

Entwicklung von Werkzeugen zur Darstellung und Durchmusterung von Proteinbibliotheken

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

Vorgelegt von Markus Enzelberger
aus München

Hauptberichter : Prof. Dr. Rolf D. Schmid

Mitberichter : Prof. Dr. Dieter Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.1999

Institut für Technische Biochemie

1999

Hiermit bestätige ich, daß ich vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Stuttgart, den

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid (ITB) für die Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit, besonders aber auch für die Möglichkeit im industrienahen Umfeld arbeiten zu dürfen und so Einblicke in die Arbeitsweise der Industrie zu erhalten.

Privatdozent Dr. habil. Uwe Bornscheuer (ITB) danke ich für die Unterstützung der Arbeit und für viele anregende und aufbauende Diskussionen.

Dr. habil. Bernhard Hauer (BASF) danke ich für viele Diskussionen und Einblicke in die industrielle Forschung.

Dipl. Ing. H. Eipel (BASF) führte mich mit seinem unerschöpflichen Erfahrungsfundus in die Welt der Durchflußzytometrie ein.

Dipl. Chem. Frank Zocher (ITB) danke ich für die gemeinsame Zeit und die Diskussionen (nicht nur über Enzyme) im Labor, in Zügen, Flugzeugen und auf Tagungen. Aber besonders für die gute und immer offene Zusammenarbeit in diesem Projekt.

Dipl. Chem. Stefan Minning (ITB) danke ich für die angenehme Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Metallaffinitätspeptide.

Dr. Stefan Pelzer (Institut für Mikrobiologie, Uni Tübingen) danke ich für die Einführung in die *Streptomyces*-Genetik, aber besonders für die etwas andere Sichtweise der (nicht nur wissenschaftlichen) Probleme.

Jonathan Heckleroth, Michaela Steng, Andreas Horschinek und Peter Ölschläger (ITB) danke ich für ihren Einsatz während ihrer Diplom- oder Studienarbeiten.

Volker Nödinger (ITB) danke ich für die Durchführung der Proteinsequenzierung und besonders für seine ordnende Hand, die den Laborbetrieb erst ermöglicht.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Technische Biochemie, besonders der Biokatalysegruppe, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für ihre Tips und Hilfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Heike, die mich während des Studiums und der Arbeit immer verständnis- und liebevoll begleitete.

Abkürzungen

Abkürzungen

%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent
(R)	(R)-Konfiguration
(S)	(S)-Konfiguration
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asp	Aspartat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BTL2	Lipase aus <i>Bacillus thermocatenulatus</i>
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
Cys	Cystein
Da	Dalton
dATP	3'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	3'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
De	Diastereomerenüberschuß
dGTP	3'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	3'-Desoxyribonukleinsäure-5'-triphosphat
dTTP	3'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Enantioselektivität
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ee	Enantiomerenüberschuß
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EH	Epoxidhydrolase
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflußzytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FPLC	Fast performance liquid chromatografie
GC	Gaschromatographie
h	Stunde

Abkürzungen

HIC	Hydrophobe Interaktionschromatografie
His	Histidin
HTS	Hochdurchsatzscreening (High throughput screening)
IEC	Ionenaustauschchromatografie
IMAC	Metallaffinitätschromatografie
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
LM	Lösungsmittel
M	molar (mol/l)
mA	Milliampère
min	Minute
ml	Milliliter
MTP	Mikrotiterplatte
NBP	4-(<i>p</i> -Nitrobenzyl)-pyridin
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
<i>p</i>	para
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pro	Prolin
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
Std.	Stunde
TP	theoretischer Boden
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
λ	Wellenlänge

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	10
1.1	Zufallsmutagenese.....	10
1.1.1	Verfahren zur Zufallsmutagenese.....	11
1.1.2	Anwendung der pharmazeutisch orientierten HTS-Technologie für das Enzymscreening	13
1.2	Hydrolytische Enzyme in der organischen Synthese.....	16
1.2.1	Lipasen	16
1.2.2	Epoxidhydrolasen	19
1.2.3	α/β -Hydrolase fold	21
1.2.4	Sequenzhomologien.....	25
1.3	Proteinaufreinigung	26
1.3.1	Metallaffinitätschromatografie	26
1.3.2	Metallaffinitätstags	28
1.4	GFP als Reporter in der Biotechnologie.....	29
1.5	Zellsorter.....	30
1.6	Streptomyceten.....	31
1.6.1	Enzyme aus Streptomyceten.....	31
1.6.2	<i>Streptomyces lividans</i> als Expressionsorganismus	31
2	AUFGABENSTELLUNG	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	Vereinzelung von <i>E. coli</i>-Klonen durch FACS.....	34
3.1.1	Konstruktion des Vektors pCYTEXP1-BTL2-lacegfp.....	34
3.1.2	Zufallsmutagenese des Plasmids pCYTEXP1P1-BTL2-lacegfp.....	35
3.1.3	Durchflußzytometrie zur Vereinzelung der Mutanten.....	37
3.1.4	Wachstums- und Expressionsverhalten der vereinzelt Klone.....	39
3.2	Versuche zur Generierung von Epoxidhydrolaseaktivität in der Lipase BTL2.....	41
3.2.1	Entwicklung eines Assaysystems	41
3.2.2	Automatisierung des Assaysystems.....	42
3.2.3	Streptomyceten Stämme als Kontrolle für das Assaysystem.....	44
3.2.4	Einführung von Rationalmutanten.....	45
3.2.5	Zufallsmutagenese der Rationalmutanten.....	46

3.3	Entwicklung eines neuen Metallaffinitätspeptides für die Proteinaufreinigung	48
3.3.1	Natürliche Metallbindungsstelle des Humanpathogens <i>Helicobacter pylori</i>	48
3.3.2	Zufallsmutagenese der Metallbindungsstelle einer ATPase von <i>Helicobacter pylori</i>	48
3.3.3	GFP als Reporterprotein für die Bindungseigenschaften verschiedener Metallaffinitätspeptide...	49
3.3.4	Sequenzierung und Evaluierung der Klone	51
3.3.5	Entwicklung eines automatisierten Assaysystems für das Hochdurchsatzscreening	52
3.3.6	Charakterisierung einiger Klone mit Ni-NTA Spin-Präp-Säulen	55
3.3.7	Einsatz in der FPLC-Aufreinigung.....	56
3.3.8	Verschiedene Metalle für die Proteinaufreinigung	58
3.3.9	Vergleich des HeliTags mit dem (His) ₆ und einer Wildtypmetallbindungsstelle	59
3.4	Aufreinigung und Expression der Lipase BTL2 in verschiedenen Expressionsorganismen	61
3.4.1	<i>E. coli</i>	61
3.4.2	<i>Streptomyces lividans</i>	67
4	DISKUSSION	71
4.1	Hochdurchsatzscreening in der gerichteten Evolution	71
4.2	Epoxidhydrolasen.....	73
4.2.1	Filterpapierassay.....	73
4.2.2	„Umwidmung eines Enzyms“	74
4.3	Entwicklung neuer Metallaffinitätspeptide	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	80
6	MATERIAL UND METHODEN	83
6.1	Material und Geräte	83
6.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	83
6.1.2	Verwendete Geräte	84
6.1.3	Verwendete Datenbanken und Software.....	86
6.1.4	Chemische Methoden	87
6.1.5	Mikroorganismen.....	87
6.1.6	Plasmide	88
6.1.7	Primer	88
6.1.8	Medien.....	89
6.1.9	Puffer	89
6.1.10	Antibiotika und andere Stammlösungen.....	89
6.2	Biologische Methoden	90

Inhaltsverzeichnis

6.2.1	Stammhaltung.....	90
6.2.2	Anlegung von Glycerinkulturen	90
6.2.3	Anzucht in Flüssigmedien	90
6.2.4	Messung der Zelldichte.....	91
6.3	Molekularbiologische Methoden.....	91
6.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren aus <i>Escherichia coli</i>	91
6.3.2	Isolierung von Nukleinsäuren aus Streptomyceten.....	92
6.3.3	Alkoholfällung.....	92
6.3.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	93
6.3.5	Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA.....	93
6.3.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	93
6.3.7	In vitro Manipulation von DNA	94
6.3.8	Auffüllreaktion mit Hilfe der „Klenow Polymerase“	94
6.3.9	Die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	94
6.3.10	Einführung von Punktmutationen durch die QuickChange® Methode	95
6.3.11	Punktgerichtete Mutagenese durch PCR („Drei Primer Methode“)	97
6.3.12	DNA-Sequenzierung	99
6.3.13	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	100
6.3.14	Protoplasten-Transformation bei Streptomyceten	101
6.4	Biochemische Methoden	102
6.4.1	SDS-PAGE	102
6.4.2	Pharmacia PHAST-PAGE®	102
6.4.3	Lipaseaktivitätsfärbung.....	103
6.4.4	Western Blot und N-terminale Sequenzierung	103
6.4.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	103
6.5	Proteinaufreinigung über „Immobilized Metal Affinity Chromatografie“ (IMAC).....	104
6.5.1	Im Hochdurchsatzscreening (HTS)	104
6.5.2	In Qiagen Ni-NTA Spin Columns®	104
6.5.3	FPLC-Aufreinigungen	105
6.6	Aktivitätsbestimmungen.....	106
6.6.1	Spektrophotometrischer Lipase Assay.....	106
6.6.2	pH-Stat Assay	106
6.6.3	Epoxidhydrolase Assay in Mikrotiterplatten	106
6.6.4	Bestimmung der Fluoreszenz	107
6.7	Biotransformation von Styroloxid mit Streptomyceten Stämmen.....	109
6.8	Expressionssysteme	108
6.8.1	Expression in <i>E. coli</i>	108

Inhaltsverzeichnis

6.8.2	Expression in <i>S. lividans</i>	109
6.9	Zellvereinzlung in Mikrotiterplatten	110
6.9.1	Biopick	110
6.9.2	Zellsorter.....	110
6.10	Fermentation und Zellaufschluß.....	111
6.10.1	<i>E. coli</i>	111
6.10.2	Streptomyceten.....	112
7	LITERATUR	113

1 Einleitung

1.1 Zufallsmutagenese

Enzyme oder Proteine mit neuen Eigenschaften können entweder durch „Organismen“- Suche in Umweltproben oder durch Veränderung bereits bekannter Proteine oder Enzyme gefunden werden. Für das Design von Proteineigenschaften hat sich neben der auf Röntgenstrukturdaten und Computermodellierung basierenden rationalen Mutagenese in letzter Zeit auch die Zufallsmutagenese etabliert (s. Abbildung 1.1.) (Bornscheuer, 1998). Die Zufallsmutagenese, auch gerichtete Evolution genannt, versucht die natürliche Evolution dahingehend zu kopieren, daß in das interessierende Gen zufällig Mutationen eingebracht werden und die entstehenden Varianten dann auf veränderte Eigenschaften hin untersucht werden.

Im Gegensatz zur rationalen Mutagenese ist für die Zufallsmutagenese keine Strukturkenntnis nötig, auch lassen sich durch die gerichtete Evolution Enzymeigenschaften wie Lösungsmittel- (Moore und Arnold, 1996), pH- oder Temperaturstabilität (Rellos und Scopes, 1994) optimieren, zu deren Erklärung man auf molekularer Basis noch nicht in der Lage ist. Der limitierende Faktor bei allen Methoden der Zufallsmutagenese ist die entstehende große Zahl von (unnützen) Varianten (s. Tabelle 1.1), aus denen diejenigen ausgewählt, bzw. gescreent, werden müssen, welche die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Das Assaysystem ist somit der kritische Punkt jeder Zufallsmutagenese und es gilt „You only get what you screen for“ (Arnold und Moore, 1997).

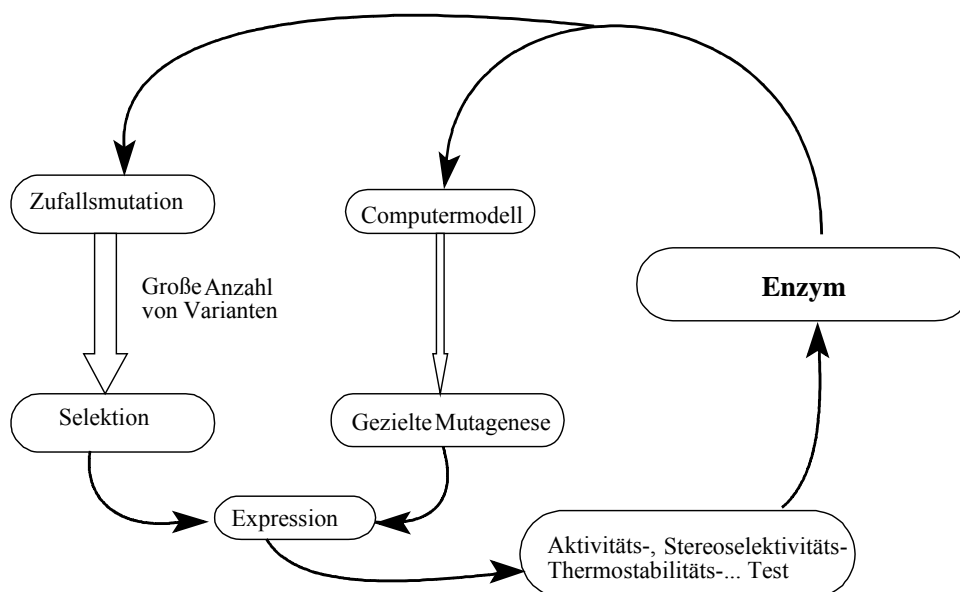


Abbildung 1.1: Der um die Zufallsmutagenese erweiterte „Protein engineering cycle“

Substitutionen	Sequenzlänge	
	10	200
1	190	3800
2	16245	7183900
3	823080	9008610600
4	27367410	8429807368950
5	623976948	6278520528393960

Tabelle 1.1: Anzahl der möglichen Proteinvarianten in 10 bzw. 200 Aminosäuren großen Peptiden. Sie ergibt sich aus $19^M [N! / (N-M)! M!]$, wobei M die Zahl der Mutationen in einem N Aminosäuren großen Protein ist (Kuchner und Arnold, 1997).

1.1.1 Verfahren zur Zufallsmutagenese

Für die verschiedenen Einsatzgebiete wurden in den letzten 10 Jahren unterschiedliche Mutageneseverfahren etabliert.

Der Einsatz von Oligonukleotiden mit unbestimmten Desoxynukleinsäuren (Hermes et al., 1989; Hubner et al., 1988) ist als Hybrid zwischen rationaler- und reiner Zufallsmutagenese anzusehen: rational bezüglich der Auswahl des (kleinen) zu mutierenden Bereiches, zufällig aufgrund des nicht vorhersehbaren Einbaus und der auch sehr großen Zahl entstehender Mutanten (bei 6 zu variierenden Positionen $3 \cdot 10^{15}$ Permutationsmöglichkeiten). Die Methode wird industriell (Morphosys, München) zur Erhöhung der Affinität von Antigenbindungsdomänen genutzt (Virnekas et al., 1994), wobei nicht einzelne Nukleotide, sondern bereits vorgefertigte Triplets, die auf die Codon-Nutzung des Expressionswirts optimiert sind, eingesetzt werden.

Erfordert die Oligonukleotidbasierte Methode noch grobe Kenntnisse der Struktur und des Reaktions- bzw. Bindungsmechanismus, so ist dies für die Methoden der „reinen“ Zufallsmutagenese nicht nötig.

Das am häufigsten zur Zufallsmutagenese eingesetzte Verfahren ist die fehlerhafte Polymerasekettenreaktion (error-prone PCR). Diese ermöglicht durch suboptimale Reaktionsbedingungen, wie verschiedene Konzentrationen einzelner Nukleotide (Cadwell und Joyce, 1992), Zugabe von unnatürlichen Nukleotiden (Spee et al., 1993) oder Zumischung von Mangan (Leung et al., 1989), die Erhöhung der Fehlerrate in der Reaktion. Die Vorteile der error-prone PCR liegen neben der leichten Durchführbarkeit auch in der Möglichkeit

einzelne Enzymabschnitte zu mutieren. Auch läßt sich die Mutationshäufigkeit den Bedürfnissen entsprechend einstellen. Wird nur die fehleranfällige PCR-Reaktion eingesetzt, wird die Möglichkeit vergeben, synergistische Effekte mehrerer Mutationen zu nutzen. Auch bleiben „schlechte“ Mutationen erhalten und werden nicht wieder „rückgekreuzt“. Hier setzt das *gene shuffling*, auch sexuelle gerichtete Evolution genannt, an. Diese ahmt die natürliche Evolution durch das „Mischen“ verschiedener Zufallsmutanten oder gar verschiedener (homogener) Gene nach (Stemmer, 1994). Zu diesem Zweck wird die die entsprechenden Gene codierende DNA durch unspezifische Restriktionsenzyme gespalten und anschließend durch eine PCR, in der die entstandenen Fragmente als Primer dienen, neu rekombiniert. Stemmer gelang mit dieser Methode die 35fache Erhöhung der Fluoreszenzausbeute des green fluorescent proteins (GFP) (s. Abschnitt 1.4) (Crameri et al., 1996). Auch die Erhöhung einer β -Lactam Antibiotikaresistenz durch die Mischung von (homologen) Resistenzgenen verschiedener Organismen war möglich (Crameri et al., 1998).

Sowohl die fehleranfällige PCR wie besonders das *gene shuffling* erfordern mehr oder minder komplizierte molekularbiologische Techniken. Eine sehr einfache Möglichkeit extrem große Mutantenbibliotheken zu erzeugen, ist der Einsatz von Mutationsstämmen. Bei dieser Methode wird das zu mutierende Plasmid in einen Wirt mit Defekten im DNA-Reparaturmechanismus (beispielsweise *Epicurian coli* XL1 RED) transformiert. Während der Plasmid-Replikation werden dann stochastisch Fehler in das Gen und das es tragende Plasmid eingebaut.

Für die organisch-chemische Synthese sind besonders die Veränderung von Stereoselektivität und Substratspezifität interessant (s. auch Abschnitt 1.2). So gelang es die Stereoselektivität einer Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* bei der Hydrolyse des racemischen 2-Methyldecansäure-*p*-nitrophenylesters durch error-prone PCR von 2% *ee* (Wildtyp) auf 81% *ee* zu steigern (Reetz et al., 1997).

Mit Hilfe des Mutationsstammes wurde auch eine Mutante der Esterase aus *Pseudomonas flourescens*, welche einen sterisch gehinderten 3-Hydroxyester mit moderater Stereoselektivität spalten konnte, der vom Wildtyp nicht als Substrat akzeptiert wurde, erzeugt (Bornscheuer et al., 1998). Hier erfolgte das Screening über einen gekoppelten Resourufinester-Wachstumsassay auf Agarplatten. Das direkte Screening der Kolonien auf Agarplatten ist aufgrund der niedrigen Kosten und des erzielbaren hohen Durchsatzes von verschiedenen Mutanten die zu bevorzugende Assayplattform. Probleme, wie Stereoselektivität (Reetz et al., 1997), Lösungsmittelstabilität oder schlicht höhere Aktivität, lassen sich dort nicht untersuchen. Für diese Fragestellungen müssen Einzelreaktionen mit

jedem Enzym durchgeführt werden. Um dies bei der großen Anzahl der Enzymvarianten bewerkstelligen zu können, bietet sich der Einsatz von Mikrotiterplatten an.

1.1.2 Anwendung der pharmazeutisch orientierten HTS-Technologie für das Enzymscreening

Das Screening in Mikrotiterplatten hat seinen Ursprung im Pharmascreen. Bis zur Entwicklung der kombinatorischen Synthese konnten die wenigen zur Verfügung stehenden Substanzen auf deren biologische Wirksamkeit hin in Einzelexperimenten getestet werden. Dies war mit dem Aufkommen großer Substanzbibliotheken nicht mehr möglich. Als Antwort auf dieses Problem begann die pharmazeutische Industrie die Assayverfahren massiv zu automatisieren und zu parallelisieren. Hierfür wurden und werden Mikrotiterplattenassays im großem Maßstab eingesetzt. Die Geschwindigkeiten vollautomatischer Screeningstraßen sind heute so hoch, daß der „Flaschenhals“ wieder auf dem Gebiet der (kombinatorischen) Synthesechemie liegt (Pavia, 1997).

Das Screening nach neuen Wirkstoffen ist auf ein biologisches Target gerichtet, welches mit vielen unterschiedlichen chemischen Verbindungen getestet wird.

Bei dem Screening nach neuen, durch Zufallsmutagenese gewonnenen Biokatalysatoren, stellt sich das Problem genau umgekehrt dar: *eine* chemische Zielverbindung soll mit einer großen Anzahl von Enzymvarianten umgesetzt werden. Die Zahl der mit geringem Aufwand darstellbaren Enzymvarianten, ist aber in diesem Fall so groß, daß die Assayentwicklungs- und Automatisierungstechnik wieder gefordert ist.

Die Techniken und Plattformen sind jedoch oft vergleich- oder adaptierbar. Offensichtlich ist dies für die etablierte Suche nach Enzyminhibitoren, bei denen sich nach Zugabe des Inhibitors auch immer die Aktivitätsbestimmung des Enzyms anschließt. Eine Vielzahl von verschiedenen Meßmethoden in den für das HTS üblichen „96 well“ Mikrotiterplatten wurden hierfür entwickelt und validiert (Wallace und Goldman, 1997).

Abbildung 1.2 zeigt den typischen Ablauf eines Screenings in durch Zufallsmutagenese erzeugten Bibliotheken. Hier wird auch der interdisziplinäre Charakter dieser Aufgabenstellung deutlich, neben biophysikalischen müssen auch molekularbiologische, verfahrens- und informationstechnische Methoden angewendet werden.

Nach der Mutagenese des das zu optimierenden Enzym codierenden DNA Abschnittes und der Transformation in ein geeignetes Wirtssystem, werden eine solch große Anzahl von Mutanten erhalten, daß keine Automatisierung dieses Schrittes nötig ist.

Die Vereinzelung dieser Kolonien ist einer der „Flaschenhalse“ bei der Automatisierung der Mikrotiterplattenassays. Für diesen Schritt gibt es auch in der Wirkstoffsuche kein Analogon, da die hier zu untersuchenden chemischen Substanzen bereits in diskreten Kompartimenten synthetisiert wurden und somit der Automatisierung zugänglich sind. Hier besteht demzufolge noch großer Entwicklungsbedarf. Gleiches gilt für die Kultivierung und insbesondere den Aufschluß der vereinzelt Klone. Viele der üblichen gebräuchlichen Verfahren wie Ultraschall, Kugelmühle oder French Press lassen sich (noch) nicht in Mikrotiterplatten realisieren. Im Pharmascreeing besteht für die Entwicklung solcher Systeme auch keine Notwendigkeit, da hier die zu testenden Enzyme oder Rezeptoren im Batch-Ansatz gewonnen und aufgearbeitet werden können und erst dann zu den unterschiedlichen Substanzen gegeben werden.

Die nachfolgende Assaydurchführung dagegen, die meist aus der Zugabe verschiedener Reagenzien, Mischen und Inkubation so wie evtl. Wiederholungen dieser Schritte besteht, ist heute mit Laborautomaten weitgehend automatisierbar. Dies gilt auch für komplexere Schritte wie Festphasenextraktion, Filtration oder sogar Destillation.

Auch der Transport der Platten zu den unterschiedlichen Pipettier-, Filtrier- und Meßstationen über Roboterarme ist bereits längere Zeit Stand der Technik.

Für das abschließende Auslesen der Assayergebnisse stehen eine Vielzahl von mikrotiterplattentauglichen Geräten wie Photo-, Fluo- oder Luminometer zur Verfügung, die auch mit mäßigem Aufwand in vollautomatisierte Screeningstraßen eingebunden werden können.

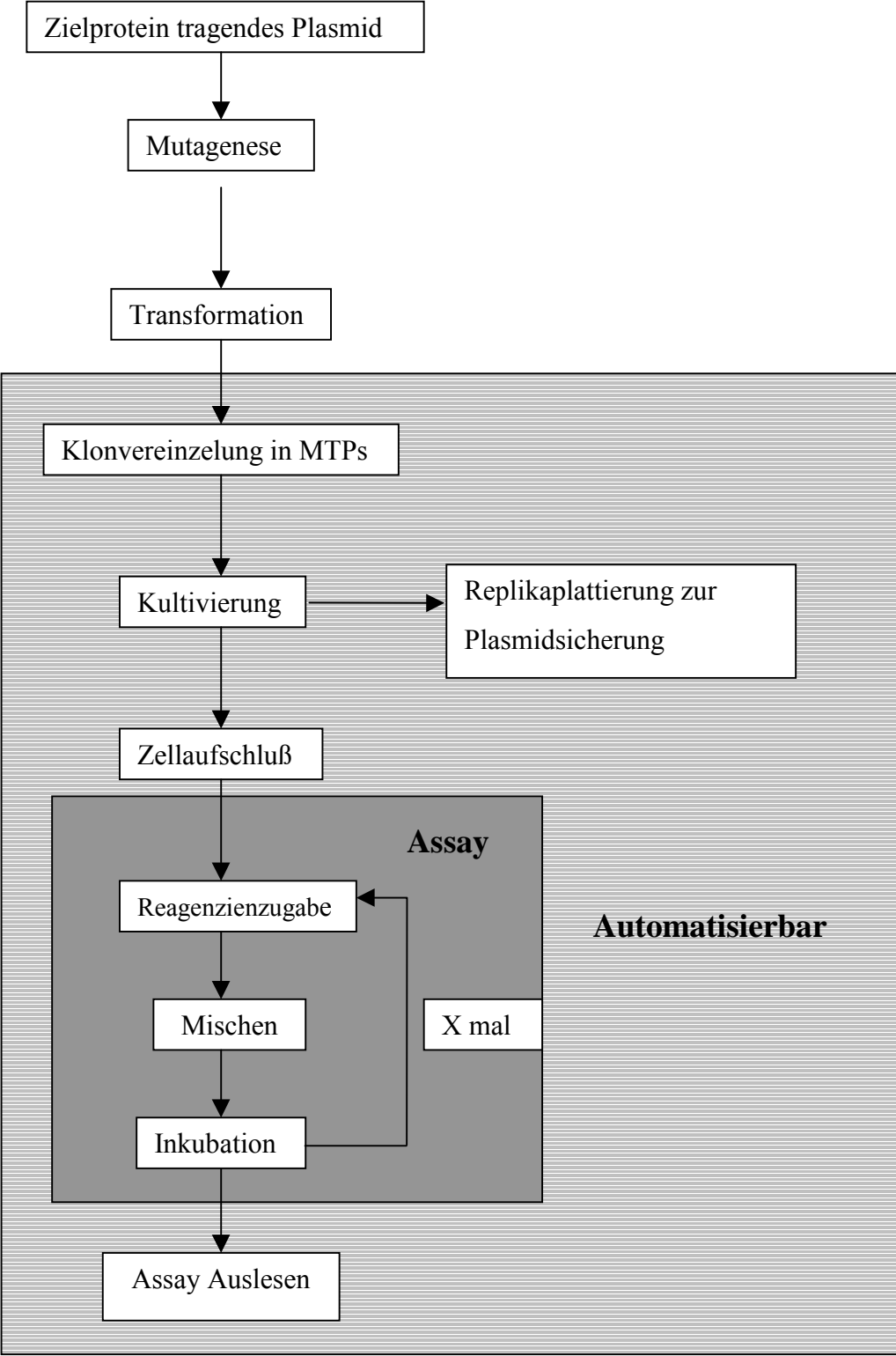


Abbildung 1.2: Ablauf einer Zufallsmutagenese mit HTS-Anbindung

1.2 Hydrolytische Enzyme in der organischen Synthese

Hydrolasen (EC 3.x.x.x) wie z.B. Lipasen, Esterasen, Proteasen und Epoxidhydrolasen haben in den letzten Jahren zunehmend Einzug in die organische Synthese gefunden (Bornscheuer und Kazlauskas, 1999; Faber, 1997). Dies liegt vor allem in ihrer Kofaktorunabhängigkeit, ihrem breiten Substratspektrum und ihren teilweise hohen Stereo- und Regioselektivitäten begründet.

1.2.1 Lipasen

Lipasen (EC 3.1.1.3) kommen ubiquitär in der belebten Natur vor und hydrolysieren dort Triglyceride als natürliches Substrat (s. Abbildung 1.3) (Kazlauskas und Bornscheuer, 1998; Schmid und Verger, 1998).

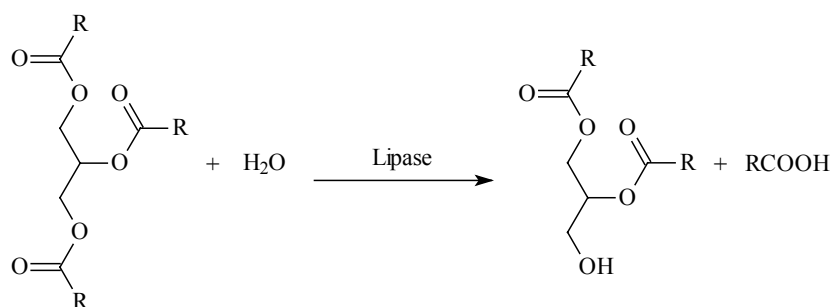


Abbildung 1.3: Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Triacylglycerids zum Diacylglycerid und freier Säure.

