 95-103.
- Wurm, F. M. (2004). "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells." Nat Biotechnol **22**(11): 1393-8.
- Xie, T. and D. Ding (1998). "The relationship between synonymous codon usage and protein structure." FEBS Lett **434**(1-2): 93-6.
- Yadava, A. and C. F. Ockenhouse (2003). "Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems." Infect Immun **71**(9): 4961-9.
- Yang, Q., J. Xu, M. Li, X. Lei and L. An (2003). "High-level expression of a soluble snake venom enzyme, glosedobin, in *E. coli* in the presence of metal ions." Biotechnol Lett **25**(8): 607-10.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**(1): 103-19.
- Zhang, W. and E. N. Jacobsen (1991). "Asymmetric Olefin Epoxidation with Sodium Hypochlorite Catalyzed by Easily Prepared Chiral Mn(III) SalenComplexes." J. Org. Chem. **56**(7): 2296-2298.
- Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." Nucleic Acids Res **31**(13): 3406-15.

---

## Tabellarischer Lebenslauf

Name: Christina Fritz  
Geburtsdatum: 08.01.1976  
Geburtsort: Göppingen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

Schulbildung:  
08/1986 – 06/1995 Mörike Gymnasium in Göppingen, Abitur

Studium:  
10/1996 – 07/2002 Studium der Technischen Biologie an der Universität in Stuttgart  
Diplomvorprüfung: Dezember 1998  
Diplomprüfung: Juli 2002

Promotion:  
08/2002 – 03/2006 Insitut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart; Prof. Dr.-Ing. Dr. h. c. M. Reuss