Lipasen zeigen eine sogenannte Grenzflächenaktivierung. Dies bedeutet, daß die Lipase bei Anlagerung an das hydrophobe Substrat einen drastischen Anstieg der katalytischen Aktivität erfährt. Experimentell wurde dies bereits 1958 von Sarda und Desnuelle nachgewiesen (Sarda und Desnuelle, 1958). Die theoretische Erklärung dieses Effekts gelang mit Hilfe von Röntgenstrukturdaten (Brady et al., 1990; Grochulski et al., 1993; Winkler et al., 1990), welche das Vorhandensein einer beweglichen Oligopeptideinheit (lid) nahelegen. Diese bedeckt das katalytische Zentrum und wird bei Substratkontakt verschoben, wodurch der Zugang zur katalytischen Triade freigegeben wird. Die Interphasenaktivierung oder das Vorhandensein eines „lids“ wird auch als Unterscheidungsmerkmal zu Esterasen benutzt, welche bevorzugt wasserlösliche Substrate hydrolysieren.

Aufgrund der Interphasenaktivierung sind Lipasen in einer Vielzahl unpolarer Lösungsmittel aktiv (Koskinen und Klibanov, 1996). Das Arbeiten unter wasserfreien Bedingungen ermöglicht auch die Umkehrreaktion der Hydrolyse, die Veresterung.

Aufgrund dieser Eigenschaften werden Lipasen in den unterschiedlichsten Biotransformationen eingesetzt. Durch Ausnutzung der Regiospezifität lassen sich beispielsweise strukturierte Triglyceride (Bornscheuer et al., 1998; Soumanou et al., 1998) oder regioselektiv acylierte Zucker (Cao et al., 1997) unter schonenden Bedingungen darstellen. Die Stereospezifität und die Stabilität der Lipasen in organischen Lösungsmitteln gewinnt zunehmend für die Darstellung optisch reiner Produkte oder Intermediate (Bornscheuer and Kazlauskas, 1999) an Bedeutung (s. Tabelle 1.2).

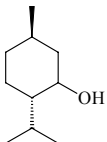
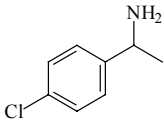
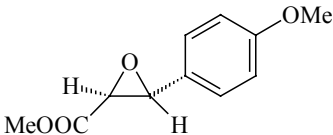
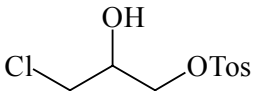
Verbindung	Anwendung	Enzym	Literatur
	Duftstoffindustrie	<i>Candida rugosa</i> Lipase	Chen et al., 1987
	Pflanzenschutz	<i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase	Balkenhohl et al., 1997; Wagegg et al., 1998
	Pharmazeutische Industrie	<i>Serratia macescens</i> Lipase	Hulshof und Roskam, 1989
	Pharmazeutische Industrie	<i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase	Wünsche et al., 1996

Tabelle 1.2: Einige ausgewählte industrielle Anwendungen für Lipasen in der kinetischen Racematspaltung

1.2.1.1 Die Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus* BTL 2

Der thermophile Prokaryot *Bacillus thermocatenulatus* produziert zwei Lipasen (Schmidt-Dannert et al., 1993, 1996), von denen die 42kDa große (BTL2) rekombinant vorliegt. Das temperaturstabile Protein läßt sich mit hoher spezifischer Aktivität (1314 U/mg) ohne Helferproteine aktiv in *E. coli* produzieren. Die einfache Zugänglichkeit eines aktiven Enzyms prädestiniert es als Modell für die Entwicklung und Validierung neuer Screeningmethoden.

Das Protein wird inzwischen auch in einem Lipase-Test-Kit der Firma Boehringer (Chirazym L3) angeboten.

Es liegen keine systematischen Untersuchungen über die Stereo- bzw. Substratspezifität des Enzyms vor, allerdings wurden von F. Zoicher für die Acylierung des α -Phenylethanol und des α -Phenylpropanols mit Vinylacetat oder Vinylbutyrat Enantioselektivitäten größer 100 beobachtet (Zoicher, 1999).

1.2.2 Epoxidhydrolasen

Epoxidhydrolasen (E.C. 3.3.2.3) katalysieren die regio- und enantioselektive Hydrolyse von Epoxiden (s. Abbildung 1.4), was den Zugang zu enantiomerenreinen Epoxiden bzw. Diolen ermöglicht.

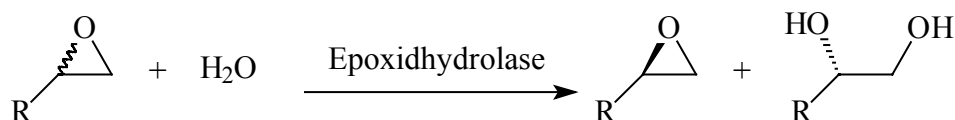


Abbildung 1.4: Epoxidhydrolase-katalysierte Hydrolyse eines terminalen Epoxids.

Galt das Interesse bisher hauptsächlich den Epoxidhydrolasen höherer Organismen, in welchen sie eine zentrale Rolle im Xenobiotika-Stoffwechsel und der Detoxifizierung spielen (Seidegard und Pierre, 1983), so stoßen in letzter Zeit auch Epoxidhydrolasen aus anderen Quellen auf Interesse. Besonders Epoxidhydrolasen aus Bakterien (Mischitz et al., 1995; Osprian et al., 1997), Hefen (Weijers, 1997) und filamentösen Pilzen (Grogan et al., 1996) wurden auf ihre Anwendbarkeit in der Biotransformation untersucht (s. Tabelle 1.3)

Organismus	Literatur
<i>Aspergillus niger</i> LCP521	Pedragosa-Moreau et al., 1996
<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 11216	Mischitz et al., 1996
<i>Agrobacterium radiobacter</i> AD1	Spelberg et al., 1998
<i>Nocardia</i> sp. EH1	Kroutil et al., 1996

Tabelle 1.3: Auswahl verschiedener mikrobieller Epoxidhydrolasen

Die Charakterisierung der mikrobiellen Epoxidhydrolasen ist bei weitem noch nicht so fortgeschritten wie bei den Lipasen. Erstens liegen erst zwei klonierte (Misawa et al., 1998; Rink et al., 1997) und zwei aufgereinigte Enzyme (Kroutil et al., 1998; Mischitz et al., 1995) vor und zweitens sind kontinuierliche Reaktionsverfolgungen aufgrund fehlender Assaysysteme nicht möglich.

Die meisten Biotransformationen wurden deshalb mit ganzen Zellen durchgeführt, wobei zu beachten ist, daß oft nur die optische Reinheit des verbleibenden Epoxids angegeben wurde, weil die Extraktion des entstehenden hydrophilen Diols Schwierigkeiten bereitet. Tabelle 1.4 zeigt eine Auswahl wichtiger Umsetzungen unter Epoxidhydrolasekatalyse.

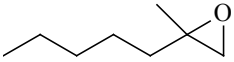
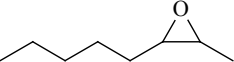
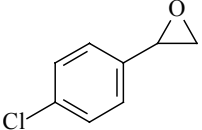
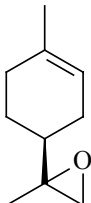
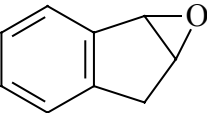
Verbindung	Enantioselektivität	Organismus	Literatur
	>100	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 11216	Mischitz et al., 1995
	91%ee	<i>Nocardia</i> sp. EH1	Kroutil et al., 1996
	>100	<i>Agrobacterium radiobacter</i> AD1 (rek.)	Spelberg et al., 1998
	98%de	<i>Aspergillus niger</i> LCP521	Chen et al., 1993
	98%ee	<i>Beauveria sulfurescens</i> ATCC 7159	Pedragosa-Moreau et al., 1996

Tabelle 1.4: Auswahl einiger Biotransformationen mit mikrobiellen Epoxidhydrolasen

1.2.3 α/β -Hydrolase fold

Bisher wurden 11 Strukturen von Lipasen aufgeklärt; bei allen wurde die sogenannte α/β -Hydrolasefaltung als Strukturmotiv (Ollis et al., 1992) gefunden. Diese besteht aus acht parallelen β -Faltblättern, welche von beiden Seiten von α -Helices umgeben sind. Abbildung 1.5 zeigt eine schematische Darstellung.

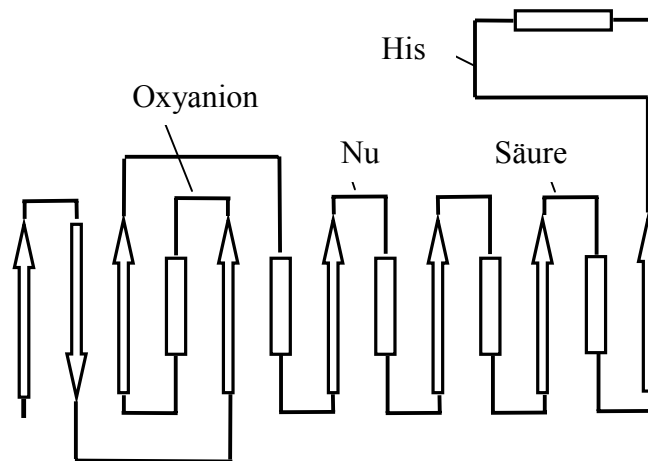


Abbildung 1.5: α/β -Hydrolasefaltung von Lipasen (Ollis et al., 1992). β -Faltblätter sind als Pfeile, α -Helices als Rechtecke dargestellt. Die Bereiche für den Acylrest (Säure), das Nukleophil (Nu) und die Oxyaniontasche (Oxyanion) sind ebenfalls eingezeichnet.

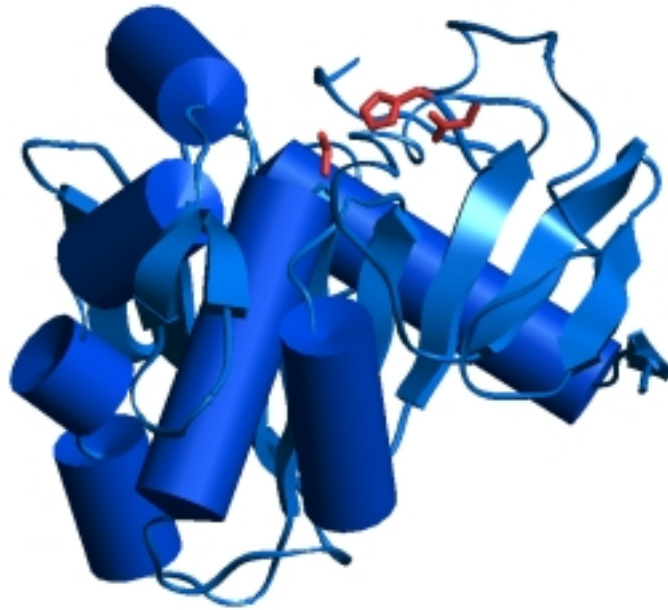


Abbildung 1.6: Strukturmodell der Lipase aus *Rhizomucor miehei*. Die β -Faltblätter werden durch neun Pfeile, die Helices durch Zylinder symbolisiert. Die Positionen der katalytischen Triade sind markiert (Derewenda et al., 1992).

Die α/β -Hydrolase Faltung findet sich in einer Vielzahl hydrolytischer Enzyme (Ollis et al., 1992) und wird (aus Homologieüberlegungen heraus) auch als Strukturmerkmal für die sequenzbekannten Epoxidhydrolasen postuliert (Borhan et al., 1995; Misawa et al., 1998; Rink et al., 1997). Der Reaktionsmechanismus der Lipasen entspricht dem der Serinproteasen (Cambillau und Tilbeurgh, 1993; Derewenda et al., 1992; 1994; Ransac et al., 1996). Bei Lipasen (s. Abbildung 1.7) wird der Substratester vom Serin des aktiven Zentrums unter Ausbildung eines tetrahedralen Intermediates angegriffen, nach Abspaltung des Alkohols entsteht das Acylenzym. Dieser Komplex wird durch die Aminosäuren der Oxyaniontasche, durch das Imidazol des Histidins und die Carboxylgruppe der Glutaminsäure stabilisiert. Dieser Komplex wird von einem Nukleophil angegriffen und es bildet sich ein zweites Intermediat, welches in Produkt und regeneriertes Enzym zerfällt.

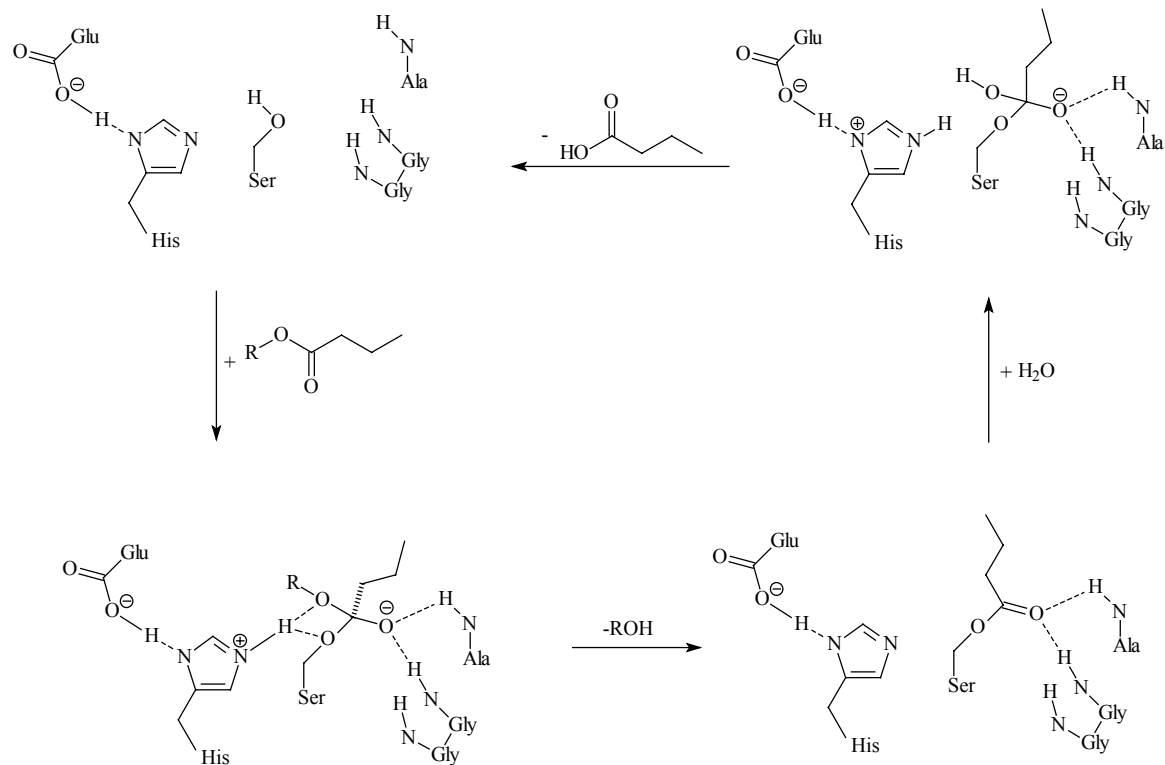


Abbildung 1.7: Reaktionsmechanismus von Lipasen am Beispiel der Hydrolyse eines Butyrates (Kazlauskas and Bornscheuer, 1998).

Einen ähnlichen Reaktionsmechanismus findet man auch bei der Epoxidhydrolase (s. Abbildung 1.8) (Arand et al., 1996, 1999). Hier greift das nukleophile Aspartat den Oxiranring an und es wird eine Esterbindung geknüpft. Im Gegensatz zum Lipasemechanismus stellt in diesem Fall aber das Enzym die Säuregruppe und das Substrat den Alkohol zur Verfügung. Auch dieser Übergangszustand wird von einem beteiligten Histidin, einer Asparaginsäure und einer (postulierten) Oxyaniontasche stabilisiert.

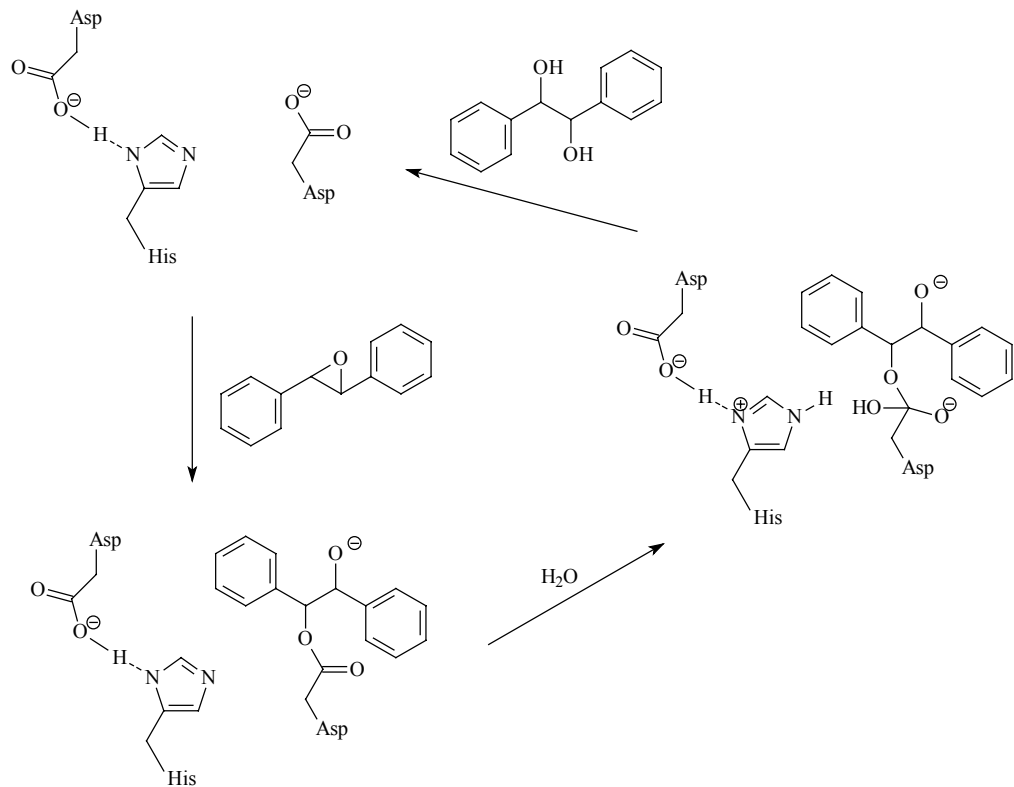


Abbildung 1.8: Aus Homologiebetrachtungen mit der Haloalkan-Dehalogenase abgeleiteter Reaktionsmechanismus der löslichen Epoxidhydrolase aus Ratte am Beispiel der Hydrolyse des *trans*-Stilben Oxides (Arand et al., 1996).

1.2.4 Sequenzhomologien

Die Struktur- und Mechanismushomologie der Epoxidhydrolasen, Lipasen, Esterasen und Dehalogenasen spiegelt sich auch in hohen Sequenzhomologien dieser α/β -Hydrolasefaltungsenzyme wieder (Archelas und Furstoss, 1998; Beetham et al., 1995). Einen Vergleich der zwei mikrobiellen Epoxidhydrolasen, der *Bacillus thermocatenuatus* Lipase und einer Haloalkandehalogenase zeigt Abbildung 1.9.

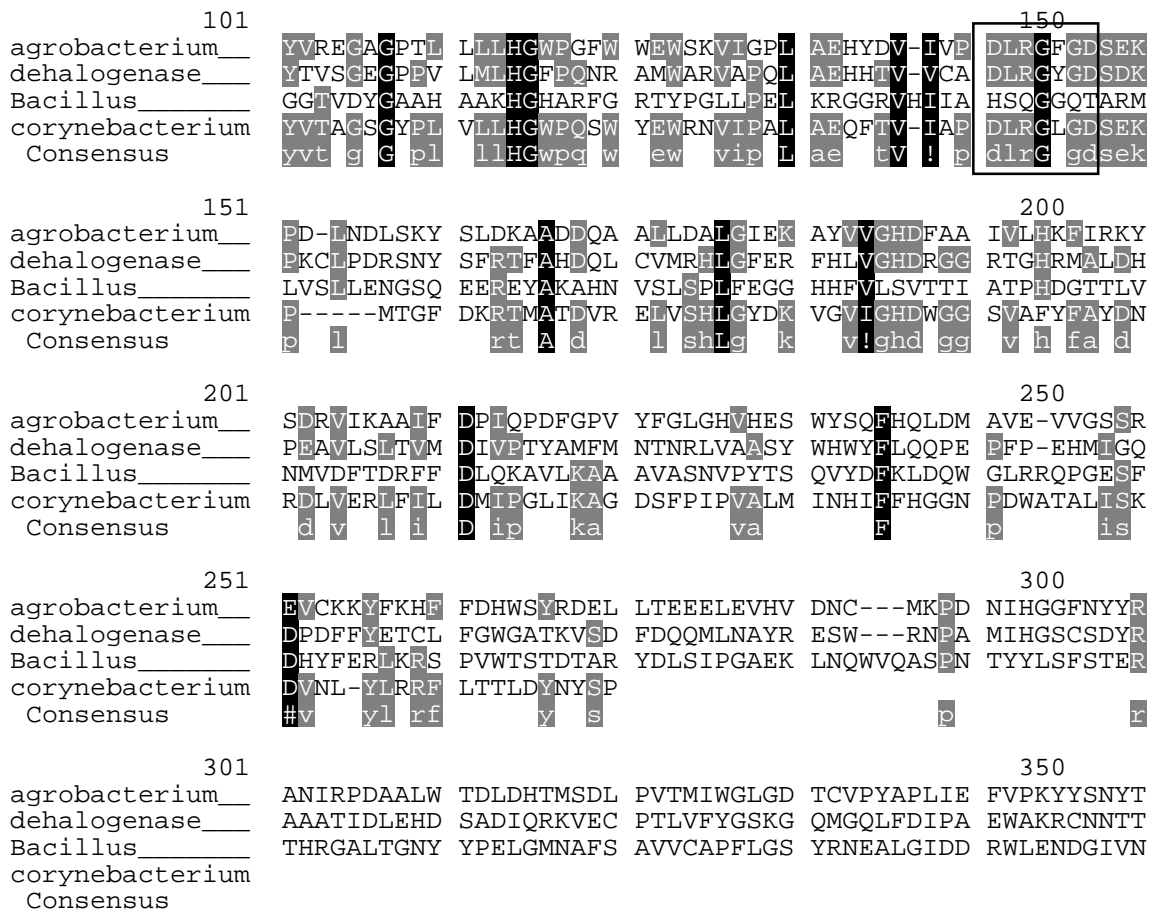


Abbildung 1.9: „Multiple Sequence alignment“ der mikrobiellen Epoxidhydrolasen aus *Corynebacterium* C12 (Misawa et al., 1998), *Agrobacterium radiobacter* AD1 (Rink et al., 1997), der homologen Dehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (Janssen et al., 1989) und der Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus* (Schmidt-Dannert et al., 1996) (erzeugt durch Multialign version 5.3.3. INRA France (Corpet, 1988)). Der Bereich um das katalytische Serin (resp. Aspartat) ist durch einen Kasten gekennzeichnet. Die Homologie zwischen der BTL2 der Dehalogenase beträgt 16%.

1.3 Proteinaufreinigung

Zur Charakterisierung von Proteinen sowie zu deren industriellen oder therapeutischen Einsatz, ist es wichtig, diese möglichst rein gewinnen zu können. Hierzu werden hauptsächlich chromatografische Verfahren eingesetzt.

Neben den klassischen Proteinaufreinigungsverfahren, wie der hydrophoben Interaktions- oder der Ionenaustauschchromatografie (Deutscher, 1990; Scopes, 1994), hat sich in den letzten Jahren die Affinitätschromatografie als einfache und effektive Aufreinigungsmethode etabliert. Bei ihr werden Antigene, Inhibitoren oder Cofaktoren an der Matrix immobilisiert, welche eine hohe Affinität zu dem aufzureinigenden Protein haben. Das zu reinigende Proteingemisch wird auf die Säule aufgetragen und alle nicht bindenden Proteine werden ausgewaschen. Durch Verdrängung des gebundenen Proteins durch besser bindende Liganden gelingt die Elution des gewünschten markierten Proteins.

1.3.1 Metallaffinitätschromatografie

Seit Ende der 70er Jahre (Porath et al., 1974) wird die Metallaffinitätschromatografie (Immobilized metal ion chromatography (IMAC)) als Werkzeug zur Aufreinigung rekombinanter Proteine verwendet, da bei diesen die Möglichkeit besteht mit gentechnischen Methoden Metallbindungsstellen einzuführen. Bei der Metallaffinitätschromatografie werden Metallionen, bevorzugt Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , aber auch Cd^{2+} oder Co^{2+} , an eine metallkomplexierende Matrix immobilisiert (die am verbreitetsten Matrices sind in diesem Zusammenhang Nitrilotriessigsäure (NTA) oder Imindiessigsäure) (Porath, 1992; Porath et al., 1974)). Anschließend wird das Proteingemisch aufgetragen und nicht bindendes Protein ausgewaschen. Die Elution des oder der am Metall gebundenen Proteine erfolgt entweder durch Zugabe von Imidazol oder durch Absenkung des pH-Wertes (s. Abbildung 1.10).

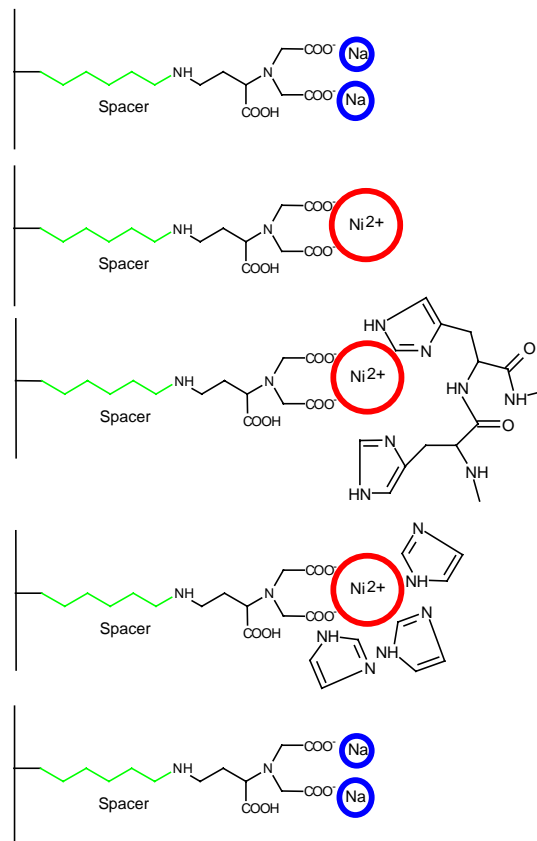


Abbildung 1.10: Prinzip der Metallaффinitätsaufreinigung. Nach Beladen der Matrix mit dem Metallion wird nicht gebundenes Nickel ausgewaschen und anschließend die Proteinprobe aufgetragen. Nur Proteine die eine hohe Affinität zum Metall aufweisen, beispielsweise solche mit einem (His)₆-Tag, werden gebunden und anschließend durch Imidazol oder durch Absenkung des pH-Wertes eluiert. Anschließend wird die Säule durch Komplexbildung des Metallions durch EDTA wieder regeneriert.

Der (His)₆- oder His-Tag, welcher von Hoffman La Roche patentiert ist (Hochuli et al., 1988), ist wohl das am weitesten verbreitete Affinitätspeptid. Eine Vielzahl von industriell oder pharmazeutisch wichtigen Proteinen wurden mit ihm aufgereinigt (s. Tabelle 1.5.).

Protein	
Interleukin 6	Spreno et al., 1994
HIV-reverse Transkriptase	Le Grice und Leitch-Gruninger, 1990
GAL4	Reece et al., 1993
Humaner Androgen Rezeptor	De Vos et al., 1994

Tabelle 1.5: Auswahl einiger wichtiger mit (His)₆ gereinigter Proteine

1.3.2 Metallaffinitätstags

Um einige Nachteile des (His)₆-Tags wie geringe Immunität, welche den immunologischen Nachweis von (His)₆ schwierig gestaltet, oder den nicht korrekten Prozessierungsabbruch bei C-terminaler Fusion, sowie patentrechtliche Beschränkungen zu umgehen, wurden in letzter Zeit eine Reihe neuer Metallaffinitätstags entwickelt. Die meisten der eingesetzten Fusionsoligopeptide enthalten aber nach wie vor die patentrechtlich geschützten zwei benachbarten Histidine (Hochuli et al., 1988; Patwardhan et al., 1997). Um eine bessere Bindung an Kupferionen zu erreichen, wurden „Phage Display Techniken“ (und Anreicherung der bindenden Phagen auf der Säule) angewendet (Patwardhan et al., 1997).

Der Ansatz der Metallaffinitätschromatografie ist nicht ausschließlich der Reinigung rekombinanter Proteine vorbehalten, auch natürliche (metallbindende) Proteine lassen sich mit dieser Methode finden und aufreinigen (Hutchens und Yip, 1992; Zhijian et al., 1996).

Ziel bei der Auffindung neuer Affinitätspeptide muß neben guten Bindungs- und Elutionseigenschaften eine möglichst kurze Sequenz und die optionale Abspaltbarkeit vom aufzureinigenden Protein sein.

Neben der Metallaffinitätschromatografie haben sich deshalb auch einige andere Fusionsproteine für die Proteinreinigung bewährt. Tabelle 1.6 zeigt eine Übersicht.

Tag	Sequenz	Matrix	Bemerkung	Literatur
StrepTag	WSHPQFEK	Streptactin		Schmidt et al., 1996; Voss und Skerra, 1997
HAT	KDHLIHNVHK EEHAHAHNK	Talon	Co ²⁺ , niedrige Affinität zu anderen Proteinen	Clontech
(His) ₆	(His) ₆	Ni-NTA		Hochuli et al., 1988
His-Patch ThioFusion	Thioredoxin	Thiobond	Höhere Löslichkeit der exprimierten Proteine in <i>E.coli</i>	La Vallie, 1993

Tabelle 1.6: Kommerziell erhältliche Peptide zur Proteinaufreinigung.

1.4 GFP als Reporter in der Biotechnologie

Das aus der Qualle *Aequoria victoria* stammende „green fluorescent protein“ (GFP) hat sich in kürzester Zeit als *das* Reporterprotein der Wahl, vor allen Dingen im pharmazeutisch-zellbiologischen Umfeld, etabliert.

GFP ist ein relativ kleines (30 kDa) monomeres Protein, erfordert keinerlei Cofaktoren oder Cosubstrate und ist schon in kleinsten Mengen hervorragend nachzuweisen. Seit der ersten Klonierung des GFP in *E. coli* (Chalfie et al., 1994) wurden dessen Eigenschaften und Anwendungsfelder intensiv untersucht (Prasher, 1995; Youvan und Michel-Beyerle, 1996).

Sowohl durch Zufallsmutagenese (Cramer et al., 1996) wie auch durch rationales Design (nach der Strukturaufklärung (Yang et al., 1996) (s. Abbildung 1.11)) gelang es, Varianten mit höherer Fluoreszenzausbeute (Heim und Tsien, 1996), anderen Emissions- und Extinktionsmaxima (Heim et al., 1994), kürzerer Lebensdauer (Deichsel et al., 1999) oder auch pH-Wert abhängiger Emissionswellenlänge (Robey et al., 1998) zu erhalten. Der Mechanismus, der auf die Delokalisierung von Elektronen über eine durch Oxidation erzeugte chinoide Struktur im Protein ermöglicht wird, wurde erst jüngst vollständig geklärt (Youvan and Michel-Beyerle, 1996).

Aufgrund der oben genannten Eigenschaften hält das GFP auch zunehmend Einzug in den Bereich der industriellen Biotechnologie, wo es zur Verfolgung von Proteinexpressionen (Albano et al., 1998) oder zur Kontrolle von Aufreinigungen genutzt wird (Poppenborg et al., 1997).

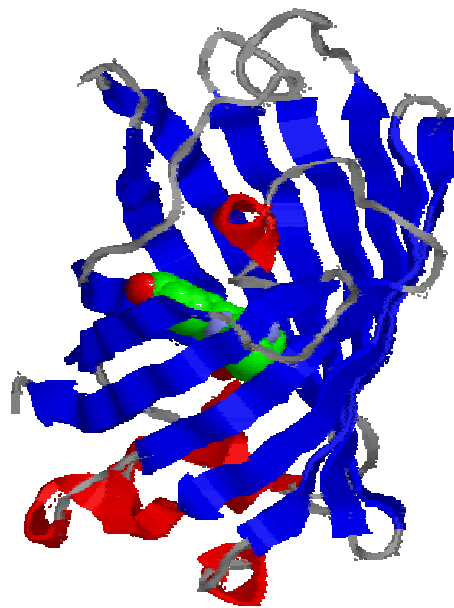


Abbildung 1.11: Struktur des gfp (Yang et al., 1996), die (einzigartige) Faltung von 12 β -Faltblättern wird als β -Barrel bezeichnet.

1.5 Zellsorter

Das Durchflußzytometer (s. Abbildung 1.12) wird zwar hauptsächlich im medizinisch-pharmazeutischen Umfeld (Nolan et al., 1999), beispielsweise für die Bestimmung von Protein-Ligand Wechselwirkungen (Nolan und Sklar, 1998) eingesetzt. Seit kurzem wird die Durchflußzytometrie aber auch für genetische Analysen eingesetzt (Kettman et al., 1998). In der Protein-Biotechnologie diente der Zellsorter bisher hauptsächlich der Anreicherung rekombinanter Proteine exprimierender (prokaryotischer) Zellen (Atkins und Izant, 1995; Sheen et al., 1995).

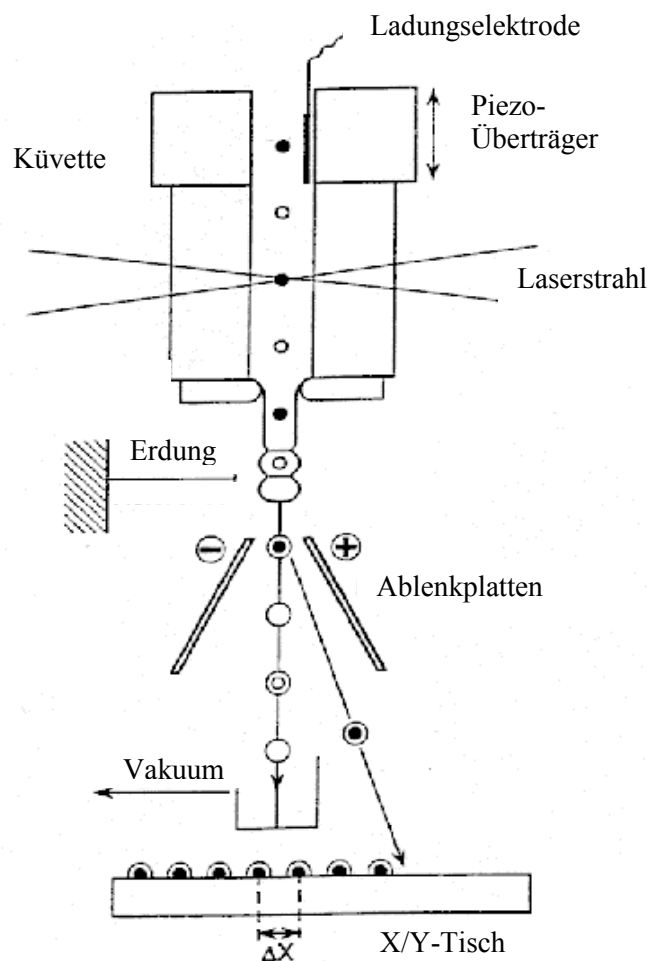


Abbildung 1.12: Funktionsskizze eines Durchflußzytometers mit Einzelzellablage. Der Flüssigkeitsstrahl wird durch die Ladungselektrode negativ aufgeladen. Ein Piezoelement fragmentiert durch sein Wechselfeld den Strahl in einzelne, gleichförmige Tropfen. Die Fluoreszenz und die Größe der im Tropfen enthaltenen Partikel wird beim Durchtritt durch einen Laserstrahl detektiert. Sind die gewünschten Parameter bezüglich Fluoreszenz und Größe erfüllt, wird der Tropfen durch Anlegen positiver Spannung aus dem Flüssigkeitsstrahl abgelenkt und auf Agar- bzw. Mikrotiterplatten in definierten Abständen abgelegt.

1.6 Streptomyceten

Streptomyceten gehören zur Gattung der Actinomyceten. Sie sind grampositive, obligat aerobe Bodenbakterien. Streptomyceten bilden sowohl ein Luftmycel als auch Lufthyphen (Sporophoren) von denen Konidien abgeschnürt werden, welche der Verbreitung dienen. Ein charakteristisches Merkmal der Streptomyceten ist der Geruch, der an frisch umgebrochene Erde erinnert.

Biotechnologisch sind Streptomyceten besonders aufgrund ihres komplexen Sekundärstoffwechsels interessant, der auch die meisten heute gebräuchlichen Antibiotika, wie z.B. Streptomycin (*S. griseus*) oder Chloramphenicol (*S. venezuela*), zur Verfügung stellt.

1.6.1 Enzyme aus Streptomyceten

Enzyme aus allen sechs Enzymklassen (Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Synthetasen) wurden bereits aus Streptomyceten isoliert und beschrieben (Peczynska-Czoch und Mordarski, 1988). Sie haben vor allem wegen deren Beteiligung beim Kompostierungsprozeß größeres Interesse gefunden. Cellulasen und Hemicellulasen werden wie die ligninabbauenden Enzyme vor allem in der papierverarbeitenden Industrie zur Bleichung eingesetzt (Viikari et al., 1991). Praktisch alle Makromoleküle abbauenden Enzyme werden von den Streptomyceten in das umgebende Medium abgegeben, hierfür verfügen sie über gut ausgebaute Sekretionsapparate.

1.6.2 *Streptomyces lividans* als Expressionsorganismus

Der für die heterologe Proteinexpression meistgenutzte Wirt ist, wahrscheinlich aufgrund seiner guten genetischen Zugänglichkeit, noch immer *E. coli*. Die Zellwände gram-negativer Organismen bestehen aber aus mehrschichtigen Strukturen und einer membranähnlichen äußeren Schicht, die sowohl die Proteinexpression ins Medium erschweren und auch in den meisten Methoden der Proteinaufreinigung unspezifisch an die diversen Matrices binden und somit die Reinigung erschweren (Brock und Madigan, 1988). Streptomyceten als grampositive Bakterien hingegen besitzen nur eine aus einer einzelnen Schicht Peptidoglycan

aufgebaute Zellwand, diese erlaubt die Sekretion in die Umgebung der Zellen. Die gute Durchlässigkeit verhindert auch die Bildung von Einschlusskörpern („inclusion bodies“).

Die Entwicklung von genetischen Werkzeugen, wie Vektoren oder Transformationsmethoden für Streptomyceten in den letzten Jahren, bereitete aber den Weg für die zunehmende Nutzung dieser Organismen für die homo- und heterologe Proteinexpression (s. Tabelle 1.7).

Protein	Herkunft	Ausbeute	Literatur
Aus grampositiven Organismen			
β-Lactamase	<i>Actinomadura</i> R39	302 mg/l	(Epicum et al., 1990)
Cellulase	<i>Bacillus subtilis</i>	5 U/ml	(Horinouchi et al., 1987)
Aus gramnegativen Bakterien			
Malat Dehydrogenase	<i>Thermus flavus</i>	Nicht angegeben	(Horinouchi et al., 1987)
Bakterielles Hämoglobin	<i>Vitreoscilla</i> sp.	Nicht angegeben	(Magnolo et al., 1991)
Aus Eukaryoten			
Interferon-α1	Mensch	1-2*10 ⁶ IU/ml	(Noack et al., 1988)
Interleukin-2	Mensch	200 U/ml	(Bender et al., 1990)
Hirudin	Blutegel	250-500 ng/ml	(Bender et al., 1990)
Proinsulin	<i>Macaca fascicularis</i>	20-100 mg/l	(Koller et al., 1989)

Tabelle 1.7: Auswahl einiger in *Streptomyces lividans* heterolog exprimierten Proteine

2 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Verfahren entwickelt werden, um durch Methoden der Zufallsmutagenese erzeugte Proteinbibliotheken auf deren veränderte Eigenschaften hin automatisiert zu untersuchen.

Hierzu mußte ein Verfahren entwickelt werden, welches die Vereinzelung von (mutierten) Klonen in Mikrotiterplatten erlaubt und dort zu einem möglichst homogenen Wachstums und Expressionsverhalten der Klone führt.

Das Potential der Zufallsmutagenese sollte am Beispiel der Generierung von Epoxidhydrolase-Aktivität in einer Lipase gezeigt werden. Zu diesem Zweck sollten in die Lipase zuerst durch Homologiebetrachtungen erhaltene rationale Mutanten eingeführt werden und diese durch Zufallsmutagenese verändert werden. Die erhaltene Proteinbibliothek sollte in Mikrotiterplatten vereinzelt und dort automatisiert auf Epoxidhydrolase-Aktivität hin untersucht werden.

Eine weitere Aufgabe bestand darin mit Hilfe der Zufallsmutagenese neue, kleine und effektive Metallaffinitätspeptide für die Metallaffinitätschromatographie zu entwickeln. Auch hier bestand die Aufgabe ein automatisierbares Assaysystem für eine, durch Zufallsmutagenese erzeugte, Peptidbibliothek zu entwickeln. Die Eignung der Metallaffinitätspeptide für die Proteinaufreinigung sollte anschließend noch bei der Aufreinigung industriell wichtiger Enzyme aus verschiedenen Expressionswirten gezeigt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Vereinzelnung von *E. coli*-Klonen durch FACS

3.1.1 Konstruktion des Vektors pCYTEXP1-BTL2-lacegfp

Das egfp-Gen wurde aus dem kommerziell erhältlichen Vektor (pegfp, Clontech Palo Alto USA) mit *PvuII* und *StuI* zusammen mit dem lac-Promotor herausgeschnitten und „blunt end“ in den durch *EcoRI* geschnittenen und mit Klenow-Fragment aufgefüllten, dephosphorylierten, die Lipase tragenden Vektor pCYTEXP1-BTL2 kloniert.

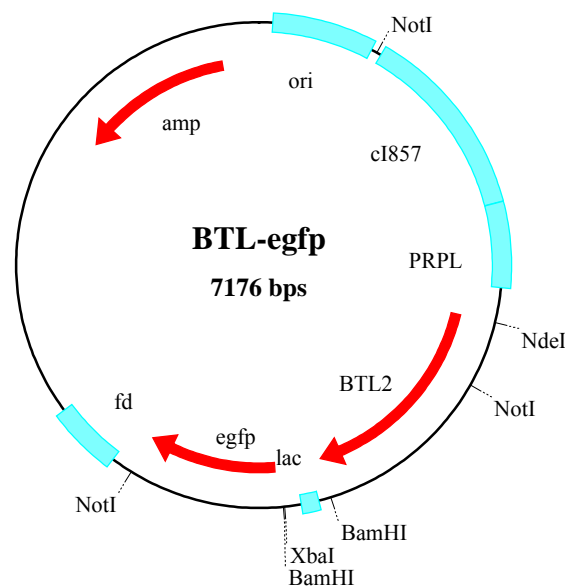


Abbildung 3.1: Der Vektor BTL-egfp zur Koexpression der Lipase BTL2 und des egfp. Die Induktion erfolgt im Falle der Lipase durch Hitzeschock und für das egfp durch IPTG (bzw. semi-konstitutiv in einem lac^q-negativen Stamm).

In DH5 α gelang die Koexpression beider Proteine, wobei das egfp unter Kontrolle des *lac*-Promotors semi-konstitutiv expremiert wurde, wohingegen die Induktion der Lipase durch einen Temperaturshift zu 42°C erfolgte (s. Abbildung 3.2).

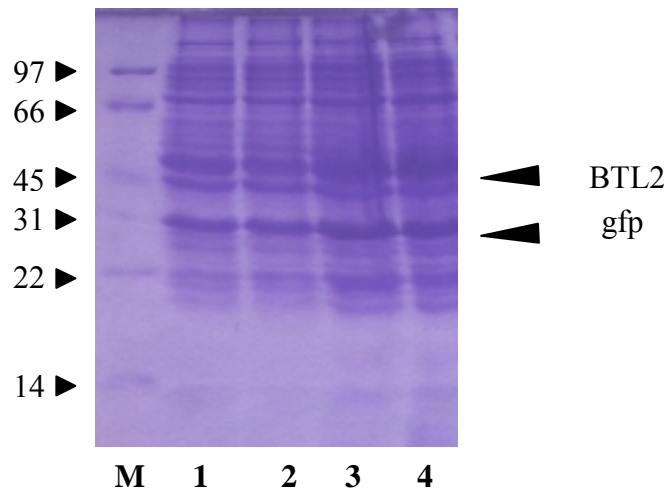


Abbildung 3.2: Koexpression von BTL2 und egfp in DH5 α Bahn 1: 1 Std; Bahn 2: 4 Std; Bahn 3: 5 Std (Temperaturshift zu 42°C); Bahn 4: 6 Std

3.1.2 Zufallsmutagenese des Plasmids pCYTEXP1P1-BTL2-lacegfp

Um eine möglichst große Anzahl von Mutanten erzeugen zu können, wurde der Mutationsstamm *Epicurian coli* XL1-Red verwendet (s. Abbildung 3.3, Material und Methoden).

Um die Mutationshäufigkeit abzuschätzen, wurden die DH5 α -Klone auf Tributyrin-Platten ausgebracht und bei 42°C induziert. Nach dem ersten Mutationszyklus produzierten 1-3% der Klone keine aktive Lipase mehr, nach dem siebten Mutationszyklus war die Rate auf 30% angestiegen. Sequenzierungen des 1,3 kB großen Lipasegens von sechs inaktiven Mutanten des ersten Zyklusses ergaben eine Mutationsfrequenz von einer Mutation in 1000 bp.

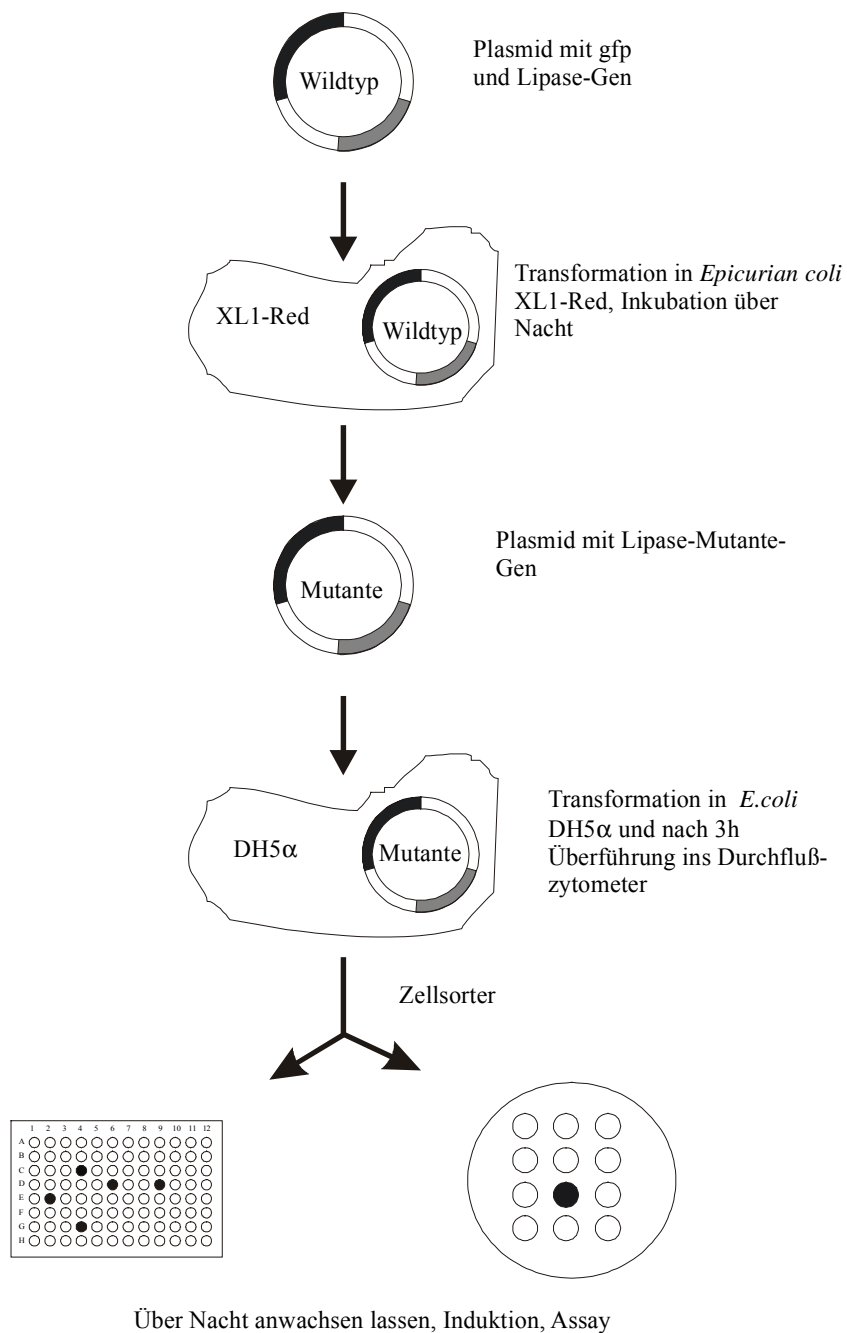


Abbildung 3.3: Einsatz des Mutationsstamms *Epicurian coli* XL1-Red zur Mutagenese des Plasmides (nach Enzelberger (Enzelberger, 1996)) und des Zellsorters zur Vereinzelung der das Plasmid tragenden Klone.

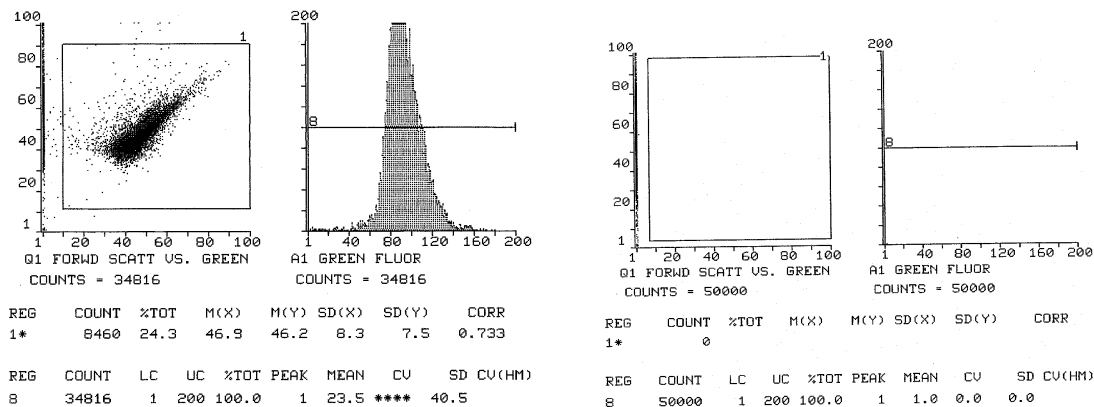
3.1.3 Durchflußzytometrie zur Vereinzelung der Mutanten

Um die mutierten Plasmide in definierten Abständen auf Agarplatten oder für komplexe Testsysteme in einzelnen Kompartimenten von Mikrotiterplatten abzulegen, wurde ein Durchflußzytometer mit Einzelzellablage verwendet.

Die Detektion transformierter Zellen sollte mittels der Fluoreszenz des semi-konstitutiv exprimierten eGFPs erfolgen. Es konnte gezeigt werden, daß *E. coli* Klone, die kein egfp-Gen tragen, unter den gewählten Bedingungen keine Fluoreszenz zeigten (s. Abbildung 3.4 B), daß aber praktisch alle Klone einer Übernachtskultur eGFP exprimierender Zellen positive Fluoreszenz aufwiesen, und mittels FACS detektiert und abgelegt werden konnten (s. Abbildung 3.4 A).

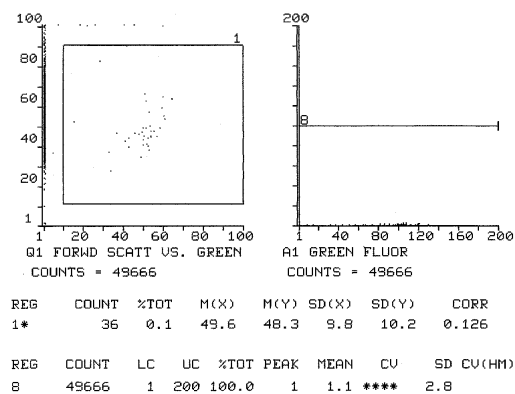
Für die Vereinzelung der transformierten Zellen wurden 50 ng der mutierten Plasmide (pCYTEXP1-BTL-lac-egfp) in DH5 α transformiert (s. Material und Methoden).

Für die Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für die Vereinzelung der Klone wurden halbstündlich Proben aus dem bei 37°C inkubierten Transformationsansatz entnommen, diese 1:100 verdünnt und in den Zellsorter überführt. Über zwei Stunden konnte weder eine Zunahme der Zellzahl noch das Auftreten von Fluoreszenz beobachtet werden. Bereits 2,5 Std nach der Transformation ließen sich fluoreszierende Klone detektieren (s. Abbildung 3.4 C), während die Zellzahl noch annähernd konstant war. Es konnte also davon ausgegangen werden, daß die Zellteilung noch nicht begonnen hatte und daß somit die einzelnen Mutanten unterschiedliche Plasmide tragen. Der Beginn der exponentiellen Wachstumsphase konnte 3 Std nach Transformation beobachtet werden. In $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden 30-50 fluoreszierende Klone detektiert und diese konnten auch vereinzelt werden. Aus einem Transformationsansatz mit 1,1 ml Volumen könnten somit ca. $8 \cdot 10^5$ Klone gewonnen werden.



A

B

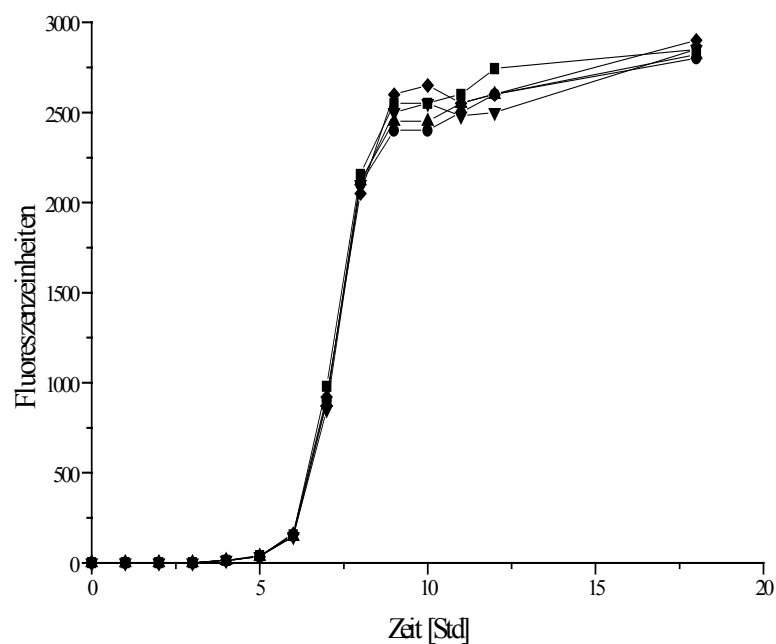
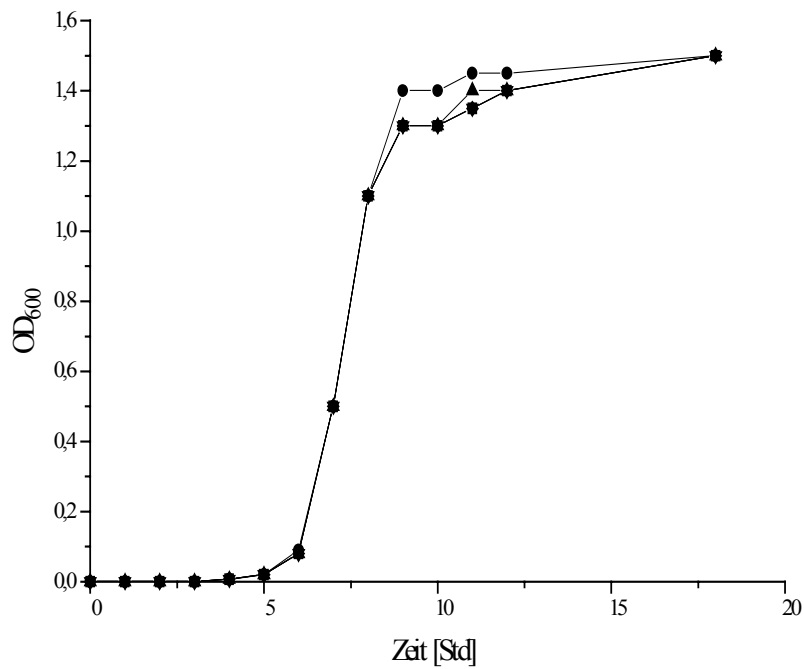


C

Abbildung 3.4: Histogramme der Sortierung von *E. coli*. **A:** Kontrolle mit Übernachtskultur pEGFP tragenden DH5 α (Verdünnung 1:100); **B:** Kontrolle mit pCYTEXP1-BTL2 tragenden DH5 α (Verdünnung 1:100); **C:** Transformationsansatz pCYTEXP1-BTL2-lac-egfp 2,5 Std nach TSS-Transformation in DH5 α . Auf der y-Achse ist jeweils die Größenausdehnung des Partikels (hier der Zelle), auf der x-Achse die Intensität der Fluoreszenz. „Counts“ gibt die Anzahl der ausgewerteten Zellen an. Das Sortierfeld erlaubt die Selektion auf das Eigenschaftenspaar Größe/Fluoreszenz. Jeder Pixel repräsentiert eine Zelle, die Absolutzahl der die gewählten Eigenschaften aufweisenden Zellen wird unter „Reg1*“ Count angegeben.

3.1.4 Wachstums- und Expressionsverhalten der vereinzelt Klone

Die Überlebensrate der Zellen nach dem Sortiervorgang lag bei 80-90%, wobei alle Überlebenden auch ein Plasmid trugen. Das Wachstumsverhalten der Zellen in einzelnen Mikrotiterplattenkompartimenten (s. Abbildung 3.5) oder auf Agarplatten (s. Abbildung 3.6) war praktisch identisch, gleiches wurde für die Aktivitäten der Lipase bzw. für die Fluoreszenz beobachtet (s. Abbildung 3.5).



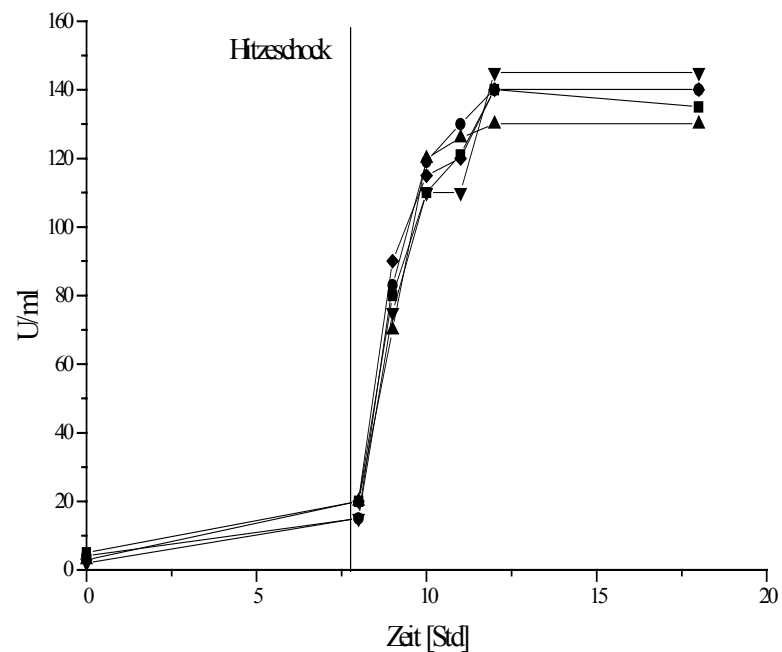


Abbildung 3.5: **A:** Wachstumskurven von *E.coli* DH5 α (pCYTEXP1-BTL2-lacgfp) **B:** Verlauf der egfp- **C:** bzw. Lipaseexpression (gegenüber pNPA). Bestimmt in fünf zufällig ausgewählten Mikrotiterplattenkompartimenten (C4, D6, D9, E2, G4) bei 37°C (Temperaturshift nach 7,5 h auf 42°C) und 300 U/min.

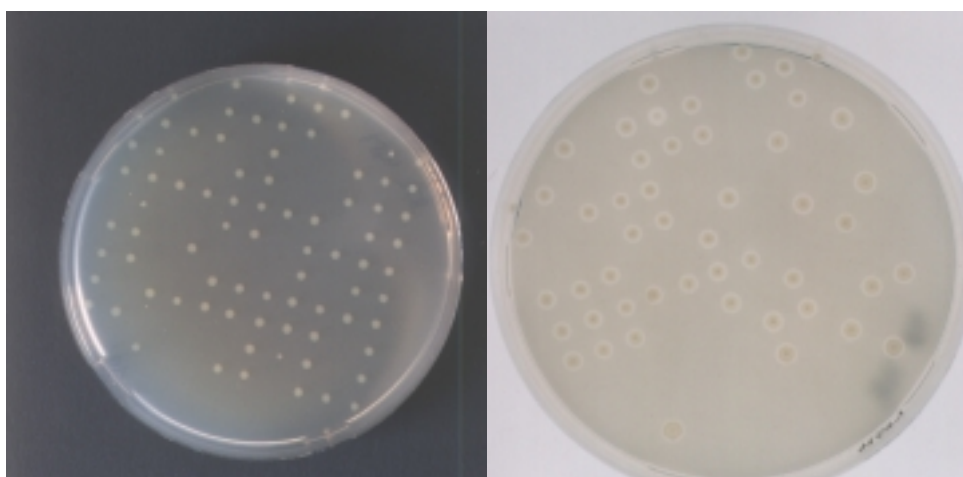


Abbildung 3.6: Ablage von *E.coli* DH5 α (pCYTEXP1-BTL2-lac-egfp) auf Agarplatten (links unter UV Licht); rechts auf Tributyrinplatten nach dreistündiger Inkubation bei 42°C

3.2 Versuche zur Generierung von Epoxidhydrolaseaktivität in der Lipase BTL2

3.2.1 Entwicklung eines Assaysystems

Bei allen Zufallsmutagenese-Experimenten kommt dem Assaysystem eine entscheidende Bedeutung zu, da möglichst viele Mutanten in kürzester Zeit auf die gewünschte Eigenschaft hin untersucht werden sollten.

Zu Beginn der Arbeit stand noch kein solches Assaysystem zum Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität zur Verfügung.

In Anlehnung an die Arbeiten zum Nachweis alkylierender Verbindungen mit Hilfe von *p*-(4-Nitrobenzyl)-Pyridin (NBP) (s. Abbildung 3.7) von Preussmann *et. al.* (Preussmann et al., 1969) wurde deshalb ein Filterpapierassay auf Epoxidhydrolaseaktivität entwickelt.

Dieser beruht auf der Ausbildung eines blauen Farbstoffes bei Zugabe von NBP zu alkylierenden Verbindungen.

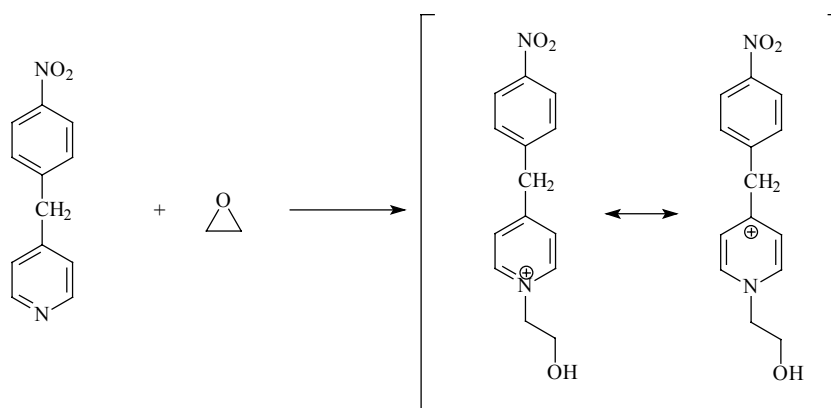


Abbildung 3.7: Reaktionsschema eines Oxirans unter Ausbildung eines blauen Farbstoffes, welcher unter Basenzugabe stabilisiert werden kann.

Um eine möglichst große Zahl von Mutanten direkt auf Agarplatten zu durchmustern, bot sich der Einsatz von Filterpapieren oder Membranen, auf welche die zu testenden Kolonien übertragen werden, an.

Hierzu wurde Filterpapier in eine Lösung von 1% (v/v) Styroloxid in Aceton getränkt und an der Luft getrocknet. Die Kolonien der Agarplatte wurden anschließend auf das Filterpapier übertragen und 30 min bei 37°C inkubiert. Der Nachweis des Epoxides erfolgte durch erneutes Tränken des Filterpapiers in 5% (w/v) NBP in Methoxyethanol und anschließende 30minütige Entwicklung bei 80°C. Die Epoxidhydrolase kann leicht an der Ausbildung farbloser Bereiche auf dem Filterpapier detektiert werden (s. Abbildung 3.8).

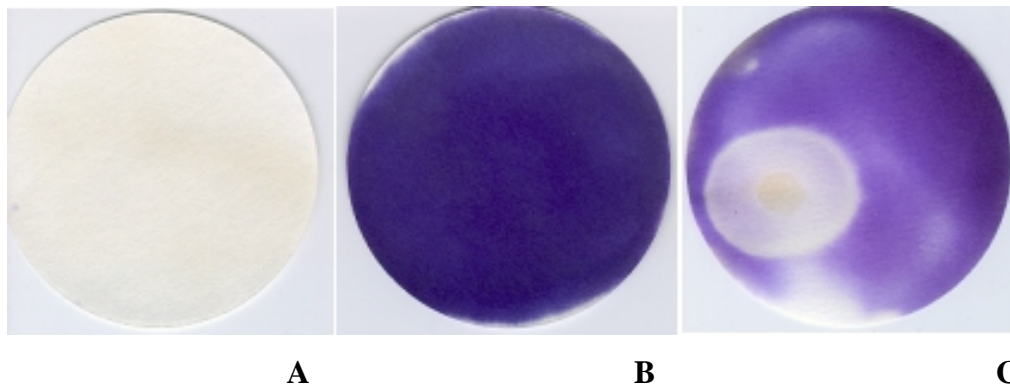


Abbildung 3.8: C: Nachweis (der bekannten) Epoxidhydrolase-Aktivität von *Rhodococcus* sp. NCIMB 11216 im Filterpapierassay; A: Kontrolle ohne Styroloxid; B: Kontrolle ohne Enzym

Aufgrund der relativ geringen Empfindlichkeit und der extrem hohen Toxizität der in diesem Assay offen gebrauchten Chemikalien, wurde der Assay von Zocher et al. 1999 zu einem Mikrotiterplattenassay verfeinert, welcher auch im weiteren Verlauf der Arbeit genutzt wurde (s. Material und Methoden). Der Hauptvorteil dieses Assaysystems lag in der Möglichkeit der photometrischen Auswertbarkeit der Farbstoff- bzw. der linear abhängigen Styroloxidkonzentration. Dies wurde durch die Solubilisierung des schwerlöslichen Niederschlages mit Hilfe von Triethylenglykoldimethylether erreicht.

3.2.2 Automatisierung des Assaysystems

In Zusammenarbeit mit F. Zocher wurde dieses Assaysystem auf einem Biomek 2000 SL-System automatisiert (s. Abbildung 3.9). Das automatische Pipettiersystem eröffnete die Möglichkeit jeden Klon bei vier verschiedenen Styroloxidkonzentrationen zu inkubieren und dennoch Durchsätze von 500 Klonen am Tag zu erreichen.

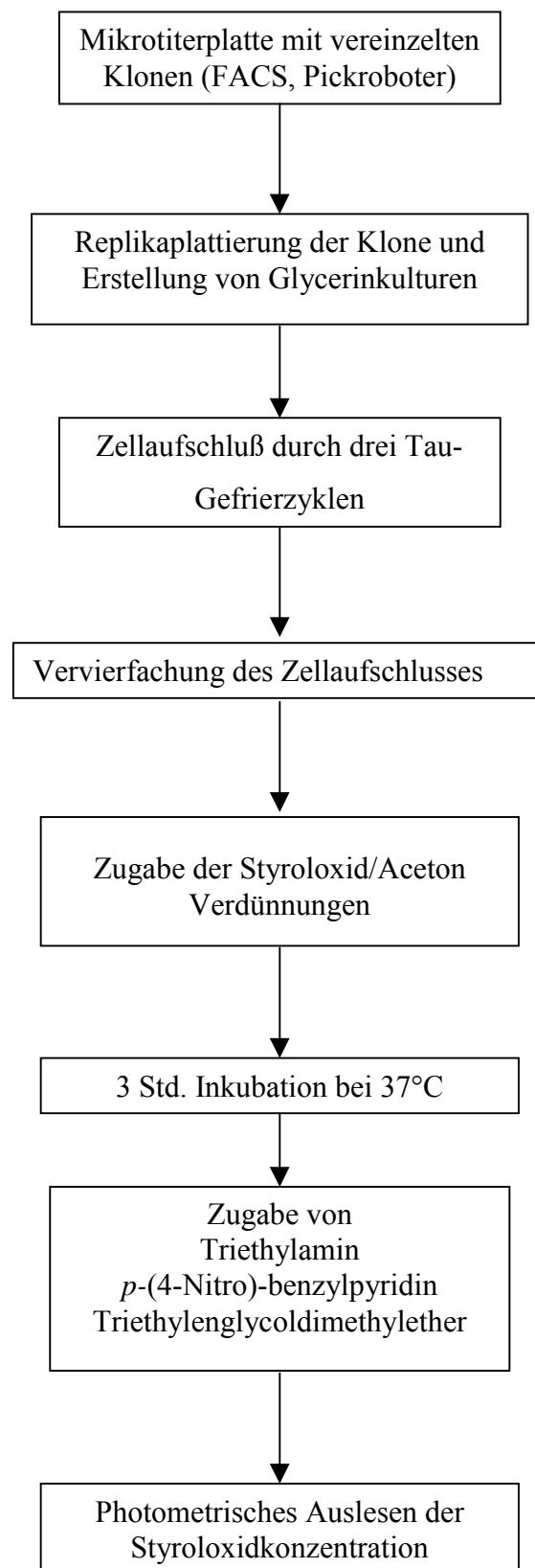


Abbildung 3.9: Ablaufschema des automatisierten Screenings nach Epoxidhydrolaseaktivität

3.2.3 Streptomyccetenstämme als Kontrolle für das Assaysystem

Zur Validierung des automatisierten Testsystems wurde in der Streptomyccetensammlung des Instituts für Mikrobiologie der Universität Tübingen Stammsammlungen nach Epoxidhydrolaseaktivitäten gesucht. Einige der untersuchten Stämme zeigten im Farbstoffassay Epoxidhydrolaseaktivität (s. Abbildung 3.10). Zur Kontrolle des Testsystems wurden mit den positiv erscheinenden Stämmen Tü27 und Tü495 Biotransformationen von Styroloxid durchgeführt.

Tabelle 3.1 zeigt die Ergebnisse.

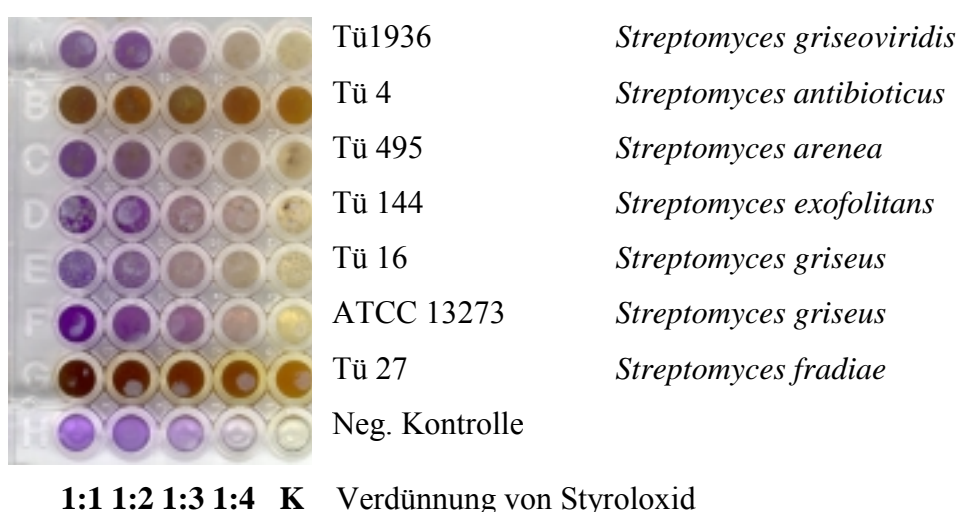


Abbildung 3.10: Verhalten verschiedener Streptomycceten im NBP Mikrotiterplattenassay. Die Streptomycceten Stämme Tü4, Tü27 und Tü495 zeigen detektierbare Aktivität gegen Styroloxid.

Stamm	ee _{Styroloxid} [%]	ee _{Diol} [%]	Umsatz [%]	Zeit [Std]
<i>S. fradiae</i> Tü27	6	28	18	24
	70	23	75	48
<i>S. areanae</i> Tü495	52	38	60	24
	70	13	85	48

Tabelle 3.1: Racematspaltung von Styroloxid mit verschiedenen Streptomyccetenstämmen.

Die enantioselektive Hydrolyse zeigte klar das Vorhandensein von Epoxidhydrolaseaktivität an, allerdings sind die erreichten Stereoselektivitäten für einen präoperativen Einsatz nicht geeignet.

Das Assaysystem konnte aber somit validiert werden und scheint für das automatisierte Screening nach Epoxidhydrolase Aktivität geeignet.

3.2.4 Einführung von Rationalmutanten

Für alle Zufallsmutagenese Experimente gelten die Voraussetzungen, daß das zu mutierende Gen in ausreichender Menge in einem gut transformierbaren Wirtstamm aktiv exprimiert werden kann. Die Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus* erfüllt all diese Forderungen, es ist leicht ohne Helferproteine mit hoher spezifischer Aktivität in *E. coli* produzierbar und scheint deshalb für Zufallsmutagenese-Experimente gut geeignet.

Die erfolgreiche „Umwidmung“ der Lipase BTL2 in eine Epoxidhydrolase sollte mittels der Umsetzung von Styroloxid nachgewiesen werden. Bedingung für eine Umsetzung ist natürlich, daß das Substrat geometrisch in die Bindungstasche des Enzymes paßt. Aus der Arbeit von Zocher, 1999 ist bekannt, daß das sterisch ähnliche α -Phenylethanol mit guter Aktivität und hoher Stereoselektivität umgesetzt wird, deshalb schien auch diese Voraussetzung erfüllt.

Um dem veränderten katalytischen Mechanismus Rechnung zu tragen, wurden in das Gen der Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus* zwei Rationalmutanten eingeführt. Der Austausch des katalytischen Serins (S147) durch Aspartat erklärte sich sowohl durch den Reaktionsmechanismus (s. Einleitung 1.2.3) wie auch durch Homologiebetrachtungen (s. Einleitung 1.2.4). Die Einführung des Aspartats erfolgte über die Quick Change Methode mit den Primern BTLASP1 und BTLASP2 (s. Material und Methoden).

Die erhaltene Mutante konnte im Vektor pCYTEXP1-BTL2-Asp exprimiert werden (s. Abbildung 3.11), zeigte aber weder bei gaschromatografischer Analyse noch im Farbstoffassay hydrolytische Aktivität auf Styroloxid. Die Lipaseaktivität war erwartungsgemäß praktisch vollständig verschwunden.

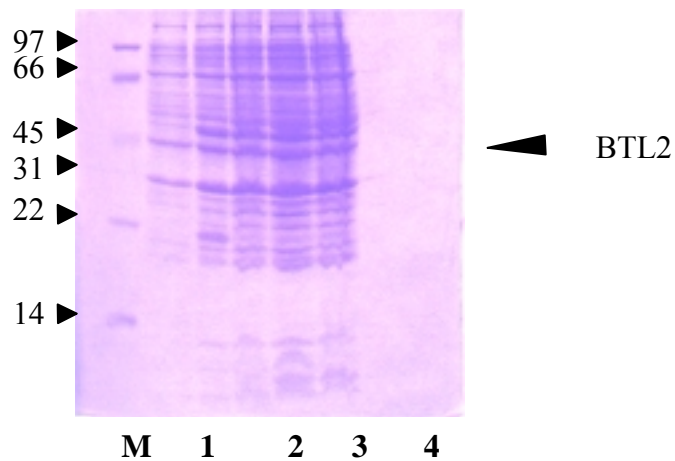


Abbildung 3.11: Expression der Mutante BTL2-Asp; 1: vor Induktion; 2: 2 Std. nach Induktion; 3: 3 Std. nach Induktion; 4: 4 Std. nach Induktion

Eine zweite Mutation in der Umgebung der Oxyaniontasche wurde aufgrund von Homologiebetrachtungen (s. Abbildung 3.12) eingeführt. Hier versagte die Methode des Quick Change. Die Mutation wurde deshalb mit der Drei-Primer-Methode mit Hilfe der Primer SDM1, SDM2, SDM3 und BTLPRO (s. Material und Methoden) in das Plasmid pCYTEXP1-BTL-Asp-Pro eingeführt. Das Protein konnte exprimiert werden, zeigte aber wiederum keine hydrolytischen Eigenschaften gegenüber Styroloxid.

Bacillus thermocatenuatus	: -VLLHGFTG-
Pseudomonas cepacia	: -ILVHGLTG-
mEH	: -LMVHGWP-
dehalogenase	: -LCLHGPT-

Abbildung 3.12: Homologe Region der Oxyaniontasche

3.2.5 Zufallsmutagenese der Rationalmutanten

3.2.5.1 Zufallsmutagenese durch error-prone PCR

Sowohl die Einfach-, wie die Doppelmutter wurden einer error-prone PCR (s. Material und Methoden) unterworfen, um dadurch Epoxidhydrolasefähigkeiten zu generieren.

Die durch die Primer er1 und er2 unter error-prone Bedingungen erzeugten Produkte (s. Abbildung 3.13) wurden geleluert, mit *Bam*H1/*Nde*I gespalten und in den identisch gespaltenen Vektor pCYTEXP1 ligiert.

Von beiden Rationalmutanten wurden 3000 Zufallsmutanten von Hand in Mikrotiterplatten überführt, dort kultiviert, repliziert und aufgeschossen. Im anschließenden automatisierten Assay konnte jedoch keinerlei Aktivität gegen Styroloxid festgestellt werden.

Zur Kontrolle der Mutationseffizienz wurde auch der Lipase-Wildtyp mutiert. 20-40% der Lipasemutanten zeigten keine Hofbildung mehr gegenüber Tributyrin. Die Sequenzierung von sechs Klonen ergab eine Mutationseffizienz von zwei Mutationen pro 1000 Basenpaaren.

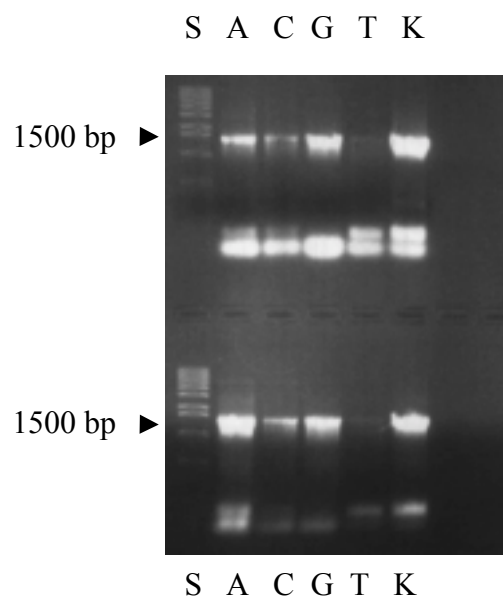


Abbildung 3.13: Gelelektrophorese der error-prone PCR-Produkte der Gene BTL-Asp (obere Reihe) und BTL-Asp-Pro (unten). (A,C,G,T geben das Nukleotid an, welches im Unterschuß eingesetzt wurde, K ist die Kontrolle unter nicht fehlerhaften Bedingungen).

3.2.5.2 Zufallsmutagenese durch den Mutationsstamm *Epicurian coli XLI-Red*

Die Aspartat-Mutante wurde analog dem Lipase-Wildtyp in einen egfp-Reportervektor (pCYTEXP1-BTL2Asp-*lac*-egfp) umkloniert und, wie in Abschnitt 3.1.2 und 3.1.3 für den Lipase-Wildtyp beschrieben, einer Zufallsmutagenese unterzogen. Auch hier wurden 3000 Klone mit dem Zellsorter vereinzelt und mittels des NBP-Assays (s. Material und Methoden) untersucht. Es wurden wiederum keine Mutanten gefunden, welche Epoxidhydrolaseaktivität gegenüber Styroloxid zeigten.

3.3 Entwicklung eines neuen Metallaffinitätspeptides für die Proteinaufreinigung

3.3.1 Natürliche Metallbindungsstelle des Humanpathogens *Helicobacter pylori*

Das Humanpathogen *Helicobacter pylori* ist wahrscheinlich die Hauptursache für chronische Gastritis (Doolittle, 1997).

Um in der sauren Umgebung des Magens zu überleben, siedelt sich *H. pylori* in den Darmzotten an und bedient sich zur weiteren Pufferung des ihn umgebenden Mediums einer nickelabhängigen Urease (Labigne und de Reuse, 1996). Das hierfür benötigte Ni^{2+} wird durch „Ionenpumpen“ in Form einer transmembralen P-Type-ATPase (HP791) (Melchers, 1996) ins Zellinnere transportiert. Um eine ausreichende Versorgung mit Ni^{2+} sicherzustellen, muß das Enzym über eine effektive Metallbindungsstelle verfügen.

Um die Akkumulation toxischer zweiwertiger Ionen (insbesondere Kupfer) zu vermeiden, werden auch ATPasen benötigt, welche den Export dieser Metalle katalysieren (s. Tabelle 3.2).

Nomenklatur	Nomenklatur	Metallbindungsstelle	Bindung
Doolittle, 1997	Schäfer, 1997		
P-Type ATPase HP791	ATPase 439	HxHxxxCxxC	Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}
P-Type ATPase HP 1503	ATPase 115	CxxC	Cu^{2+}
P-Type 948copAP	ATPase copA	CxxC	Cu^{2+}

Tabelle 3.2: Nomenklatur, Metallbindungsmotiv und gebundene Metallionen der bekannten P-Typ-ATPasen aus *Helicobacter pylori*.

3.3.2 Zufallsmutagenese der Metallbindungsstelle einer ATPase von *Helicobacter pylori*

Um die Metallbindungsstelle der ATPase HP791 für die Proteinaufreinigung zu optimieren, wurde wiederum auf die Methoden der Zufallsmutagenese zurückgegriffen. Um den Sequenzraum möglichst umfassend abzudecken und die Zahl der Mutanten in einem überschaubaren Rahmen zu halten, wurde die Methode der degenerierten Oligonukleotide

eingesetzt (s. Abschnitt 1.1.1). Es wurden Primer (gfpwobble1, gfpC s. Material und Methoden) verwendet, welche die Aminosäuren des Bindungsmotivs konservierten, die dazwischen liegenden aber variierten. Bei sechs unbestimmten Aminosäuren ergeben sich theoretisch $3 \cdot 10^9$ verschiedene Tag-Varianten.

3.3.3 GFP als Reporterprotein für die Bindungseigenschaften verschiedener Metallaffinitätspeptide

Es konnte gezeigt werden, daß der Proteingehalt an GFP mit der Fluoreszenzintensität über einen weiten Bereich linear korreliert (s. Abbildung 3.14). Die Fluoreszenz war im Bereich pH 6-9 vom pH-Wert (pH 5,5-10 (Ward und Bokman, 1982)) unabhängig und Imidazol beeinflusste die Fluoreszenz bis zu einer Konzentration von 0,3 M nicht. Diese Eigenschaften ließen das GFP als Reporterprotein für die Metallaffinitätsaufreinigung sinnvoll erscheinen, da die in den einzelnen Aufreinigungsfractionen meßbaren Fluoreszenzen mit dem Proteingehalt korrelierbar sind.

Um die Bindungs- und Elutionseigenschaften der Metallaffinitätspeptid-Varianten zu untersuchen, wurden die Mutanten mittels PCR an das GFP fusioniert und in den Expressionsvektor egfp zurückkloniert (s. Abbildung 3.15).

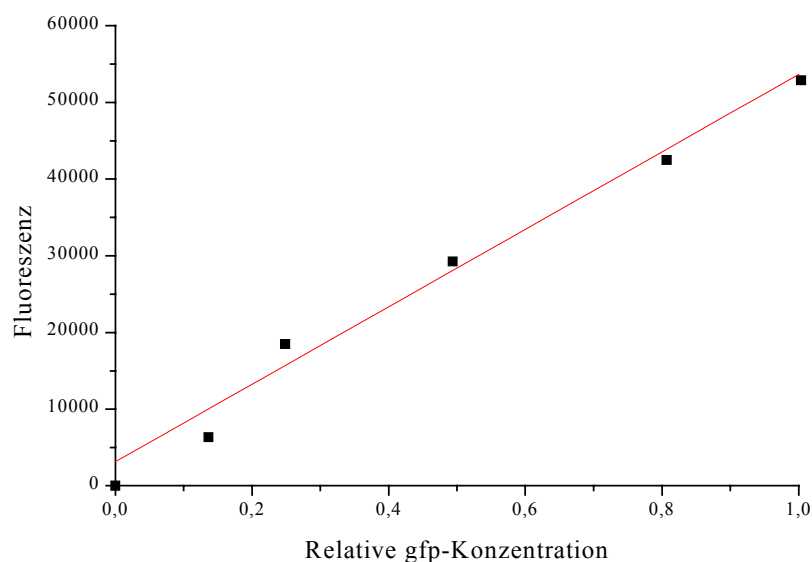


Abbildung 3.14: Abhängigkeit der Fluoreszenz von der GFP-(Protein)-Konzentration

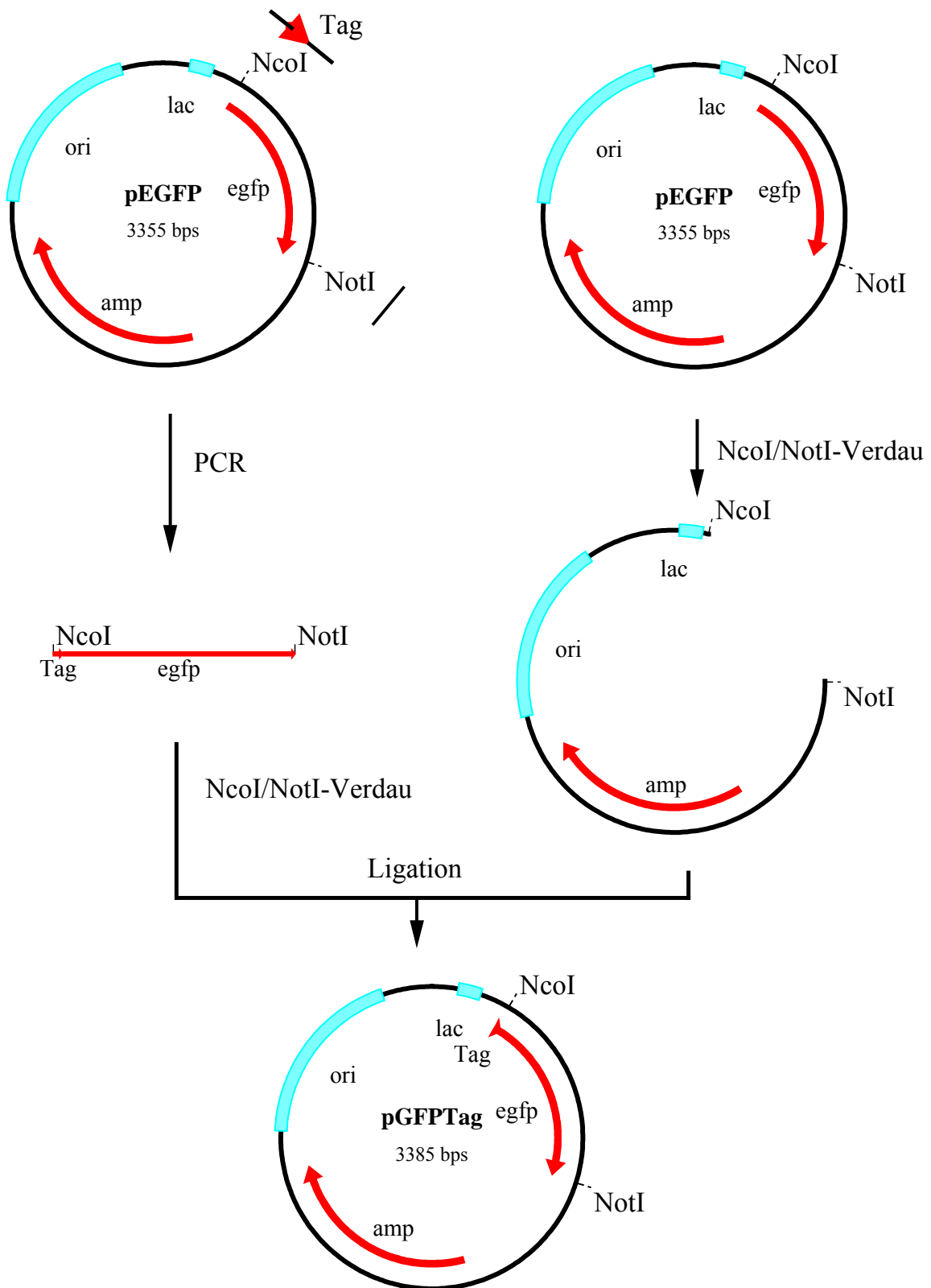


Abbildung 3.15: Fusion der Peptidbibliothek (Tag = HxHxxxCxxC), des (His)₆ (Tag = HHHHHH) und eines Wildtyp-Bindungsproteins (Tag = HIHALACPAC) an das eGFP.

3.3.4 Sequenzierung und Evaluierung der Klone

Um die Qualität der Zufallsmutagenese zu kontrollieren, wurden einige zufällig ausgewählte Klone sequenziert (s. Tabelle 3.3). Abbildung 3.16 zeigt, daß es mit der Methode der degenerierten Primer gelingt, den möglichen Sequenzraum abzudecken, wobei aufgrund der Degeneration des genetischen Codes natürlich keine Gleichverteilung, sondern ein typisches Verteilungsmuster gefunden wird (s. Abbildung 3.16). Mit dieser Methodik werden naturgemäß auch Stop Codons gemäß ihres statistischen Auftretens eingeführt.

Bezeichnung	Sequenz
A1	His-Gly-His-Met-Glu-Arg-Cys-Leu-Val-Cys
A2	His-Lys-His-Ala-Arg-Ser-Cys-Met-Gly-Cys
A3	His-Phe-His-Thr-Val-Phe-Cys-Phe-Ser-Cys
A4	His-Arg-His-Arg-Gly-Met-Cys-Thr-Ala-Cys
A6	His-Gln-His-Glu-Gly-Arg-Cys-Lys-Glu-Cys
A8	His-Cys-His-Pro-Glu-Leu-Cys-stop-Leu-Cys
M3	His-Asp-His-Glu-Arg-Leu-Cys-His-Asn-Cys-
M4	His-Asn-His-Arg-Tyr-Gly-Cys-Gly-Cys-Cys-
M14	His-Ser-His-Ser-Val-Gly-Cys-Phe-Phe-Cys
M15	His-Gly-His-Thr-Leu-Ser-Cys-Gly-Leu-Cys
M16	His-Ser-His-stop-Leu-Arg-Cys-Lys-Gly-Cys
Z5	His-Arg-His-Gly-Thr-Asn-Cys-Leu-Lys-Cys-
Z7	His-Ile-His-Gln-Ser-Asn-Cys-Gln-Val-Cys
Z8	His-Lys-His-Val-Asp-His-Cys-Gly-Arg-Cys
Z9	His-Ser-His-Leu-Thr-Leu-Cys-Leu-Gly-Cys
Z10	His-Thr-His-Gln-Ser-Gln-Cys-Gly-Arg-Cys
Z11	His-Thr-His-Ala-Ser-Gly-Cys-stop-stop-Cys
Z13	His-Cys-His-Pro-Trp-Cys-Cys-Asn-stop-Cys

Tabelle 3.3: Auswahl einiger sequenzierter Peptidtags zur Bestimmung der Verteilung der Mutationen

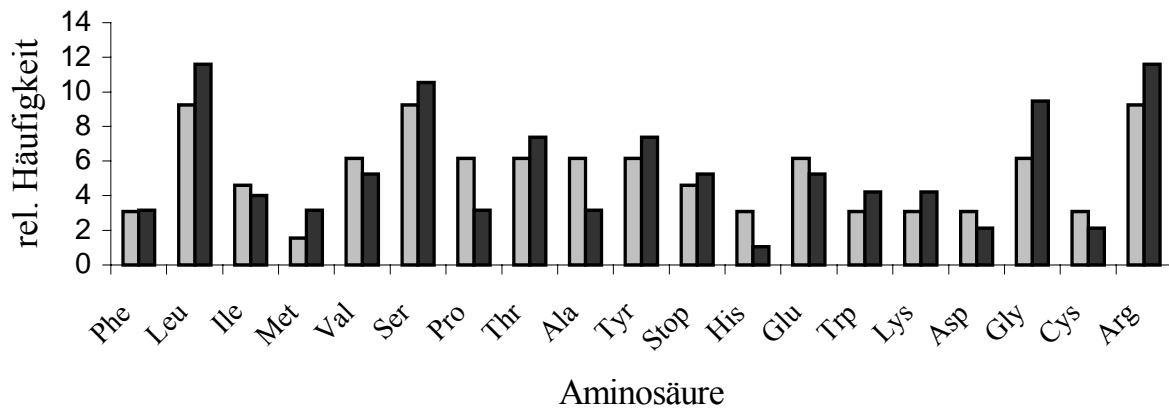


Abbildung 3.16: Vergleich der (aufgrund der Degeneration des genetischen Codes) erwarteten und der beobachteten Häufigkeitsverteilung

3.3.5 Entwicklung eines automatisierten Assaysystems für das Hochdurchsatzscreening

Zum Durchmustern dieser großen Mutantenbibliotheken wurde wieder ein automatisiertes Assaysystem in Mikrotiterplatten entwickelt. Die einzelnen Mutanten wurden mit dem Pickroboter in einzelne, mit Nährmedium gefüllten „wells“ einer Mikrotiterplatte transferiert. Nach achtstündiger Kultivierung wurde eine Replikplatte erstellt und die Zellen durch drei Tau-Gefrierzyklen aufgeschlossen. Die Zellfragmente wurden mittels Zentrifugation sedimentiert und der (fluoreszierende) Überstand mit Hilfe eines Laborroboters in eine neue Platte überführt. Nach Bestimmung der Ausgangsfluoreszenz wurde der Überstand auf eine Filterplatte aufgebracht, welche mit Ni-beladener „Chelating Sepharose“ gefüllt war. Durch erneutes Zentrifugieren konnte das fusionierte GFP an das Säulenmaterial binden. Nach Waschschrinen, die durch Pufferzugabe und wiederholtes Zentrifugieren der Filterplatten realisiert wurden, konnte das Protein durch Imidazolzugabe in eine Mikrotiterplatte eluiert und die Fluoreszenz erneut gemessen werden (s. Abbildung 3.17).

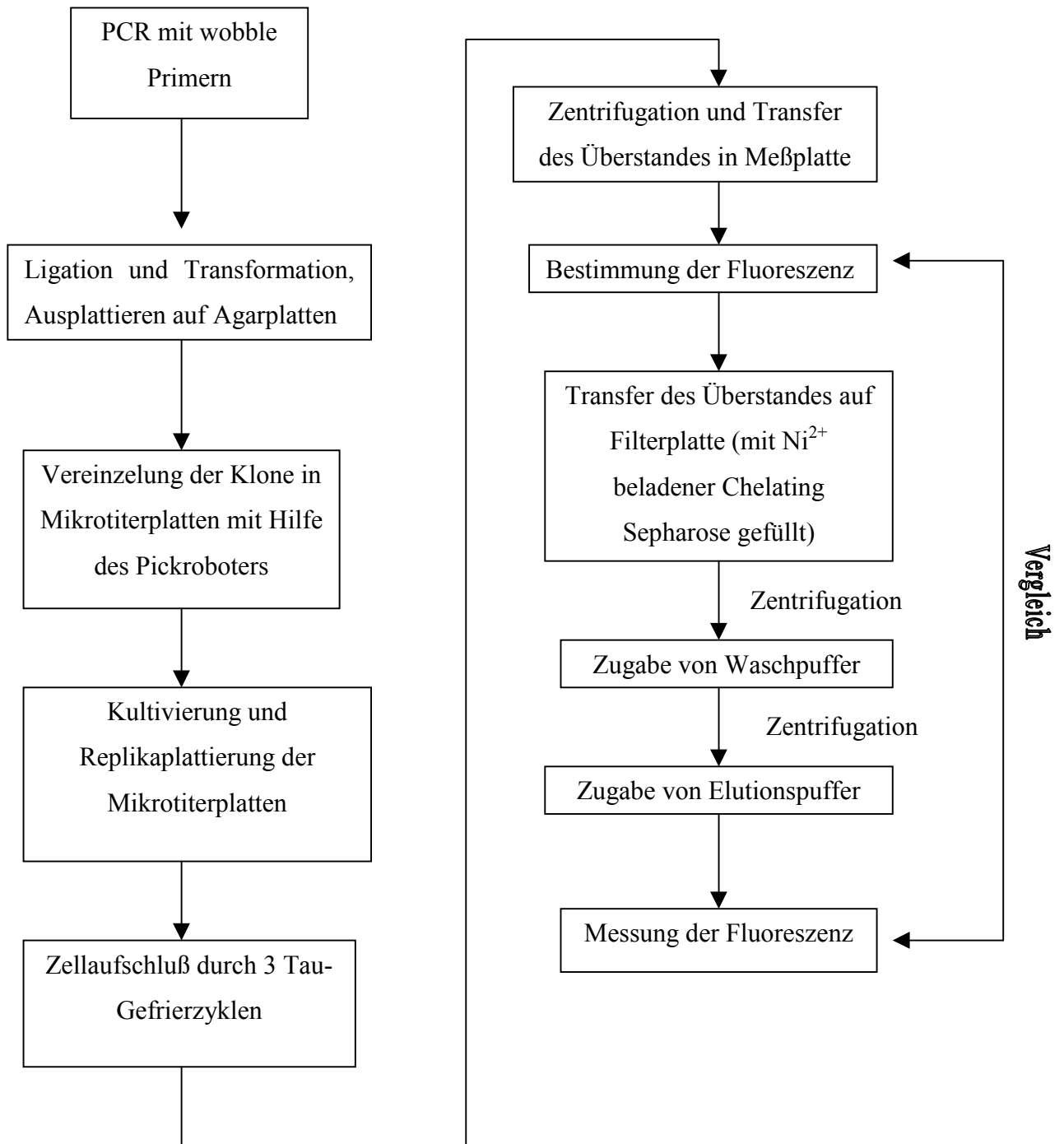


Abbildung 3.17: Flußschema für das Auffinden neuer Metallaffinitätspeptide im Hochdurchsatzscreening.

Der Einsatz des Mikrotiterplattenassays ermöglichte die simultane Bestimmung der Bindungs- und Elutionseigenschaften von 96 Affinitätspeptiden (s. Abbildung 3.18).

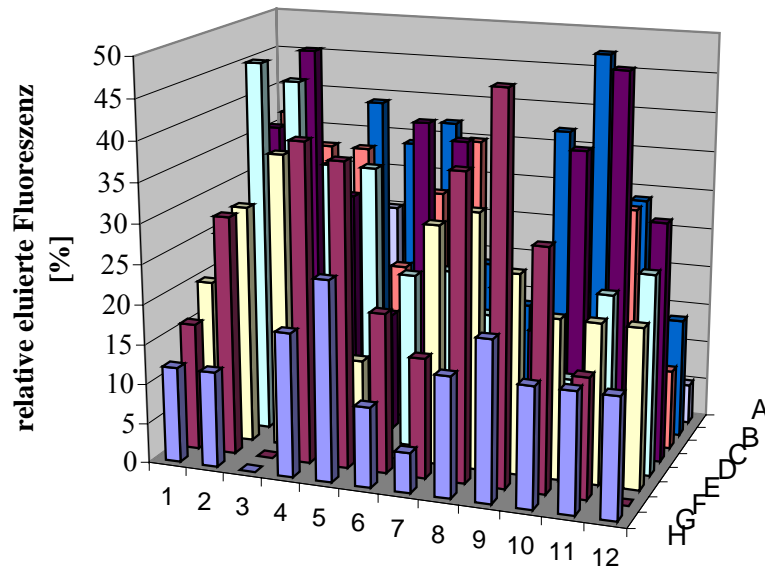


Abbildung 3.18: Beispielhafte Verteilung des Eluatsanteils bezogen auf die gesamte aufgetragene Fluoreszenz. (Es fällt auf, daß die Randbereiche generell schlechtes Elutionsverhalten zeigen, die Proben wurden deshalb nicht weiter untersucht.)

Durchschnittlich konnten zwischen 30-40 Prozent der Fluoreszenz zurückgewonnen werden. Im Vorscreening wurden aber auch Klone identifiziert, die eine deutlich höhere Ausbeute zeigten. So konnte bei Klon M13 eine Rückgewinnung der Fluoreszenz von ca. 60% und bei Klon A14 von über 50% beobachtet werden. Diese Klone wurden nun mit einigen anderen, zufällig ausgewählten Klonen einer genaueren Charakterisierung in Spin-Präp-Säulen (Qiagen) unterzogen.

3.3.6 Charakterisierung einiger Klone mit Ni-NTA Spin-Präp-Säulen

Für eine genauere Quantifizierung der Bindungseigenschaften verschiedener Peptidsequenzen wurden die Klone im 50 ml Maßstab kultiviert und in Qiagen Ni-Spin-Präp Säulen aufgereinigt. Abbildung 3.19 zeigt, daß verschiedene Peptidsequenzen unterschiedliche Bindungs- und Elutionseigenschaften zeigten. Dies ermöglicht die individuelle Anpassung der Affinitätspeptide an das spezifische Reinigungsproblem.

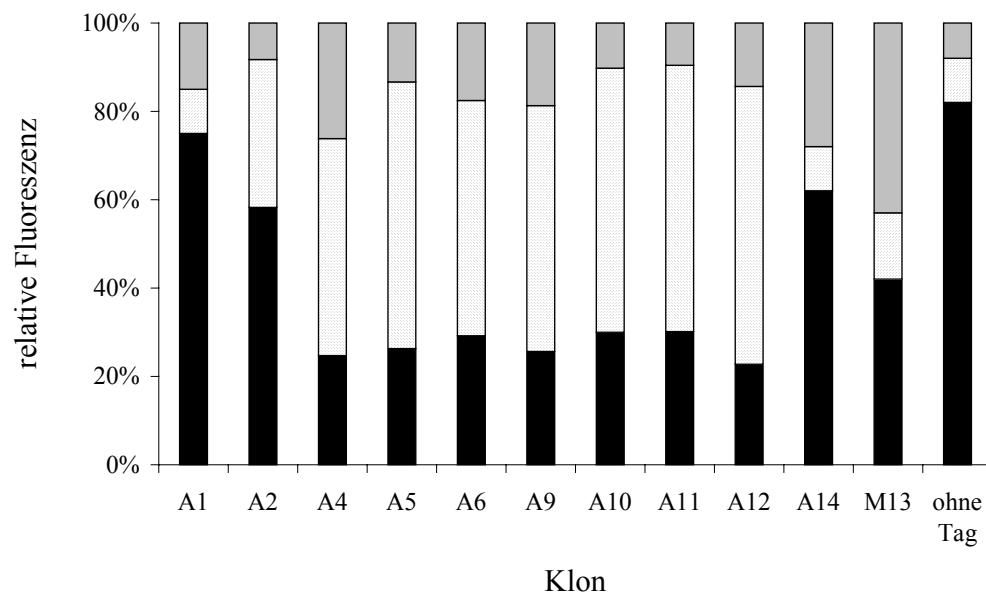


Abbildung 3.19: Bindungs- und Elutionsverhalten einiger Klone im Spin-Säulen-Test (Durchfluß ■; Waschschrift □; Elution ▒) (Sequenzinformationen s. Tabelle 3.3)

Wie aus Abbildung 3.19 erkennbar, zeigte der Klon M13, welcher mittels des in Abschnitt 3.3.5 beschriebenen Hochdurchsatzscreenings gefunden wurde, die prozentual höchste Elution. Er ist daher für die Proteinaufreinigung des eGFP besonders geeignet. Alle weiteren Untersuchungen wurden deshalb mit dieser Peptidvariante durchgeführt. Zur leichteren Verständlichkeit wird für diese Peptidvariante anschließend die Bezeichnung HeliTag verwendet.

Abbildung 3.20 zeigt, daß das an den HeliTag fusionierte eGFP bereits durch die Spin-Präp-Säule sehr gut aufgereinigt werden konnte.

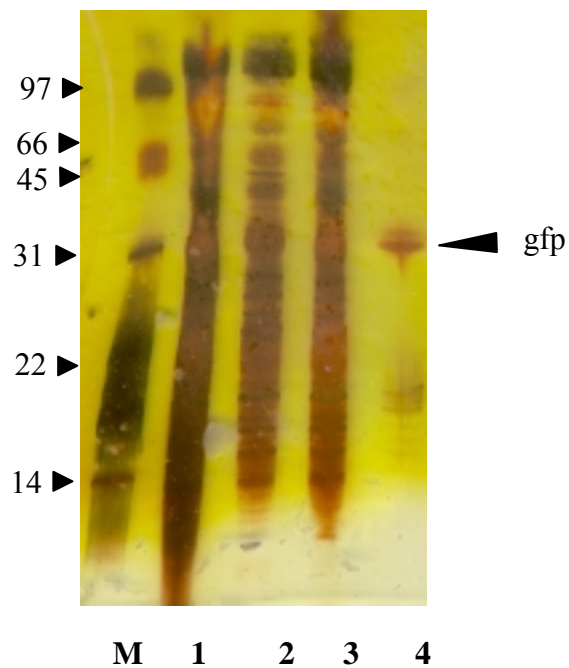


Abbildung 3.20: PHAST[®]-Gel (Silverfärbung) der Spin-Säulen-Aufreinigung von Klon M13 (HeliTag) (M: HMW Standard, 1: Zellaufschluß, 2: Durchfluß, 3: Waschschritt, 4: Elution)

3.3.7 Einsatz in der FPLC-Aufreinigung

Um die Tauglichkeit des HeliTags in der konventionellen IMAC-Aufreinigung zu untersuchen, wurden 100 ml des eGFP-HeliTags-Proteins exprimiert und mittels FPLC aufgereinigt. Abbildung 3.21 zeigt, daß das egfp ohne Metallaffinitätspeptid nicht unspezifisch an die Matrix bindet und schon während des Waschschrittes ausgetragen wird, während das an das Metallaffinitätspeptid fusionierte Protein in einem engen Bereich der Säule gebunden und in einer Fraktion eluiert wird (s. Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23).

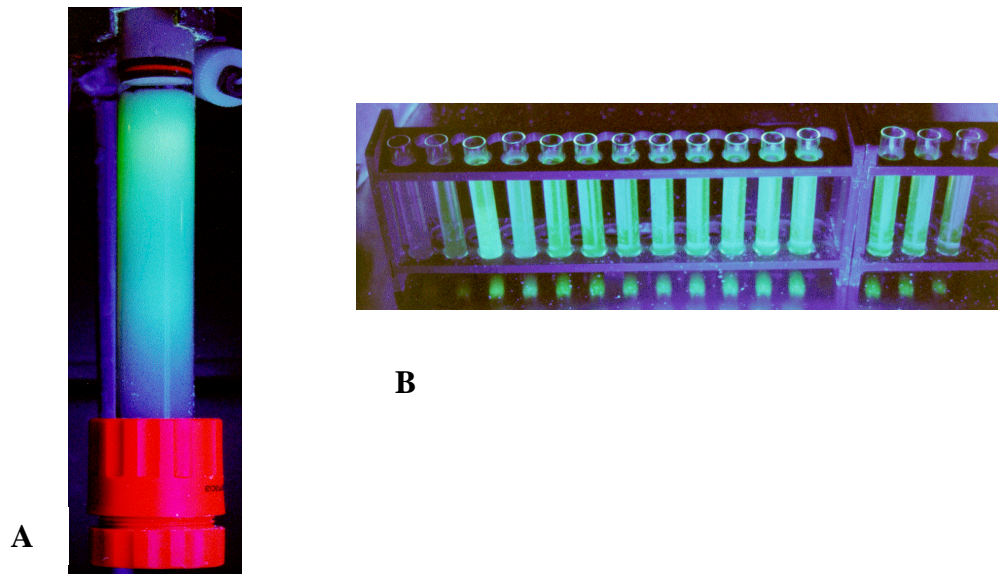


Abbildung 3.21: Verhalten des nicht mit einem Metallaffinitätstag gekoppelten eGFP auf einer mit „Chelating Sepharose“ beladenen Säule (A) und im Fraktionssammmler (B), während des Waschschrattes.

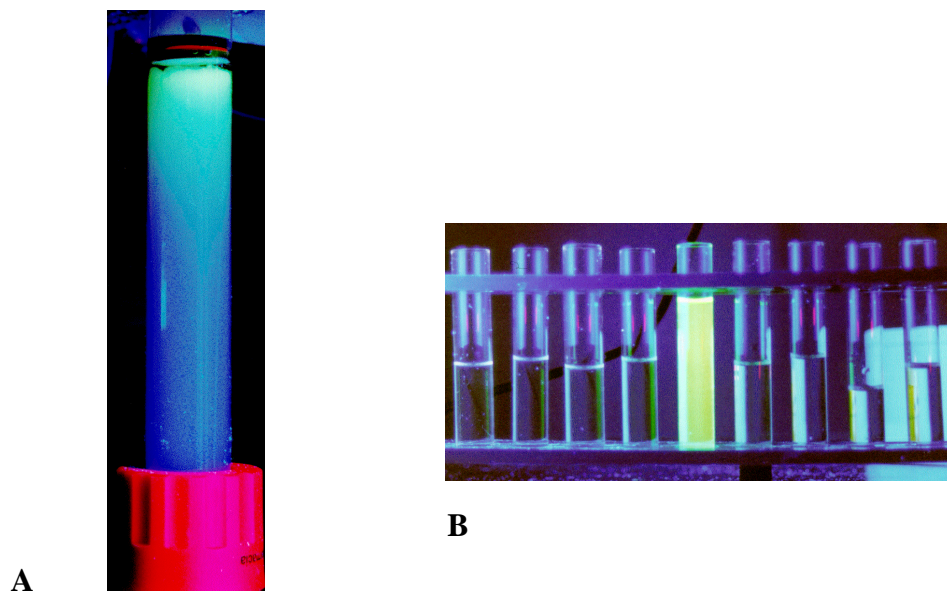


Abbildung 3.22: Verhalten des an den HeliTag fusionierten eGFPs während des Waschschrattes auf der Säule (A) und bei der Fraktionierung während der Elution (B)

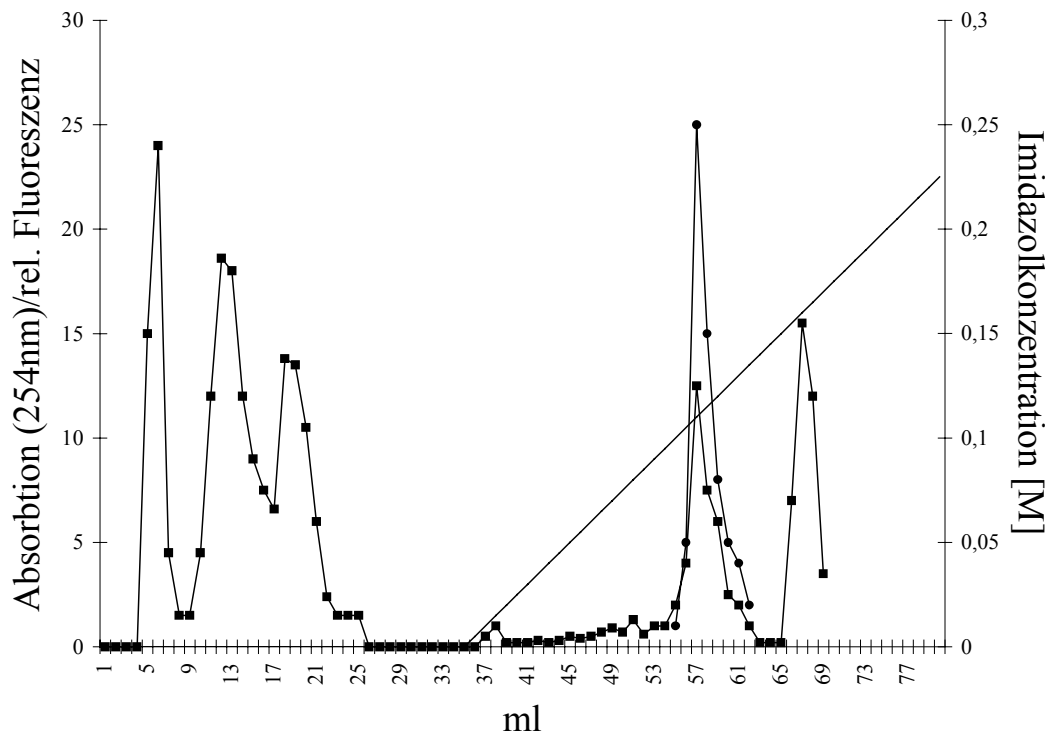


Abbildung 3.23: Aufreinigung des eGFPs mit fusioniertem HeliTag (-■- Absorption bei 254 nm; -●- relative Fluoreszenz) (Die Angabe der Absorption oberhalb von Fraktion 70 ist aufgrund der hohen Eigenabsorption des Imidazols nicht mehr möglich).

3.3.8 Verschiedene Metalle für die Proteinaufreinigung

Zeigte der HeliTag bei der Verwendung von Ni^{2+} als zu komplexierendes Ion sehr gute Bindungseigenschaften, so konnte für das in der IMAC routinemäßig eingesetzte Zn^{2+} keinerlei Bindung beobachtet werden. Die Bindung an Cu^{2+} hingegen war so stark, daß Teile des Metallsalzes mit dem Protein eluiert wurden. Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen von Melchers (Melchers, 1996) der als natürlich gebundene Metalle nur Cu^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} beschreibt.

3.3.9 Vergleich des HeliTags mit dem (His)₆ und einer Wildtypmetallbindungsstelle

Da in IMAC-Aufreinigungen üblicherweise der (His)₆-Tag verwendet wird, sollte dieser mit dem neu entwickelten HeliTag verglichen werden. Auch eine natürlich vorkommende Variante der *Helicobacter pylori* ATPase 439 (His-Ile-His-Asn-Leu-Asp-Cys-Pro-Asp-Cys) (Melchers, 1996) sollte auf ihre Eignung in der Proteinaufreinigung hin untersucht werden. Alle drei Peptide wurden über PCR an das eGFP fusioniert (Primer ATPwild bzw. gfpHis mit gfpC), im 250 ml-Maßstab kultiviert und anschließend unter identischen Bedingungen aufgereinigt. Abbildung 3.24 zeigt das unterschiedliche Elutionsverhalten dieser Metallbindungsstellen. Es zeigte sich, daß der (His)₆-Tag schon bei relativ geringen Imidazolkonzentrationen (s. Tabelle 3.4) über vier Fraktionen eluiert wird, während der HeliTag bei einer Konzentration von ca. 0,1 M Imidazol in einer Haupt- und drei Nebenfraktionen scharf von der Matrix ablösbar ist. Die Wildtypbindungsstelle läßt sich ebenfalls relativ scharf, aber erst bei einer Imidazolkonzentration von ca. 0,25 M eluieren.

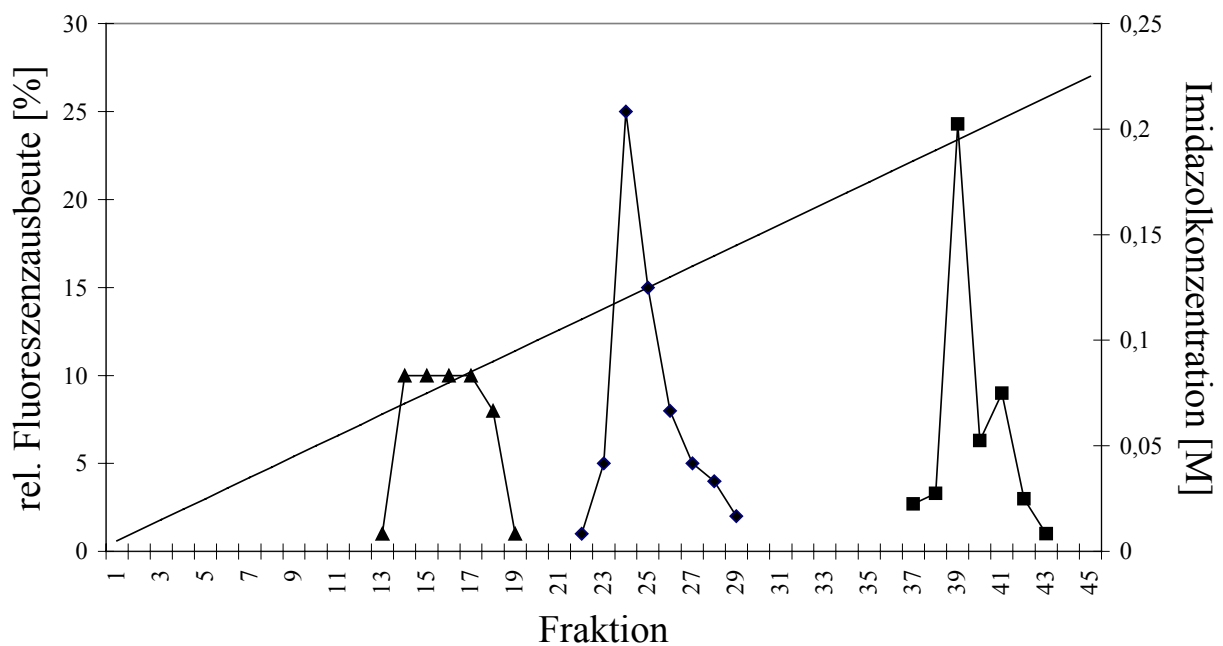


Abbildung 3.24: Vergleich der Elutionsprofile des His₆-Tags (▲), des HeliTags (◆) und der Wildtypbindungsstelle (■) bezogen auf die eluierte Fluoreszenz.

Tag	Zur Elution benötigte Konzentration an Imidazol [M]	Ausbeute [%]
HeliTag	0,1	68
(His) ₆ -Tag	0,05	48
Wildtyp-Peptid	0,25	68

Tabelle 3.4: Vergleich der Ausbeuten unter Verwendung verschiedener Affinitätspeptide

3.4 Aufreinigung und Expression der Lipase BTL2 in verschiedenen Expressionsorganismen

Um die Anwendbarkeit des HeliTags für die Aufreinigung industriell interessanter Proteine zu demonstrieren, wurde der HeliTag mittels PCR an das Gen der Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus* fusioniert. Das Protein kann leicht in verschiedenen Organismen aktiv und in größeren Mengen expremiert werden, ist hinreichend stabil und die Aktivität kann durch den photometrischen oder den pH-Stat Assay einfach nachgewiesen werden. Deshalb eignet es sich gut als Reporterprotein.

3.4.1 *E. coli*

3.4.1.1 250 ml Ansatz

BTL-HeliTag wurde im 250 ml Maßstab kultiviert, die Zellen in 10 ml aufgeschlossen und der Überstand mittels FPLC aufgereinigt. Abbildung 3.25 zeigt das Ergebnis der Aufreinigung, das Reinigungsprotokoll ist in Tabelle 3.5 dargestellt. Es konnte in einer Einzrittaufreinigung ein Reinigungsfaktor von über 40 bei einer Ausbeute von 35 % erreicht werden.

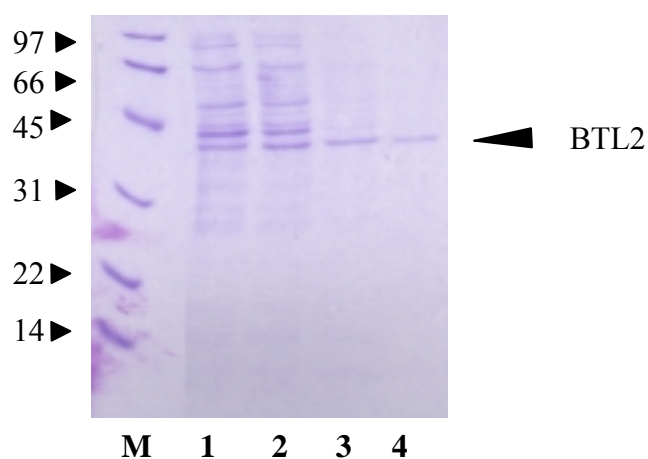


Abbildung 3.25: Aufreinigung der Lipase BTL2-HeliTag mit Hilfe der FPLC; **M:** Standard, **1:** Fraktion 32; **2:** Fraktion 33; **3:** Fraktion 34; **4:** Fraktion 35

	Volumen [ml]	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt- protein [mg]	Spezifität Aktivität [U/mg]	Aufreinigungs- faktor
Überstand	10	9375	136	69	1
Fraktion 30	3	92	4	23	0,3
Fraktion 31	3	292	9	33	0,5
Fraktion 32	3	717	18	40	0,6
Fraktion 33	3	831	12	70	1,0
Fraktion 34	3	739	0,42	1743	25
Fraktion 35	3	581	0,19	3082	44
Fraktion 36	3	280	3	88	1,3

Tabelle 3.5: Aufreinigungstabelle des BTL2-HeliTag im 10 ml Ansatz (Bestimmung der Aktivitäten bei pH 7,5, 45°C gegen Tributyrin). Die Ausbeute für die Fraktionen 34 und 35 betrug 35%.

3.4.1.2 Einführung der Proteaseschnittstelle Xa

Um unerwünschte Wechselwirkungen mit dem aufgereinigten Protein zu vermeiden, z.B. das allergene Potential des Proteins zu erniedrigen, bietet sich der Einsatz von Endoproteinasen zur Abspaltung des Aufreinigungspeptids an (s. auch Tabelle 1.6).

Mit die am meisten verwendete Endoproteinase ist der in humanem Blut vorkommende Faktor Xa, der für die Aktivierung des Thrombins aus Prothrombin verantwortlich ist. Diese Protease spaltet im Anschluß an die Erkennungssequenz Ile-Glu-Gly-Arg. Die Proteaseschnittstelle wurde mit den Primern BTL und BTLXaM13 nach der in Material und Methoden beschriebenen Strategie kloniert.

Die Aufreinigung gelang auch mit den für den HeliTag beschriebenen Strategien und führte zu ähnlicher Reinheit.

Das Abspalten der Bindungsstelle konnte einmal durch N-terminale Sequenzierung (Blot s. Abbildung 3.26; Sequenz s. Tabelle 3.6) nachgewiesen werden. Ein weiterer Nachweis

konnte dadurch erbracht werden, daß das gespaltene Protein nach Dialyse zur Entfernung des Imidazols nicht mehr an die Metallaffinitätsmatrix band.

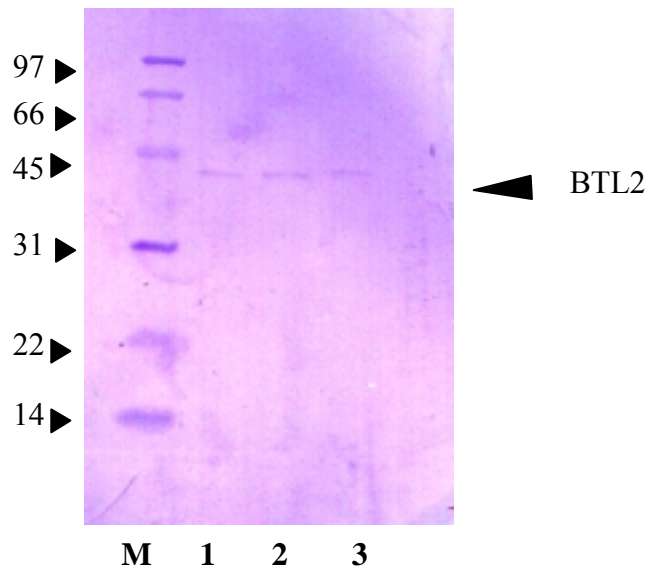


Abbildung 3.26: Western-Blot der BTL-HeliTag und der BTL-Xa-HeliTag **M:** Standard, **1+2:** BTL2-HeliTag; **3:** BTL2-Xa-HeliTag

Protein	Sequenz	Bindung
BTL-Xa-HeliTag	nicht bestimmbar ^a	bindet (nach Dialyse) an Ni-NTA Matrix
BTL-Xa-HeliTag nach 2 Std. Xa Behandlung	gef.: MKG?RVMV?L erw: MKGCRVMVVL	bindet nicht mehr an Ni-NTA Matrix

^aDer N-Terminus des HeliTags konnte nicht sequenziert werden, da die zwei aufeinanderfolgenden Cysteine wahrscheinlich zum Abbruch der Sequenz führten

Tabelle 3.6: Bestimmung der N-terminalen Proteinsequenzen vor und nach Abspaltung des N-terminal fusionierten Affinitätspeptides.

3.4.1.3 Fermentation und Streamline-Chromatografie

Industriell wichtige Enzyme müssen in größerer Menge darstell- und aufreineigbar sein. Aus diesem Grund wurde BTL-HeliTag im 30 l-Maßstab fermentiert (s. Abbildung 3.27). Die Zellen wurden durch Ultrafiltration abgetrennt und in 500 ml aufgeschlossen. Der Aufschluß wurde anzentrifugiert und direkt für die Streamline-Chromatografie eingesetzt (s. Abbildung 3.29).

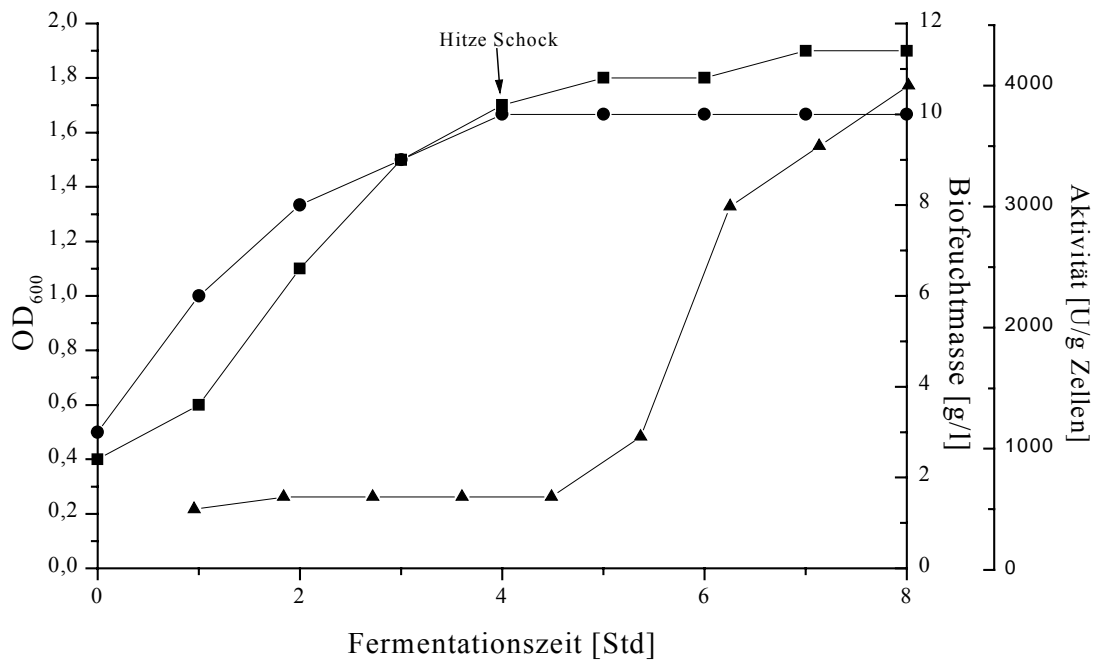


Abbildung 3.27: Fermentationsverlauf einer 30 l Fermentation der BTL2 (-■- OD₆₀₀ der Kultur; -◆- Biofeuchtmasse (aus 20 ml Kulturbrühe); Lipaseaktivität (▲) (Pellet aus 20 ml Fermentationsmedium wurde im Ultraschall aufgeschlossen und die Aktivität gegen Tributyrin bei pH 7,5 und 65°C bestimmt).

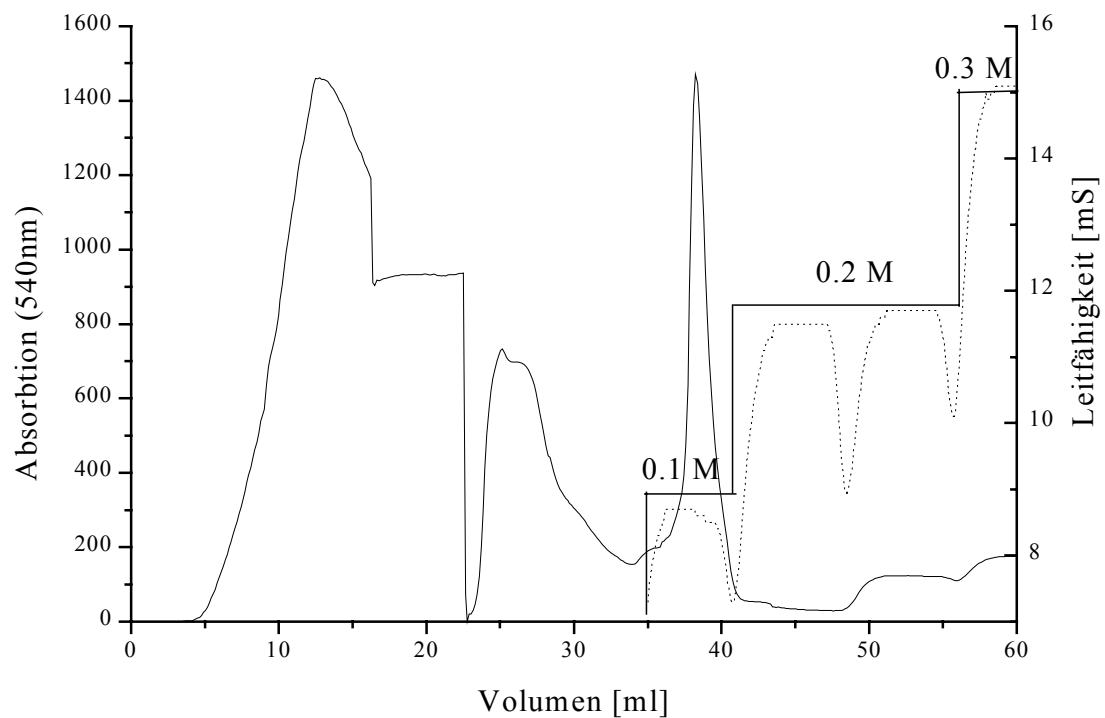


Abbildung 3.28: Streamline Chromatografie von BTL2-HeliTag an „Streamline Chelating Sepharose“. (— Absorption bei 540 nm; Leitfähigkeit in mS)

Im Waschschrift der Streamline-Chromatografie konnte keine Aktivität nachgewiesen werden, der Hauptanteil der Lipaseaktivität konnte bereits in der ersten Elutionsstufe mit 0,1 M Imidazol eluiert werden. Es wurde ein Aufreinigungsfaktor von 8 bei einer Ausbeute von 25% bestimmt. Ein geringerer Anteil mit auch niedrigerer spezifischer Aktivität wurde bei einer Konzentration von 0,2 M gemessen (s. Tabelle 3.7 und Abbildung 3.29).

	Volumen [ml]	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt- protein [mg]	Spez. Aktivität [U/mg]	Faktor
Überstand	500	1600000	18000	89	1
Waschschritt	300	0	14000	0	n.b.
0,1 M Imidazol	150	405000	540	750	8,4
0,2 M Imidazol	150	102000	400	255	2,8
0,3 M Imidazol	150	0	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 3.7: Aufreinigungsprotokoll der Streamline-Chromatografie einer 30 l Fermentation BTL2-HeliTag (n.b.=nicht bestimmt).

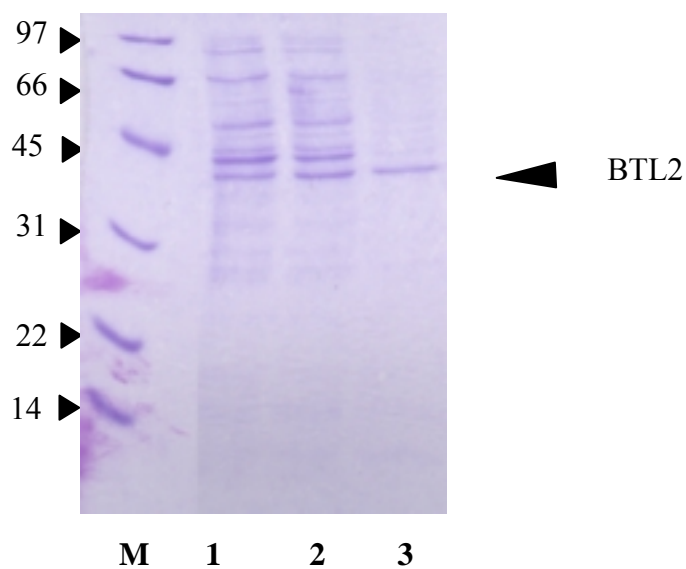


Abbildung 3.29: Streamlineaufreinigung der BTL2-HeliTag; **M:** Standard, **1:** Auftrag, **2:** Elution bei 0,1 M; **3:** Elution bei 0,2 M Imidazol.

3.4.2 *Streptomyces lividans*

Da bei der Expression heterologer Proteine in *E. coli* und deren anschließender IMAC-Aufreinigung immer Membranproteine an die Ni-NTA-Matrix binden (Brock and Madigan, 1988), sollte untersucht werden, ob die Expression in einem grampositiven Organismus dieses Problem umgehen kann.

Das BTL2-Gen wurde mittels einer PCR-Reaktion mit den Primern BTLC und BTLM14 an den HeliTag fusioniert und anschließend mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten. Das erhaltene Fragment wurde in den ebenfalls mit *NdeI* und *BamHI* geschnittenen Vektor pIJ4123 (Takano et al., 1995) ligiert und anschließend in über Protoplastierung *Streptomyces lividans* transformiert.

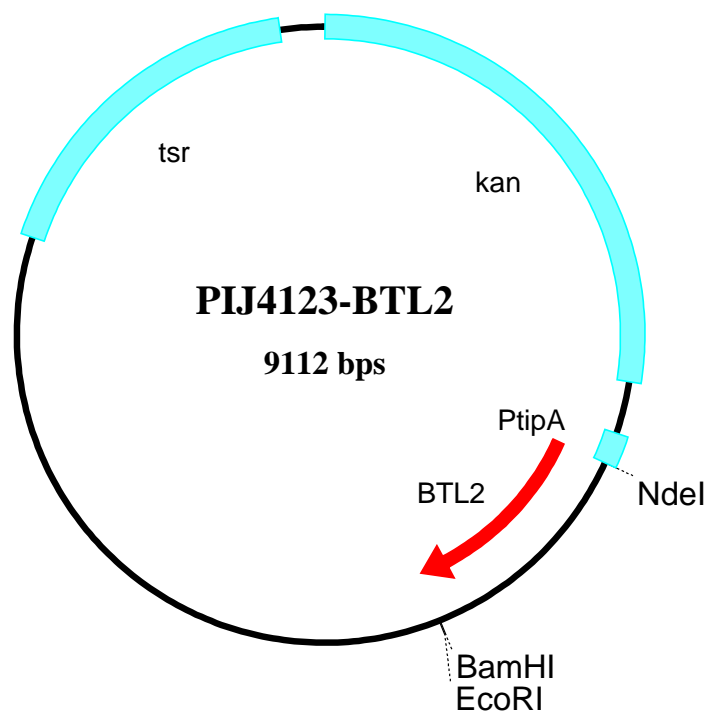


Abbildung 3.30: Der Vektor pIJ4123-BTL2 zur Expression der HeliTag-fusionierten Lipase BTL2 in *Streptomyces lividans*.

Die Zellen wurden unter induzierenden Bedingungen (s. Material und Methoden) 72 Std. kultiviert und anschließend aufgeschlossen. Der Zellüberstand konnte dann mittels FPLC aufgereinigt werden (s. Abbildung 3.31).

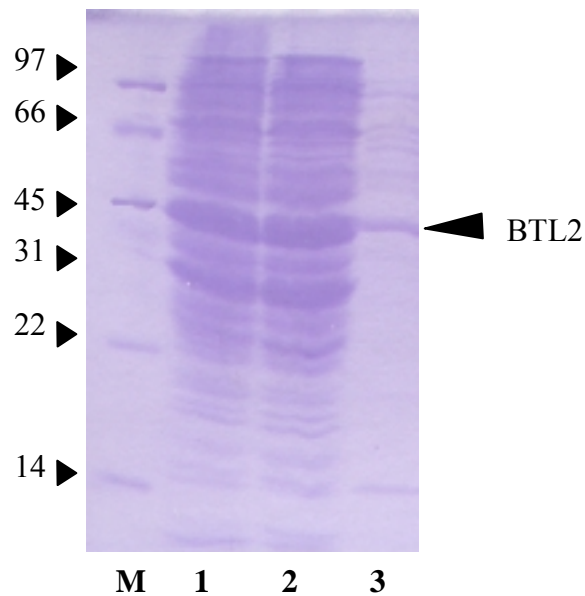


Abbildung 3.31: Expression und Aufreinigung von BTLM14 aus *Streptomyces lividans* TK 13 M: Standard, Spur 1: Expression nach 48 Std. , Spur 2: Expression nach 72 Std., Spur 3: Über IMAC aufgereinigtes Protein.

Abbildung 3.31 zeigt, daß sich in *Streptomyces lividans* Tk 13 unter dem Thiostrepton Promotor eine deutliche Überexpression erreichen läßt. Allerdings fällt die Ausbeute sowohl bezogen auf den Raum-Zeit-Faktor, wie auch bezogen auf die Zellmasse deutlich schlechter aus (s. Tabelle 3.9).

	Zeit [Std]	Zellmasse [g]	Aktivität [U / 250 ml]	Aktivität [U/g Zellen]	Spez. Aktivität [U/mg]
<i>E. coli</i>	9	2 g	8700	4350	2950
<i>S. lividans</i>	72	3,5 g	3200	915	3200

Tabelle 3.8: Vergleich der Expressionsleistung von *Streptomyces lividans* und *E. coli* bei der Produktion der BTL2-HeliTag. (250 ml Kultur, zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde nur die aktivste Fraktion der IMAC-Aufreinigung betrachtet).

Die Enzymeigenschaften der unterschiedlich exprimierten Proteine bezüglich Temperaturaktivität bzw. -stabilität (s. Abbildung 3.32) und pH-Aktivität (s. Abbildung 3.33) waren vergleichbar. So lag das Temperaturoptimum bei dem in *E. coli* produzierten Enzym bei 60°C, bei dem in *Streptomyces lividans* exprimierten bei 65°C. Das pH-Optimum beider Proteine lag bei pH 7,5. Diese Werte stehen im Einklang mit dem nicht HeliTag fusionierten in *E. coli* unter dem λ -Promotor exprimierten Lipase-„Wildtyp“.

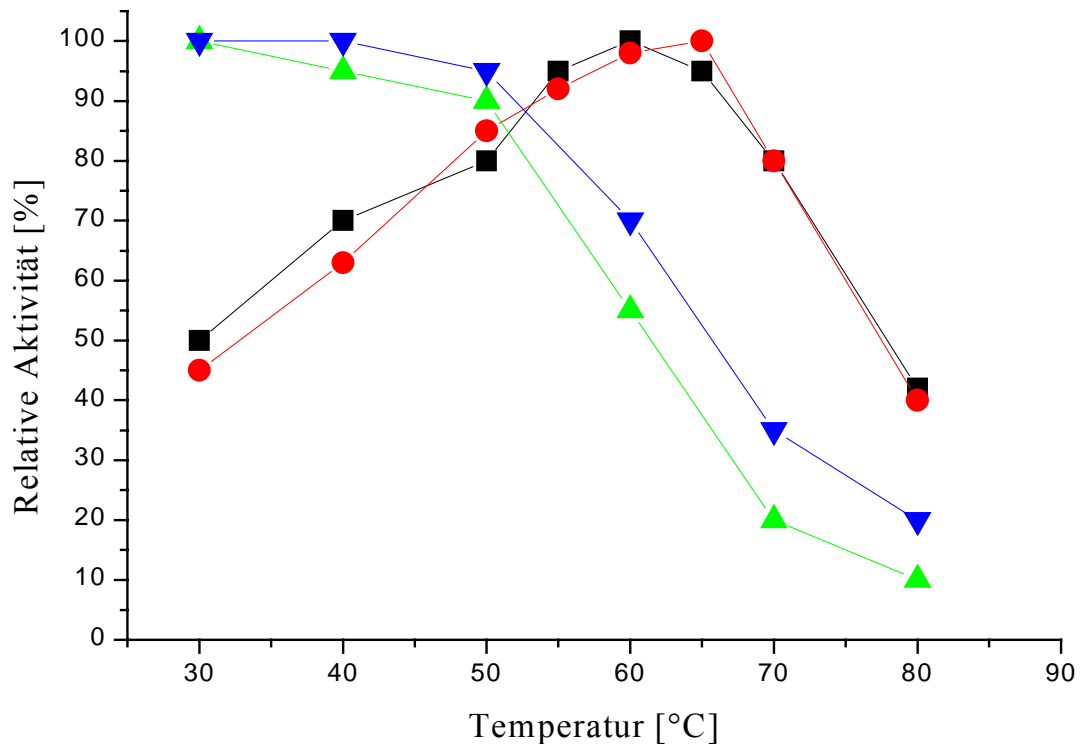


Abbildung 3.32: Temperaturaktivität (●;■) und -stabilität (▲;▼) der Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus* (exprimiert in *Streptomyces lividans* (▼;●) bzw. *E. coli* (▲;■))

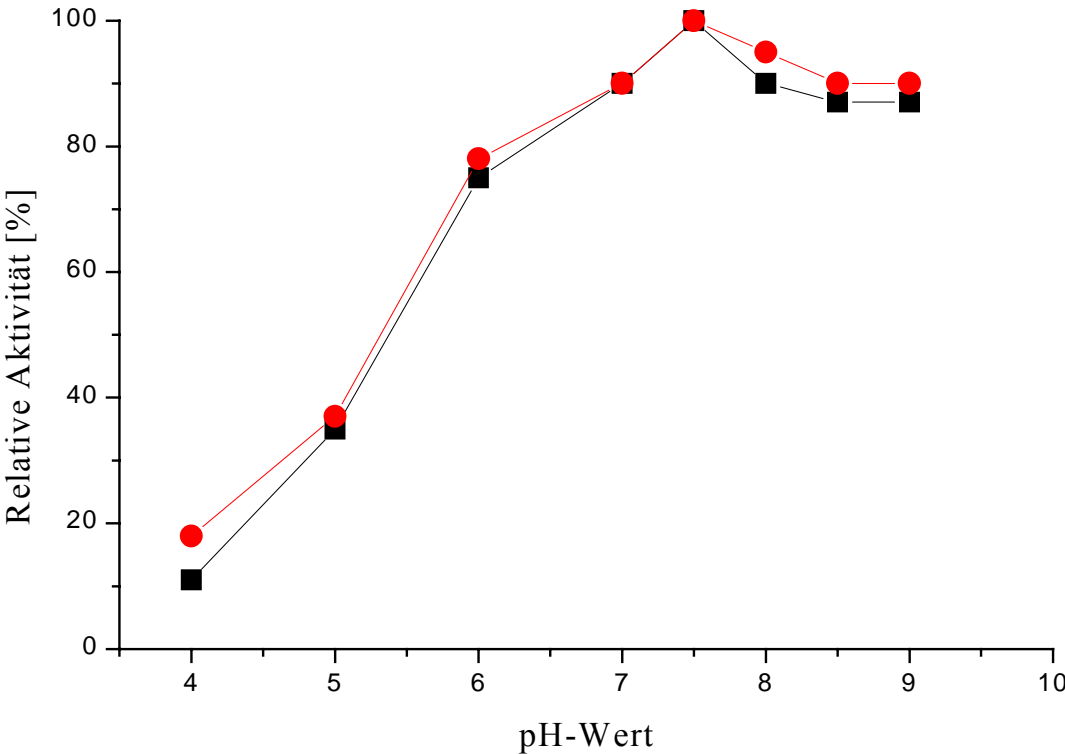


Abbildung 3.33: pH-Aktivität der BTL2 bei Expression in *Streptomyces lividans* (-●-) und *E. coli* (-■-)

4 Diskussion

4.1 Hochdurchsatzscreening in der gerichteten Evolution

Während die Methoden der kombinatorischen Chemie in der pharmazeutischen Forschung etabliert wurden, sind entsprechende Entwicklungen in der kombinatorischen Biokatalyse noch unzureichend. Einer der Gründe hierfür ist sicherlich, daß bislang nur auf wenige allgemein anwendbare Methoden des High-Throughput-Screenings zurückgegriffen werden kann. Ein anderer, daß die Zahl der durch kombinatorische oder evolutive Methoden dargestellten Katalysatoren deutlich größer ist, als die Zahl der im Pharmascreeing zu testenden Substanzen.

Gelingt es nicht ein Selektionssystem aufzubauen, bei dem nur positive Mutanten auf dem Nährmedium überleben (Crameri et al., 1998), oder durch enzymatische Reaktion Nährstoffquellen erschlossen werden, welche das Wachstum positiver Klone fördern (Bornscheuer et al., 1998), so bietet sich die Durchführung von Einzelreaktionen in, im Pharmascreeing etablierten, Mikrotiterplatten an. In diesen können mit relativ großen Proteinmengen unter realen Bedingungen Reaktionen durchgeführt werden. Die Prozessierung der Platten kann heute automatisiert in sehr großer Zahl geschehen, so daß beim Einsatz von 96 oder sogar 384 „well“ Platten ein hinreichend großer Mutantendurchsatz möglich ist. Es muß allerdings beachtet werden, daß sich nicht alle Expressionswirte in Mikrotiterplatten kultivieren lassen; so bereiten vor allem mycelbildende Organismen größere Schwierigkeiten.

Für das Auslesen des Assaysystems stehen heute bereits eine Vielzahl von, meist aus dem Pharmascreeing stammenden, Methoden zur Verfügung. Aufgrund des möglichen hohen Durchsatzes werden meist optische Verfahren wie Fluor- oder Lumineszenz, Absorption oder Fluoreszenzpolarisation eingesetzt. In letzter Zeit wurden aber auch Massenspektroskopische (Reetz et al., 1999) und „Szincillation Proximity Assays“ (SPA) (Baker et al., 1996) Methoden beschrieben.

Allen Tests in Mikrotiterplatten ist allerdings gemein, daß die die mutierten Gene tragenden Klone in die „wells“ vereinzelt werden müssen. Neben dem aufwendigen und fehleranfälligen manuellen Picken, bietet sich der Einsatz von den aus den Genomprojekten stammenden, über Bilderkennung arbeitenden Pickrobotern an (Uber et al., 1991). Da diese Systeme aber immer eine unterschiedliche Anzahl von Zellen in die Platte übertragen, sind die Start- und damit auch die Wachstumsbedingungen in jedem „well“ unterschiedlich. Dies ist für den Einsatz in den Genomprojekten, mit dem Ziel der Gewinnung von DNA aus Genbanken, gleichgültig.

Es wirkt sich aber für vergleichende biokatalytische Messungen negativ aus, da hier die Menge des exprimierten Proteins entscheidend für die gemessene Aktivität ist. Um dieses Problem zu überwinden, wurde der Einsatz von GFP-Enzym Fusionsproteinen beschrieben (Albano et al., 1998). Bei diesem Verfahren wird die Enzymaktivität mit der Fluoreszenz, und somit der Proteinmenge, korreliert. Bedingung für den Einsatz dieser Methode ist allerdings eine ausreichende Aktivität des GFP-Enzym Adduktes.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Vereinzelung von Mutanten durch den Einsatz von einem Durchflußzytometer (FACS) und eines Plasmides, welches das zu mutierende Protein und das GFP als Transformationsreporter als zwei unabhängig exprimierbare Proteine enthält, umgeht dieses Problem. Es konnte gezeigt werden, daß durch Einzeltransformantendetektion und -ablage identisches Wachstums- und Expressionsverhalten in den „wells“ der Mikrotiterplatte erreichbar waren. Im Gegensatz zum Einsatz des Fusionsproteins stellt sich bei dieser Methode auch das Problem der Aktivität des Fusionsadduktes nicht. Der Einsatz zweier unabhängiger Promotoren, hier des temperatursensitiven λ - und des *lac*-Promotors, ermöglicht auch die kontrollierte Expression des mutierten Proteins.

Beim Einsatz des FACS entfällt zusätzlich die Notwendigkeit der Transformantenselektion mit Hilfe von Antibiotika, d.h. die Ausbringung des Transformationsansatzes auf Selektionsmedium entfällt, ebenso die anschließende Inkubation über Nacht. Dieser Zeitvorteil dürfte sich vor allen Dingen bei sich wiederholenden Mutationszyklen bemerkbar machen.

Nachteilig bei diesem System wirkt sich vor allem der hohe Preis und die hohe Wartungsanfälligkeit der Durchflußzytometer mit Einzelzellablage aus. Wie auch bei dem Einsatz des GFP-Enzym Fusionsproteins limitiert der Einsatz eines Fluoreszenzreporters auch anschließende fluorimetrische Assayverfahren, dieses ließe sich aber möglicherweise durch den Einsatz von GFP-Varianten mit anderen Absorptions- bzw. Emissionseigenschaften vermeiden.

Die Durchflußzytometrie eignet sich besonders zur Vereinzelung von großen Mutantenbibliotheken, die beispielsweise durch den Mutationsstamm *Epicurian coli* XL1-Red erzeugt wurden. Mutationsverfahren wie die fehleranfällige Polymerasekettenreaktion oder das „gene shuffling“, welche einen Ligationsschritt erfordern, scheinen für diesen Ansatz nicht optimal geeignet, da bei diesen meist nur 1000-5000 Transformanten pro Ansatz erzeugt werden. Daher ist es fraglich, ob die Selektion dieser wenigen Transformanten aus 10^8 Zellen Sinn macht.

4.2 Epoxidhydrolasen

4.2.1 Filterpapierassay

Bisher sind in der Literatur noch keine Assays auf Epoxidhydrolaseaktivität beschrieben worden, welche im Hochdurchsatzscreening durchgeführt werden können. Die meisten Epoxidhydrolasen wurden bisher mit HPLC- (Nellaiah et al., 1996) bzw. GC- (Pedragosa-Moreau et al., 1996) Verfahren detektiert. Beide Methoden sind für das Massenscreening nicht oder nur sehr schwer einsetzbar.

Die direkte Detektion des verbleibenden Substrats bot sich somit als Lösungsansatz an. Filterpapier oder Membranassays sind immer dann angeraten, wenn eine große Zahl Kolonien untersucht werden muß. Durch diese Art der Replikaplattierung bleibt natürlich auch die Masterplatte erhalten, von der positive Klone wieder gewonnen und charakterisiert werden können. Der Einsatz von Styroloxid in dieser Art Nachweisreaktion muß aber kritisch betrachtet werden. Epoxide sind generell hoch toxisch und die Inkubation von Filterpapieren und vor allem die anschließende Farbstoffreaktion bei hohen Temperaturen stellt hohe sicherheitstechnische Anforderungen. Auch ließ sich nicht endgültig klären, ob eine einzelne, durch Zufallsmutagenese erzeugte Kolonie ausreichend Epoxidhydrolaseaktivität zur Verfügung stellen würde, um eine sichtbare Hofbildung zu erzeugen. Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der von F. Zocher entwickelte Mikrotiterplattenassay verwendet, welcher automatisiert, in abgedeckten Platten, mit kleineren Styroloxid- und größeren Zell- bzw. Proteinkonzentrationen durchgeführt werden kann.

Mit Hilfe des Mikrotiterplattenassays konnten auch in der Streptomycceten Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie Tübingen, Stämme identifiziert werden, welche Epoxidhydrolase Aktivität aufweisen. Epoxidhydrolasen aus Aktinomyceten sind zwar schon länger bekannt (Kroutil et al., 1998; Mischitz et al., 1996), aus der großen Gruppe der Streptomycceten wurden allerdings bisher keine solchen Enzyme beschrieben. Die Enantioselektivitäten der gefundenen Enzyme waren zwar nur moderat, aber ausgehend von der nur kleinen Zahl der untersuchten Stämme, kann davon ausgegangen werden, daß eine weitere Suche nach stereoselektiveren Epoxidhydrolasen in Streptomycceten gute Aussichten auf Erfolg haben dürfte.

4.2.2 „Umwidmung eines Enzyms“

Die Frage, ob die „Umwidmung“ eines Enzyms in ein Enzym mit anderer katalytischer Aktivität möglich ist, konnte auch in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Literaturbekannt ist bisher lediglich die Überführung einer Fucosidase (EC. 3.2.1.52) in eine Galactosidase (EC. 3.2.1.2) (Zhang et al., 1997). Bei dieser Arbeit wurde allerdings die Enzymaktivität der Fucosidase zerstört und dabei, die schon beim Wildtyp vorhandene, Galactosidase Aktivität erhalten.

Ob dies eine Änderung der katalytischen Aktivität oder „nur“ eine Veränderung, bzw. Verschiebung, der Substratspezifität darstellt, ist definitionsabhängig.

Die „Umwidmung“ einer Lipase in eine Epoxidhydrolase bereitet in vielfacher Hinsicht Schwierigkeiten. Zum einen ist das Assaysystem für Epoxidhydrolasen aufwendig und in seiner Sensitivität limitiert, so daß nicht bestimmt werden kann, ob nicht genug Kolonien getestet, oder ob die positiven Mutanten nicht aktiv genug waren. Des weiteren muß der teiltrationale Ansatz, welcher nur auf die Ähnlichkeit des Reaktionsmechanismus, also des intermediär gebildeten Esters, und dem damit naheliegenden Austausch des katalytischen Serins gegen ein Aspartat, sowie die Zugehörigkeit beider Enzyme zur α/β -Hydrolasefaltung beruht, kritisch betrachtet werden. Es scheint nahezuliegen, daß sich die geometrischen Verhältnisse im aktiven Zentrum bei der Bildung des tetrahedralen Übergangszustandes doch deutlich von den Verhältnissen in einer Lipase unterscheiden, und daß diesem Umstand durch die Einführung des Prolinrestes in der Oxyaniontasche nicht genug Rechnung getragen wird. Genauere Untersuchungen setzen deshalb die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von Epoxidhydrolasen und des Ausgangsenzyms, der BTL2, voraus, die aber bis zum Ende der Arbeit nicht vorlagen.

Die gewählten Mutationsbedingungen und -häufigkeiten befinden sich im Einklang mit der Literatur, wobei die Frage wie hoch die Mutationsrate zur Generierung neuer katalytischer Aktivität sein muß, offen bleibt.

Die Bedingungen für eine Umwidmung der beiden Enzyme ineinander lassen sich möglicherweise besser durch das Umkehrexperiment, also der Erzeugung von Lipase/Esteraseaktivität aus einer Epoxidhydrolase ableiten. Für diese Problemstellung stehen einfache sensitive Agarplattentestsysteme zur Verfügung. Damit wäre es möglich, eine große Zahl von Mutanten zu testen.

Die Tatsache, daß in der Zufallsmutagenese eines kompletten Gens schon bei nur mäßiger Mutationshäufigkeit extrem große Bibliotheken entstehen, wirft die Frage auf, ob bei solchen

Problemstellungen Assays in Mikrotiterplatten Sinn machen. Schon der Austausch nur zweier Aminosäuren in einem 200 Aminosäuren großen Protein führt zu theoretisch $7 \cdot 10^6$ Mutanten, was 70000 „96‘well“ Mikrotiterplatten entspräche. Eine Zahl, die zwar durch heutige Automatisierungstechnik bewältigbar ist, aus Kostengründen und der geringen Wahrscheinlichkeit ein neues geeignetes Enzym zu finden, jedoch wenig Sinn macht.

Wie schon erwähnt, scheint es daher geboten entweder Assaysysteme zu entwickeln, welche das Screening auf Agarplatten ermöglichen oder gar eine direkte Selektion positiver Mutanten durch Wachstumsassays durchzuführen.

4.3 Entwicklung neuer Metallaffinitätspeptide

Mit der steigenden Verfügbarkeit und dem zunehmenden Anwendungspotential rekombinanter Enzyme wächst auch der Bedarf für eine schnelle und effektive Aufreinigung der Proteine. Die Methode der Wahl stellen hier die Affinitätstechniken dar. Diese sind (normalerweise) Einschrittaufreinigungen und werden im Gegensatz zur Hydrophoben- oder Ionenaustauschchromatografie immer an identischen Matrices durchgeführt. Die Ausbeuten und die Reinheiten sind vergleichsweise gut und aufwendige Optimierungsschritte entfallen.

Trotz einiger Alternativen hat sich die Metallaffinitätschromatografie (IMAC) durchgesetzt. Der klassisch eingesetzte (His)₆-Tag, hat aber einmal aufgrund von Patentrestriktionen, die sich auf zwei benachbarte Histidine beziehen, aber auch aufgrund der schlechten Termination der Transkription bei Fusion an den C-Terminus, wie auch der relativ schlecht verfügbaren Antikörper wegen an Bedeutung eingebüßt.

Die Metallbindungsstelle HxHxxxCxxC der ATPase 439 (bzw. HP729) (Melchers, 1996) aus dem Humanpathogen *Helicobacter pylori* bot sich als Affinitätspeptid für die IMAC-Chromatografie an, da es sowohl gute Bindungseigenschaften hat, um die Metalle aus der sauren Umgebung des Magens zu akkumulieren, andererseits aber auch die Abgabe der zweiwertigen Ionen an die Urease bewerkstelligen muß. Um die Eigenschaften des Peptids für die Proteinaufreinigung zu optimieren, bot sich auch hier ein Ansatz der Zufallsmutagenese an

Da die (natürliche) Bindungsstelle lediglich aus zehn Aminosäuren besteht, von denen auch noch vier das Bindungsmotiv vorgeben, war in diesem Fall die Variantenbankerstellung über degenerierte Oligonukleotide die Methode der Wahl (Hermes et al., 1989; Hubner et al., 1988). Der entstehende Sequenzraum ist mit $6 \cdot 10^7$ Varianten überschaubar und die mit der Methode erzeugten Mutanten zeigten eine Gleichverteilung der eingebauten Aminosäuren.

Wie bei allen Problemen der Zufallsmutagenese mußte auch in diesem Fall ein geeignetes Assaysystem entwickelt werden. Als Standardreporterprotein hat sich im zellbiologischen Umfeld das GFP etabliert und damit dem bis dato verbreiteten Galactosidasereportersystem den Rang abgelaufen. Die Möglichkeit „Aktivität“ ohne Substrat und Cofaktor und zudem noch sensitiver, da fluorimetrisch und nicht photometrisch messen zu können, dürften diesen Siegeszug erklären. Das das GFP auch noch relativ klein und hoch pH- und oxidationsstabil (Ward and Bokman, 1982) ist, erleichtert den Einsatz in vielen Assaysystemen.

Die Fusion der Peptidbibliothek an das eGFP ermöglichte zudem eine einfache Verfolgung der Bindung und der Aufreinigungsprozesse.

Bei allen Assaysystemen muß die Entscheidung getroffen werden, ob man mit leicht detektierbaren Modellsystemen, für Enzymtests beispielsweise an Chromophorverbindungen arbeitet, oder ob man versucht, die reale Problemstellung möglichst exakt nachzubilden. Letzteres bedeutet bei Enzymtests beispielsweise den Einsatz von Zielsubstraten, deren Umsetzungen üblicherweise keine einfache Detektion ermöglichen, dafür aber Ergebnisse liefern, die die gewünschte Reaktion (und nicht die des Modellsubstrats) präziser beschreiben. Das gleiche Problem stellt sich auch bei der Entwicklung von Assaysystemen für die Proteinaufreinigung. Es bestünde natürlich die Möglichkeit Affinitätskonstanten durch SPR-Analysen (van den Heuvel et al., 1993) oder moderne Biacore-(Nieba et al., 1997) Methoden zu messen. Die praktische Proteinaufreinigung findet aber unter gänzlich anderen Bedingungen statt. Desweiteren ist bei Aufreinigungen nicht nur eine hohe Affinität des Metalltags zur eingesetzten Matrix gefordert, vielmehr muß das Protein unter Prozeßbedingungen auch wieder von der Matrix eluierbar sein.

Bisher waren keine Verfahren bekannt, welche den Aufreinigungen im Hochdurchsatz erlaubten. Der Einsatz, der aus dem Pharmascreening und den Genomprojekten stammenden Filterplatten, die dort hauptsächlich für Proliferationsassays und DNA-Aufreinigung verwendet werden, bot sich deshalb für diese Problemstellung an. Die Filterplatten wurden mit „Chelating Sepharose“ befüllt, und die so erhaltenen 96 „Säulen“ für eine hochparallelisierte Proteinaufreinigung genutzt.

Auch hier konnten also wieder die aus dem Pharmascreen stammenden Technologien für das Proteinscreening adaptiert werden, beispielsweise Vakuumkammern für das Absaugen der Filterplatten oder Pipettierroboter für das reproduzierbare Aufbringen der Matrix, der Nickellösung und der diversen Puffer.

Für den Zellaufschluß sind im proteinchemischen Labor eine Vielzahl physikalischer Methoden etabliert. Diese lassen sich aber in Mikrotiterplatten nicht oder nur sehr schwer

anwenden. So ist der Eintrag von Ultraschall sowohl aufgrund von Kreuzkontaminationen durch Verspritzen oder auch wegen der zu hohen Wärmeentwicklung in Mikrotiterplatten nicht möglich. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Tau-Frierzyklen in Gegenwart von Lysozym eine sehr brauchbare Lösung darstellen.

Nach dem Zellaufschluß muß der Zellüberstand vom Pellet abgenommen werden. Dies ist ein Beispiel für den Einsatz eines kaum durch manuelle Operation ersetzbaren Roboterschritts, der es erlaubt den Überstand extrem langsam vom Pellet abzunehmen ohne dieses aufzuwirbeln.

Nach Messung der Ausgangsfluoreszenz wird die eGFP-Lösung auf die equilibrierten und mit Metallsalz beladenen Säulen aufgebracht, der anschließende Wasch- und Elutionsschritt konnte wieder automatisiert durchgeführt werden.

Die Anwendung von mit „Chelating Sepharose“ gefüllter Filterplatten wurde zwar in dieser Arbeit als Screeningsystem genutzt, bietet sich aber durchaus auch zur Hochdurchsatzaufreinigung von an Metallaffinitätspeptide fusionierten Mutantenbibliotheken für das Hochdurchsatzscreening an. Für diesen Zweck stehen zwar seit kurzem auch mit Ni beladene Polystyrolplatten zur Verfügung, diese sind aber sehr teuer und nicht wie die Filterplatten regenerierbar.

Einige, der im Mikrotiterplattenscreening aufgefallenen Klone, wurden zur genaueren Charakterisierung mit Hilfe von Spin-Präp-Säulen aufgereinigt.

Es wurde gefunden, daß die Klone sehr unterschiedliche Bindungs- und Elutionseigenschaften aufweisen. Die Technik eröffnet somit die Möglichkeit eine Art Toolbox von Metallaffinitätspeptiden mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften aufzubauen, die es erlaubt, beispielsweise sehr empfindliche Proteine mit Tags aufzureinigen, welche für die Elution nur geringe Mengen Imidazol benötigen oder - wenn das Hauptaugenmerk auf hohe Reinheit gelegt wird - sehr gut bindende Peptide zu verwenden.

Für die genauere Charakterisierung wurde die Peptidsequenz **His-Asn-His-Arg-Tyr-Gly-Cys-Gly-Cys-Cys** ausgewählt, die bei den Spin-Präp-Schnelltests hohe Elutionsausbeuten zeigte.

Die genauen Aufreinigungseigenschaften wurden nun mittels FPLC-Aufreinigungen untersucht. Es zeigte sich, daß der Tag eine hohe Spezifität für Nickel aufwies, an Zink konnte keine Bindung festgestellt werden. Die Bindung an Kupfer war so stark, daß Kupferionen während der Imidazolelution mitgerissen wurden.

Ein Vergleich mit dem wohl am weitesten verbreiteten Affinitätspeptid, dem patentrechtlich geschützten (His)₆-Tag, zeigte, daß der HeliTag erst bei deutlich höheren Imidazolkonzentrationen eluiert wird. Dies geschieht auch in einer sehr viel schärferen Form.

Die Ausbeuten bei Aufreinigung mittels HeliTag lagen bei 68%, während beim His₆-Tag nur ca. 50% des gewünschten Proteins wiedergewonnen werden konnten.

Um die universelle Anwendbarkeit des HeliTags zu überprüfen, wurde dieser an die Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus*, einem potentiellen Industrieenzym, gekoppelt. Auch hier konnte gezeigt werden, daß eine Aufreinigung mit einem Aufreinigungsfaktor von 45 und einer Ausbeute von 30% möglich war.

Die Immunogenität von Peptiden ist je nach Feld der Anwendung positiv oder negativ zu bewerten. So ist eine hohe Immunogenität gewünscht, wenn Antikörper für den Nachweis der fusionierten Proteine in Zellen oder auf Blots genutzt werden sollen, da diese dann spezifisch und gut binden. Der (His)₆-Tag löst aufgrund seiner „unnatürlichen“ Aminosäuresequenz nur eine ungenügende Immunantwort aus und ist aus diesem Grunde nur bedingt für Nachweisreaktionen geeignet. Es ist daher zu überprüfen, ob sich gegen den HeliTag aktivere Antikörper bilden lassen. Negativ wirkt sich eine hohe Immunogenität hingegen dann aus, wenn pharmazeutisch einzusetzende Proteine aufgereinigt werden. Hier führt das hohe immunogene Potential natürlich zu einer unerwünschten Immunantwort des Organismus. Es ist also von entscheidender Bedeutung eine Möglichkeit zur Verfügung zu stellen, den HeliTag nach der Aufreinigung wieder abzuspalten, dies geschieht üblicherweise durch den Einsatz spezifischer Proteasen oder Enterokinasen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Abspaltung des HeliTags mit Hilfe des Faktors Xa an der entsprechenden Schnittstelle möglich war.

Für die Aufreinigung großer Mengen Protein aus Fermentationen müssen Methoden bereitgestellt werden, welche effektive einfache Aufreinigungen zur Verfügung stellen. Die „expanded Bed“-Chromatografie stellt hier aufgrund der hohen Beladungsmöglichkeit während des Auftrages und der einfachen Eluierbarkeit ein geeignetes Werkzeug zur Verfügung. Es gelang in der vorliegenden Arbeit die Proteinmenge eines 30 l Fermenters über eine Streamline-Säule mit einem Faktor von 5 bei einer Ausbeute von 25% aufzureinigen.

Die Expression heterologer Gene in gram-positiven Organismen, besonders in Streptomyceten, hat nach der Entwicklung entsprechender genetischer Werkzeuge besonders aufgrund der einfachen Sekretierbarkeit der Zielproteine, schnell an Bedeutung gewonnen (Anne und Van Mellaert, 1993; Brawner, 1994; Gilbert et al., 1995; Payne et al., 1990). Aber auch die leichtere Aufreinigung von Proteinen aus gram-positiven Organismen, bedingt durch das Fehlen mehrschichtiger Strukturen mit einer äußeren membranähnlichen Schicht, macht Streptomyceten als Wirt für rekombinante Expression interessant (Brock and Madigan, 1988). Diese Membranfragmente binden unspezifisch an denen für die Aufreinigung verwendeten

Matrices binden. Um diesen Vorteil auszunutzen, wurde die Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus* in dem „high copy“ Vektor pIJ 4123 in *Streptomyces lividans* TK 23 eingebracht und dort exprimiert. Auch bei diesem Expressionssystem gelang die FPLC Aufreinigung, allerdings waren die Ergebnisse *S. lividans* sowohl bezüglich der Expressionsleistung als auch bei den erzielbaren Raum-Zeitausbeute in *E. coli* deutlich besser.

5 Zusammenfassung

Die Zufallsmutagenese eröffnet eine Reihe neuer Möglichkeiten in der Biotechnologie, beispielsweise bei der Verbesserung oder Veränderung von Enzymeigenschaften, bei der Anpassung von Reporterproteinen oder auch bei der Optimierung von Antikörpern oder Bindungsstellen für die Proteinaufreinigung.

Der entscheidende Punkt bei allen Zufallsmutageneseansätzen ist die schnelle, effektive und reproduzierbare Durchmusterung einer großen Anzahl verschiedener Proteinvarianten. Mit der zunehmenden Komplexität der durchzuführenden Assays wächst die Notwendigkeit deren Durchführung zu automatisieren.

Ziel dieser Arbeit war die Bereitstellung von Methoden zur Assayautomatisierung und die Entwicklung neuer Screeningmethoden.

In zunehmendem Maße werden Assays in Mikrotiterplatten durchgeführt, da nur hier komplexere Assays mit Multireagenzzugaben, Waschschritten und photo-, lumino- oder fluorometrischer Auswertung möglich sind. Bei der Zufallsmutagenese müssen nun einzelne Klone in die Kompartimente der Mikrotiterplatte transferiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein System etabliert, welches es erlaubt, mit Hilfe eines Zellsorters einzelne, mutierte Gene tragende Klone direkt nach der Transformation in definierte „wells“ der Mikrotiterplatte abzulegen. Zu diesem Zweck wurde ein Plasmid konstruiert, welches neben dem „enhanced green protein (eGFP)“ als Transformationsreporter auch das zu mutierende Zielgen, in dem hier beschriebenen Modell eine Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus*, unter einem unabhängigen Reporter trägt.

Die Plasmide wurden mit Hilfe des Mutationsstammes *Epicurian coli* XL1-Red mutiert und in die Wirtszellen transformiert. Drei Stunden nach der Transformation konnte die Expression des egfp in den das Plasmid tragenden Zellen durch das Durchflußzytometer nachgewiesen werden. Die als transformiert erkannten Zellen wurden in diskrete Kompartimente der Mikrotiterplatte abgelegt. Die Zellen zeigten anschließend alle identisches Wachstums- und Expressionsverhalten, diese Eigenschaft läßt die Methode für Zufallsmutagenese-Experimente als geeignet erscheinen. Bei vielen Assaysystemen, beispielsweise bei der Suche nach erhöhter Stabilität, spiegelt eine höhere Proteinkonzentration höhere Stabilität vor, ist aber wie im beschriebenen Verfahren die gleiche Proteinmenge vorhanden, sind Vergleiche zwischen einzelnen Klonen deutlich einfacher zu ziehen.

Ein Problem auf welches das Verfahren angewendet wurde, war die Generierung neuer enzymatischer Aktivität. Aufgrund von Homologiebetrachtungen zwischen Lipasen und den

wirtschaftlich stark an Bedeutung gewinnenden Epoxidhydrolasen, wurde versucht in einer Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus* Epoxidhydrolase-Aktivität zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurde dem Reaktionsmechanismus der Epoxidhydrolase das katalytische Serin der Lipase gegen ein Aspartat ausgetauscht und versucht der veränderten Konfiguration des Substrates in der Oxyaniontasche durch Einführung eines Prolins Rechnung zu tragen. Sowohl die Einfachmutante BTL2 H147D, als auch die Doppelmutante BTL2 H147D T46P wurden sowohl mit dem Mutationsstamm, wie durch eine fehleranfällige PCR-Reaktion mutiert, in Mikrotiterplatten vereinzelt und dort auf Epoxidhydrolasefähigkeit hin untersucht. Der Test auf Epoxidhydrolase wurde mit Hilfe des *p*-(4-Nitrobenzyl)-pyridin Assays durchgeführt. Da der in dieser Arbeit entwickelte Assay auf Filterpapier nur eine ungenügende Sensitivität aufwies und des weiteren bei seiner Durchführung für das Hochdurchsatzscreening toxikologische Probleme aufwarf, wurde ein von F. Zocher entwickelter Mikrotiterplattenassay genutzt und dieser auf einem Robotersystem automatisiert.

Unter 2000 untersuchten Mutanten konnte allerdings mit diesem Test kein Klon identifiziert werden, welcher Epoxidhydrolase-Aktivität aufwies.

Eine weitere Problemstellung, die mit Hilfe der Zufallsmutagenese und einem automatisierbaren Assaysystem zu bearbeiten war, war die Entwicklung neuer Metallaffinitätstags für die „Immobilized metal affinity chromatography“ (IMAC) Proteinaufreinigung. Ausgehend von einer Metallbindungsstelle einer ATPase des Humanpathogens *Helicobacter pylori* mit dem Bindungsmotiv HxHxxxCxxC wurde über die Technik der degenerierten Primer eine Peptidbibliothek erstellt, deren Vertreter auf ihre Eignung für die Proteinaufreinigung hin untersucht werden sollten. Obwohl in diesem Fall nur sechs Aminosäuren variiert wurden, ist auch hier die Zahl der entstehenden Varianten so groß, daß ein Hochdurchsatz-Assay für die Charakterisierung der Bindungseigenschaften entwickelt werden mußte. Zu diesem Zweck wurde die Peptidbibliothek mittels PCR an das eGFP fusioniert, welches als Reporter für den Aufreinigungsprozeß dienen sollte. Die Mutanten wurden mittels eines Pickroboters in Mikrotiterplatten überführt, dort kultiviert und aufgeschlossen. Nach der Messung der Fluoreszenz des Zellüberstandes wurde dieser automatisiert auf Filterplatten, die mit der Metallaffinitätsmatrix gefüllt waren, übertragen. Mit Roboterunterstützung wurden daraufhin die üblichen Reinigungsschritte durchgeführt und nach Elution wieder die Fluoreszenz gemessen. Mit dieser Methode konnten also 96 Proteinaufreinigungen parallel durchgeführt und beobachtet werden. Es wurden Varianten mit verschiedenen Bindungseigenschaften beobachtet, Diese wurden in Spin-Präp-Säulen näher

charakterisiert. Ein Peptid, HeliTag genannt, mit der Sequenz **His-Asn-His-Arg-Tyr-Gly-Cys-Gly-Cys-Cys**, fiel durch besonders gute Bindungs- und Elutionseigenschaften auf. Es konnte gezeigt werden, daß durch diesen, neuen Tag, das eGFP sauber und in Ausbeuten von 40% aufgereinigt werden konnte. Ein Vergleich mit dem (patentierten) (His)₆-Tag zeigte, daß der HeliTag erst bei höheren Imidazolkonzentrationen eluiert und das somit eluierte Protein sauberer war. Es konnte weiter gezeigt werden, daß die Elution in einer scharfen Bande erfolgte und die Kapazität der Säule deutlich besser ausgenutzt werden konnte. Um die universelle Anwendbarkeit dieses Peptides zu zeigen, wurde dieser HeliTag auch an die Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus* fusioniert und diese ebenfalls über übliche FPLC-Aufreinigung sowie über eine Streamline-Säule aufgereinigt. Es ließen sich Ausbeuten von 35% bei einem Aufreinigungsfaktor von 45 erreichen. Für den Einsatz des HeliTags in der Aufreinigung pharmazeutischer Proteine konnte gezeigt werden, daß dieser vom Protein abspaltbar ist, was durch die Einführung einer Xa Proteaseschnittstelle gelang.

Um den Einsatz des HeliTags auch bei der heterologen Expression in grampositiven Organismen zu demonstrieren, wurde das Lipase-Metallbindungsstellen-Fusionsprotein in *Streptomyces lividans* überexprimiert. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die Expression wie auch die Aufreinigung durch IMAC-Chromatographie möglich

6 Material und Methoden

6.1 Material und Geräte

6.1.1 Chemikalien und Enzyme

Trypton	DIFCO-Laboratories, Detroit, USA
Agar	Fluka, Buchs, Schweiz
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galactosid	
Bromphenolblau	
Coomassie Brilliant Blue R250	
Dimethylsulfoxid	
Dithiothreitol	
Ethylendiamintetraacetat, Natriumsalz	
Formaldehyd 37 %	
Formamid	
Hefeextrakt	
Isopropyl-β-thio-galaktopyranosid (IPTG)	
Lysozym	
Magnesiumchlorid	
Malzextrakt	
Methanol	
Natriumacetat	
Natriumchlorid	
Natriumhydroxid	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	
PEG 6000	
Salzsäure 35%	
Silbernitrat	
N, N, N', N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	
1 kb-Ladder (Standard für Agarosegele)	Gibco BRL GmbH, Eggenstein
Restriktionsendonukleasen und Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	

Taq-Polymerase

Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
Big Dye Sequencing Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
QIAprep Spin Miniprep-Plasmid Präparations-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN Blut- u. Zellkultur-DNA Kit	
QIAGEN Midi-Plasmid-Präparations-Kit	
QIAquick Spin Gel Extraktion Kit	
Essigsäure 100%	Riedel-de Haen, Seelze
Ethanol 100%	
Glycerin	
Ampicillin, Natriumsalz	Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	
Glycin	
Rotiphorese NF-10x TBE-Puffer	
Rotiphorese NF-Harnstoff	
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 30% für SDS-PAGE	
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40% für Sequenzierung	
Agarose	Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg
<i>Pfu</i> -Turbo Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Pfu</i> -Polymerase Puffer	

6.1.2 Verwendete Geräte

Analytische Dünnschichtchromatographie

Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck
-------------------------------	-------

Präparative Säulenchromatographie

Glassäulen verschiedener Größe,

Kieselgel A 60,	Merck
-----------------	-------

Korngröße 0,04 – 0,063 mm

Agarose-Gelelektrophorese

DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell, Mini Sub Cell GT	BioRad
Video Copy Processor P66E	Mitsubishi
BWM 9X Monitor	Javelin Electronics
UV-Leuchttisch	MWG-Biotech
Brutschränke	
WTE	Binder
UM 500	Memmert
DNA-Sequenzierung	
373A DNA Sequencer	Applied Biosystems
Macintosh Quadra 650	Apple
Inkubatoren	
HT-Schüttelinkubator	Infors
Kernresonanzspektroskopie	
AC 250 F	Bruker
Netzgeräte	
Power Pac 3000, Power Pac 300, Model 200/2.0 Power Supply	BioRad
SDS-PAGE	
Minigel-Twin G42	Biometra
Model 583 Gel Dryer	BioRad
PCR-Geräte	
DNA Thermocycler	Eppendorf
Pickroboter	
BioPick	BioRobotics
Pipettierroboter	
Beckman 2000 mit Sideload und Inkubator, Software BioWorks V 2.2	Beckman
pH-Meter	
Digital pH Meter pH525	WTW
Photometer	
UV/VIS-Spektrometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
TitertekPlus für Mikrotiterplatten	ICN
Thermomixer	

Thermomixer 5436	Eppendorf
Waagen	
Basic, MC1 Research RC 210 D	Sartorius
Wasserbad	
Wasserbad B3	Haake-Fisons
Zellaufschluß	
Branson Sonifier 250	Branson
Zentrifugen	
Eppendorf Zentrifuge 5417 C	Eppendorf
Eppendorf Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Universal 30 F	Hettich
KR 22i (Rotor: AK 500-11, 155 mm)	Jouan
G 412	Jouan
Sorvall RC-5B (Rotor: SA 578)	Du Pont Instruments

6.1.3 Verwendete Datenbanken und Software

Software	URL bzw. Hersteller
Proteinstrukturen	http://www.pdb.bnl.gov
Protein Database (PDB)	
Pickroboter	Biorobotics
BioPick	
Pipettierroboter	Beckman
Bioworks 2.2	
Sequenzalignement	http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html
Multialign	
Protein-Gensequenzierung	http://expasy.hcuge.ch/srs5
Sequence-retrival System	

6.1.4 Chemische Methoden

Chirale Kapillargaschromatographie

Säulenmaterial: FS-Cyclodex β -I/P CS Fused Silica Kapillarsäule (Heptakis-(3-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-pentyl)- β -cyclodextrin), 50 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Trägergas: H₂

Injektor: Split Injektor, Split-Verhältnis 1:100, Temperatur 200 ° C

Detektor: Flammenionisationsdetektor, Temperatur 200° C

6.1.5 Mikroorganismen

Spezies	Stamm	Charakteristika	Literatur
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	SupE44 Δ lacU169 (ϕ 80Z Δ M15)hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	
<i>Escherichia coli</i>	JM105	SupE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thi Δ (lac-proAB) F' [traD36 pro AB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15]	
<i>Escherichia coli</i>	Epicurian XL1-Blue	recA1, hsdR17, relA1, lac[F' lacI ^q ZM15 Tn10(Tet ^r)]	Stratagene
<i>Escherichia coli</i>	Epicurian XL1-Red		Stratagene
<i>Streptomyces lividans</i>	TK23	spc-1, plasmidfrei	(Hopewood et al., 1983)

6.1.6 Plasmide

Name	Mikroorganismus	Größe	Wichtige Eigenschaften	Quelle
pEGFP	<i>E. coli</i>	3,4 kB	Enhanced green fluorescent protein, Amp ^r , pUC 19ori	Clontech
pCYTEXP1	<i>E. coli</i>	5,0 kB	Amp ^r , λ-Promotor	
pCYTEXP1-BTL2	<i>E. coli</i>	6,2 kB	Amp ^r , λ-Promotor, Lipase aus <i>Bacillus thermocatenulatus</i>	
pUC 18/19	<i>E. coli</i>	2,9 kB	Amp ^r , lac-Promotor	
pIJ4123	Streptomyces	9,2 kb	Kan ^r , thio-Promotor, redD	

6.1.7 Primer

Name	Sequenz
Gfp _{xa} M14_new1	GCAATACCATGGGGCATAATCATCGTTATGGTTGTGGTTGTTGTA TAGAAGGACGTGTGAGCAAGGGC
BTL _{xa} M14_new1	GCAATACCATGGGGCATAATCATCGTTATGGTTGTGGTTGTTGTA TAGAAGACGTGCATCCCCACGC
Egfp-N Seq	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCA
BTL_M14_1_new	CTGGAGACTCATATGGGGCATAATCATCGTTATGGTTGTGGTTGT TGTGCATCCCCACGC
BTL-M14_2_new	CTACTTACTTAGGATCCCTTCATTAAGGCC
Pat1_new	GCAATACCATGGGGCATATTCATAATCTTGATTGTCCTGATTGTG TGAGCAAGGGCGAG
er1	GAGACTGAGCTCGCATCCCCAC
er2	GTGGGGATGCGAGCTCCGTCTC
GFP His1	GCAATACCATGGGGCATCATCATCATCATCATGGTAGCAAG GGCGAG

6.1.8 Medien

Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Medium	1% (m/v) Trypton, 0,5% (m/v) Hefeextrakt, 1% (m/v) NaCl, pH7.5
TSS	10% (m/v) PEG 6000, 5% (v/v) DMSO, 50mM MgCl ₂ gelöst in 100 ml LB Medium
S-Medium	4% (m/v) Pepton, 4% (m/v) Hefeextrakt, 4% (m/v)K ₂ HPO ₄ , 2% (m/v)KH ₂ PO ₄ , 10% (m/v) Glycin; nach dem Autoklavieren 10% (m/v) Glucose, 0,5% (m/v) MgSO ₄ *7H ₂ O
R5-Medium	10,3% (m/v) Saccharose, 1% (m/v) Glukose, 0.025% (m/v) K ₂ SO ₄ , 1% (m/v) MgCl ₂ , 0,01% (m/v) Casaminoacids, 0,5% (m/v) Hefeextrakt, 5,73% (m/v) TES, 18% (m/v) Agar, 0,2% (v/v) Spurenelemente

6.1.9 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
LI-Puffer	25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA pH 8, 300 mM Succrose
P-Puffer	103 g Saccharose (getrennt Autoklavieren), 2,0 ml Spurenelement Lösung, 100ml TES (pH 7,2), 10 ml MgCl ₂ (1 M), 10ml CaCl ₂ (250 mM), 10 ml K ₂ SO ₄ (140 mM), 10 ml KH ₂ PO ₄ (40 mM)

6.1.10 Antibiotika und andere Stammlösungen

Medienzusatz	Stammlösung	Anwendungskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Thiostrepton	50 mg/ml in DMSO	50 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
IPTG	200 mg/ml in H ₂ O	200 µg/ml
Xgal	20 mg/ml in <i>N,N</i> -Dimethylformamid	20 µg/ml

6.2 Biologische Methoden

6.2.1 Stammhaltung

Die Stämme werden auf Agarplatten (LB optional mit Antibiotikum oder Malzmedienplatten) bei 30°C oder 37°C über Nacht kultiviert und bei 4°C gelagert.

6.2.2 Anlegung von Glycerinkulturen

6.2.2.1 *E. coli*

Eine 3 ml Übernachtskultur mit Ampicillin und LB-Medium wird bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 im Schüttler bei 37°C inkubiert. 500 µl der Kultur werden mit einem Volumen Glycerin versetzt und können bei –80°C gelagert werden.

6.2.2.2 *Streptomyceten*

Eine 3 ml Übernachtskultur mit Ampicillin und LB-Medium wird 48 h bei 30°C kultiviert. Zu 500 µl Kultur werden 500 µl Glycerin gegeben, diese Glycerinkultur kann bei –80°C gelagert werden.

6.2.3 Anzucht in Flüssigmedien

6.2.3.1 *E. coli*

Ausgehend von einer *E.coli*-Einzelkolonie von der Agarplatte werden 3 ml LB-Medium mit Selektionsmedium (100 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Daraus werden Kulturen mit LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und im Schüttler bei 37°C und 210 U/min bis zum Erreichen der gewünschten optischen Dichte inkubiert.

6.2.3.2 *Streptomyceten*

Bei Streptomycetenstämmen wird entweder von Agarplatte oder von Sporen in 3 ml Malzmedium angeimpft und 48 Stunden bei 30°C inkubiert. Daraus werden Kulturen mit Malzmedium im Verhältnis 1:100 angeimpft und im Schüttler bei 30°C und 210 U/min inkubiert.

6.2.4 Messung der Zelldichte

Das Wachstum von *E. coli* wird durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 578 nm gegen Medium verfolgt.

Für *E. coli*-Kulturen gilt im Bereich OD_{578} von 0-0,3: $OD_{578}=5 \times 10^8 \times$ (Zellen/ml).

6.3 Molekularbiologische Methoden

6.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus *Escherichia coli*

6.3.1.1 Schnellisolierung von plasmidischer DNA

Die Schnellisolierung von plasmidischer DNA aus *Escherichia coli* erfolgt durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Durch Zentrifugation (10 min, 20000 x g) werden die Zellen einer 2 ml Übernachtskultur sedimentiert. Das Pellet wird in 150 µl Puffer (25 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA) resuspendiert, anschließend werden 250 µl Lysepuffer (0,2 M NaOH, 1% SDS) zugegeben, sanft geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Proteine werden durch 150 µl 3 M Na-Acetat gefällt (5 min auf Eis) und zusammen mit den Zelltrümmern durch Zentrifugation (10 min, 20000 x g) abgetrennt. Der klare Überstand wird abgenommen und mit 700 µl Chloroform/Phenollösung (1:1) gemischt. Nach Zentrifugation (1 min, 20000 x g) wird die wäßrige Phase in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, die DNA durch Zugabe von 800 µl Ethanol präzipitiert und anschließend sedimentiert (10 min, 20000 x g, 4°C). Das erhaltene Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, die DNA getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst.

6.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit Anionenaustauscher Säulen

Zum Erhalt sauberer Plasmid-DNA (für Sequenzierungen, Ligationen...) wird das Qiagen „Prepsin Plasmid Isolation“[®] Kit eingesetzt. Auch hier wird die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse freigesetzt, die DNA wird aber anschließend durch Chromatografie an Anionenaustauscher-Säulen gereinigt, sie ist frei von DNA, RNA und Phenol und kann direkt zum Sequenzieren oder Klonieren eingesetzt werden.

6.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren aus Streptomycceten

6.3.2.1 Mini Lyse

Für die Isolierung kleiner Plasmidmengen wird das Verfahren nach Kieser angewendet (Kieser, 1984). Dazu werden die Zellen einer drei bis vier Tage alten Kultur mit einer Insulinspritze homogenisiert und anschließend 1 min zentrifugiert (20000 x g, 4°C). Das Pellet wird in 500 µl L1/Lysozym Lösung durch vortexen resuspendiert, anschließend wird 60 min bei 37°C inkubiert. Die alkalische Lyse erfolgt durch Zugabe von 250 µl 0,3 N NaOH / 2% (m/v) SDS und 15 min Inkubation bei 37°C. Nach Abkühlung auf RT wird mit 300 µl Phenol/Chloroform (pH 5,4) ausgeschüttelt und zentrifugiert (5 min, 20000 x g). Die wäßrige Phase wird nochmals durch Zugabe von 50 µl Phenol/Chloroform (pH 5,4) deproteinisiert. Nach Zentrifugation (5 min, 20000 x g) wird die DNA durch Zugabe von 650 µl Isopropanol zur wäßrigen Phase gefällt. Das DNA-Pellet wird in 50 µl TE Puffer resuspendiert und die Lösung mit 25 µl Phenol/Chloroform (pH 8) versetzt. Nach Zentrifugation (5 min, 20000 x g) wird die wäßrige Phase abgenommen und die DNA präzipitiert.

6.3.2.2 Gesamt-DNA Isolierung (Altenbuchner und Cullum, 1984)

Die Streptomycceten werden 3 Tage in TSB-Medium mit 1% Glycin bei 30°C kultiviert. 20 ml der Kultur werden abzentrifugiert (5 min, 4000g) und das Pellet in 5 ml L1 Lösung (10 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Die Suspension wird unter leichtem Schütteln 30-45 min bei 37°C inkubiert, anschließend werden 2 ml 5% SDS zugegeben und die Mischung gevortext. Nach 10minütiger Inkubation bei 60°C werden 2 ml Phenol/Chloroform (pH 8) zugegeben und kräftig geschüttelt. Nach 5 min auf Eis wird die Lösung zentrifugiert (15 min, 20000 x g) und der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von einem Volumen Isopropanol und einem 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat kann die ausgefallene DNA mit einer Pipettenspitze gefischt werden. Die DNA wird anschließend kurz in 70% Ethanol gewaschen und in 0,5-1,0 ml TE Puffer aufgenommen.

6.3.3 Alkoholfällung

Zur Fällung von DNA werden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) zur DNA-Lösung gegeben und gemischt, anschließend werden 2,5 Volumen eisgekühltes 100% Ethanol zugegeben. Die Lösung wird 20 min auf Eis inkubiert und bei 20000 x g 20 min zentrifugiert,

das erhaltene Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und für 20 min bei 37°C oder im Vakuum getrocknet. Die DNA wird in destilliertem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

6.3.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Für Ligationen und Restriktionsverdäue wurde die DNA über Gelelektrophorese abgeschätzt. Für die Sequenzierung wurde die DNA Menge exakt über eine Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Eine Absorption von 1,0 entspricht einer DNA-Menge von 50 µg (Ausubel et al., 1993).

6.3.5 Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung sowie zur Reinigung von DNA wird eine Gelelektrophorese durchgeführt (Sambrook et al., 1989). DNA-Fragmente bis zu 0,5 kB lassen sich auf einem 1% (w/v) Agarose Gel auftrennen, für kleinere Fragmente wird ein 2%iges (w/v) verwendet. Die Elektrophorese wird bei 120 V in Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3) durchgeführt. Die DNA wird mit Ethidiumbromid (1µl Ethidiumbromid in 10 ml Agarose) gefärbt und unter UV (254 nm) sichtbar gemacht.

6.3.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Abtrennung von unerwünschter DNA können einzelne DNA-Banden aus dem Agarosegel eluiert werden. Die Elution der DNA wird mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Gelstück wird ausgeschnitten, gewogen und in 3 Volumen QX1 zur Masse des Gelstückes (100 mg = 100 µl) 10 min bei 50°C gelöst. Es wird 1 Volumen Isopropanol zugegeben und die Probe in eine QIAquick Säule, die sich in einem 2 ml Auffanggefäß befindet, überführt. Die Säule wird eine Minute bei 20000 x g zentrifugiert und der Durchfluß verworfen, nach Zugabe von 750 µl Puffer PE wird nochmals eine Minute zentrifugiert, der Durchfluß nochmals verworfen, die anschließende Zentrifugation (1 min) dient der vollständigen Entfernung letzter PE-Reste. Die Säule wird in ein sauberes 1,5 ml Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 50 µl und einminütige Zentrifugation eluiert.

6.3.7 In vitro Manipulation von DNA

Alle Enzyme zur DNA-Modifikation und -Spaltung werden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Um Selbstligation eines Plasmids nach der Spaltung mit nur einem Restriktionsenzym zu verhindern, werden diese Plasmide mit alkalischer Phosphatase (CIAP) behandelt. Die Reaktion wurde direkt im Spaltungsansatz für eine Stunde bei 37°C durchgeführt. Alle Enzyme werden entweder durch Erhitzen auf 75°C (10 min), Phenolextraktion, Gelelution oder DNA-Fällung inaktiviert.

6.3.8 Auffüllreaktion mit Hilfe der „Klenow Polymerase“

Um „blunt ends“ nach einer Restriktionsspaltung mit einem „sticky end“ schneidenden Enzym zu erzeugen, wird nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym 1 µl dNTP Mix (0,5 mM jedes Nukleotid) und 1 µl Klenow Polymerase zugegeben, es wird 15 min bei 30°C inkubiert und das Enzym anschließend 10 min bei 75°C inaktiviert, es schließt sich eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase an.

6.3.9 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wird zur Amplifikation eines DNA Abschnittes zwischen zwei bekannten DNA-Sequenzen benutzt. In den ersten Publikationen (Mullis et al., 1986; Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1985) wurde noch die Klenow Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli* verwendet, später wurde dieses Enzym durch die thermostabile Polymerase aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* ersetzt (Saiki et al., 1988).

Komponente	Volumen
10 x Reaktionspuffer (100 mM KCl, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 200 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM MgSO ₄ , 1% (w/v) Triton® X-100)	10 µl
DNTP-Mix (10 mM jedes Oligonukleotids)	8 µl
DNA Template	x µl (ca. 0.1 µg)
Primer 1	1 µl (100 pmol)
Primer 2	1 µl (100 pmol)
25 mM Mg ₂ Cl	8 µl
H ₂ O	x µl
Taq-Polymerase	1 µl
Gesamtvolumen	100 µl

Tabelle 6.1: Zusammensetzung einer typischen (high fidelity) PCR

	Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturieren		94°C	4 min	1
	Denaturierung	95°C	1,50 min	
Synthese	Annealing	50-64°C	2 min	25-30
	Extension	72°C	1,50 min	
Auffüllen		72°C	4 min	1

Tabelle 6.2: Typisches PCR-Programm

6.3.10 Einführung von Punktmutationen durch die QuickChange® Methode

Für die Einführung von Punktmutationen wird die QuickChange® (Stratagene) Methode angewandt (s. Abbildung 6.1). Der Basenaustausch wird in einem Thermocycling (Tabelle 6.3; Tabelle 6.4) durch zwei Primer (3′-5′ und 5′-3′ komplementär), welche die gewünschte Mutation tragen, eingeführt. Um das (methylierte) Ausgangsplasmid zu zerstören, wird direkt nach dem Cycling 1 µl *DpnI* zu dem Ansatz gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die zurückbleibenden (nicht methylierten), linearisierten, mutierten Plasmide werden ohne Ligationsschritt direkt in ultrakompetente *Epicurian Coli* XL1-Blue (Stratagene) transformiert.

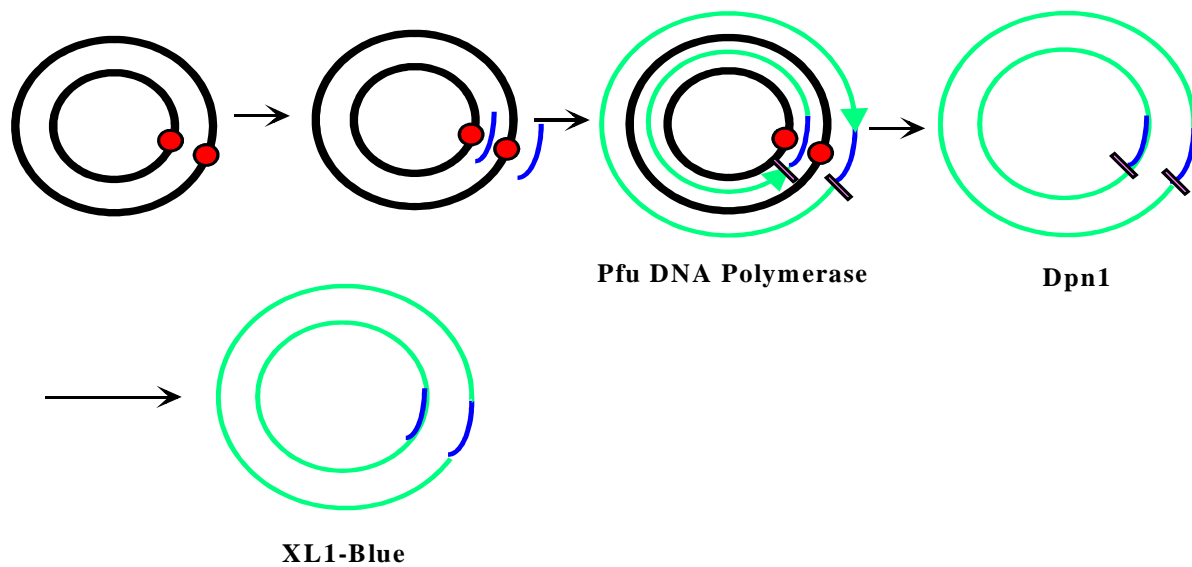


Abbildung 6.1: Prinzip der QuickChange® Methode

Komponente	Menge
10 x Pfu Puffer	10 μ l
DNTP-Mix (10mM jedes Oligonucleotids)	8 μ l
DNA Template	x μ l (ca. 0,1 μ g)
Primer 1	1 μ l (100 pmol)
Primer 2	1 μ l (100 pmol)
<i>Pfu</i> -Polymerase	0,5 μ l
Wasser	x μ l (auf 100 μ l)

Tabelle 6.3: Reaktionsansatz für die QuickChange® Methode

	Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturieren		94°C	4 min	1
	Denaturierung	95°C	1 min	
Synthese	Annealing	50-64°C	2 min	25
	Extension	72°C	1 min je 1000 bp des Plasmids	

Tabelle 6.4: Cycling Reaktion für die QuickChange® Methode

6.3.11 Punktgerichtete Mutagenese durch PCR („Drei Primer Methode“)

Eine andere in dieser Arbeit verwendete Methode zur Punktmutagenese ist die zweistufige PCR oder die „Drei Primer Methode“ (Mikaelian und Sergeant, 1992) (s. Abbildung 6.2). Dazu werden drei universelle Primer und ein Mutationsprimer benötigt, von denen der eine (SDM1) am 5'-Ende des zu mutierenden Gens und die beiden anderen (SDM2 und SDM3) am 3'-Ende binden. Der Mutageneseprimer (Mut) beinhaltet die einzuführende Mutation. SDM2 besitzt an seinem 5'-Ende Basen, welche nicht komplementär zu den Basen des Ausgangsgens sind. Es werden zwei getrennte PCR-Reaktionen mit den Primern SDM1 und SDM2 bzw. SDM3 und Mut durchgeführt. Die PCR-Fragmente werden über das Agarosegel aufgereinigt, in gleichen Anteilen gemischt und als Template für eine dritte PCR mit den Primern SDM1 und SDM3 eingesetzt. Das daraus erhaltene Fragment enthält das Gen mit der einzuführenden Mutation.

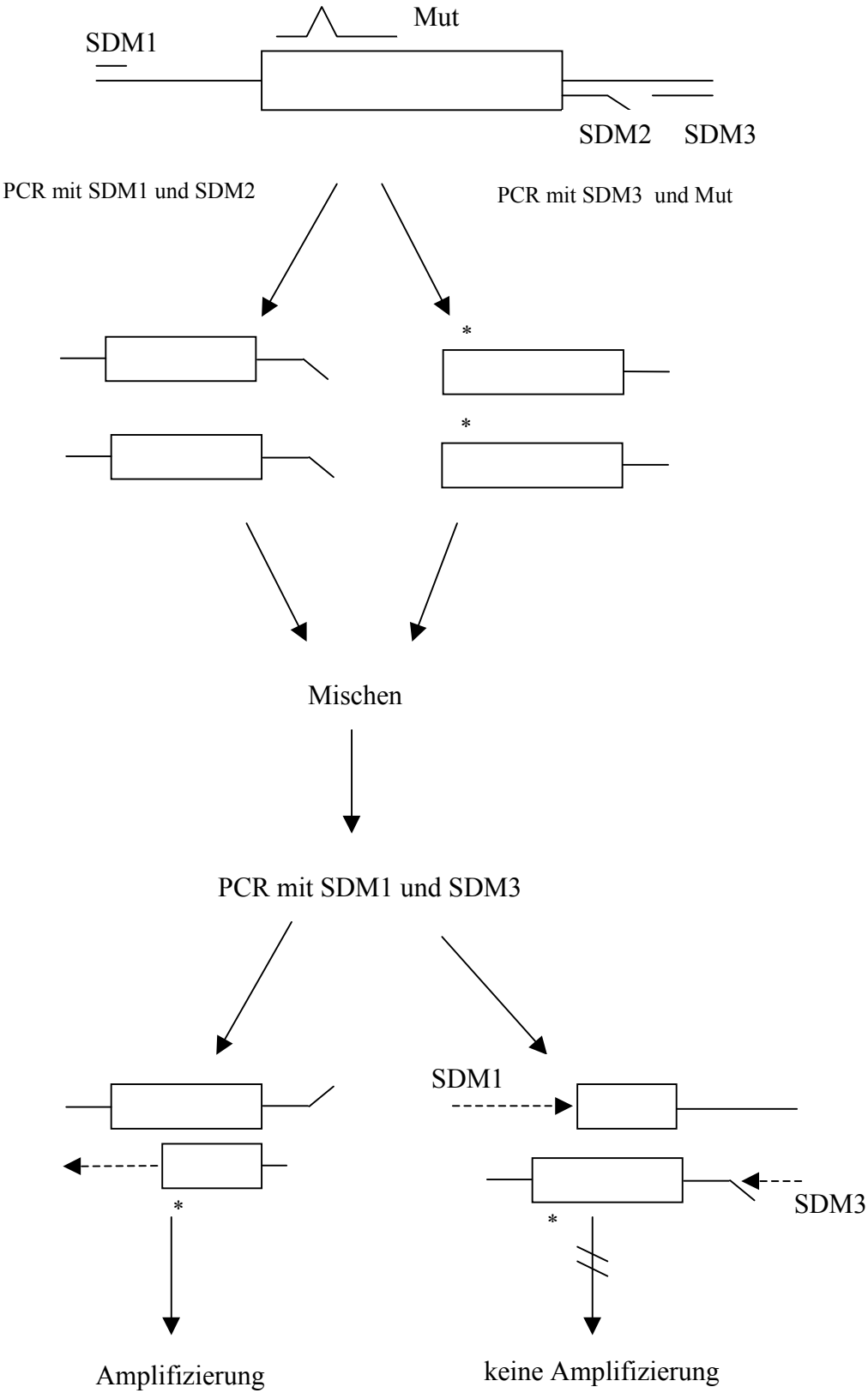


Abbildung 6.2: Prinzip der „Drei Primer Methode“

6.3.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wird mit Hilfe der auf die Fluoreszenz basierenden „Cycle Sequencing Methode“ durchgeführt. Für die Sequenzierung wird der „Terminator Ready Reaction Mix“ (Tabelle 6.5) mit der Ampli-Taq-FS (Perkin Elmer) und das 373 DNA-Sequenzierungssystem (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers benutzt. Die Sequenzierungsprimer wurden aus der bekannten Sequenz abgeleitet.

Komponente	Volumen
Terminator Ready Reaction Mix	8 µl
Primer	4 µl (1 pmol)
DNA	500 pmol
H ₂ O	x µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 6.5: Zusammensetzung der Sequenzierungsreaktion

	Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung		95°C	7 min	1
	Denaturierung	95°C	40 s	
Synthese	Annealing	55°C	30 s	25
	Extension	60°C	4 min	
Auffüllen		60°C	4 min	1

Tabelle 6.6: PCR-Programm der Sequenzierungsreaktion

Nach Ethanol-fällung der DNA wird das Pellet in 4 µl Ladepuffer (4 x Formamid, 1 x mM EDTA, pH 8) aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert.

Die Glasplatten des Sequenziergerätes werden mit Alconox, Wasser und Isopropanol schlierenfrei geputzt. Die Acrylamidlösung (30 g Harnstoff, 9 ml 40% (w/v) Acrylamid, 6 ml 10x TE-Puffer und 22,5 ml H₂O) wird gefiltert (0,2 µm), entgast und es werden zum Start der Polymerisation 24 µl TEMED und 180 µl 10% (w/v) APS zugegeben.

Die mit vier verschiedenen Fluorophoren markierten DNA-Fragmente durchlaufen einen Laserstrahl, das senkrecht zu diesem Strahl emittierte Fluoreszenzlicht wird von Photodioden

hinter dem Gel detektiert und die Intensitäten der einzelnen Fluorophore von der Software in Kurven umgewandelt.

6.3.13 Transformation von *Escherichia coli*

6.3.13.1 Transformation durch Elektroporation

Elektrokompetente Zellen werden nach Dower (Dower et al., 1988) hergestellt. Eine 100 ml LB-Kultur wird 1: 100 aus einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 kultiviert. Die Zellen werden durch fünfminütige Zentrifugation bei 11000 x g (4°C) sedimentiert und das Pellet mit 100 ml eiskaltem Wasser gewaschen, nach erneuter Zentrifugation und Waschen mit 50 ml eiskaltem Wasser werden die Zellen in 50 ml 10% (v/v) Glycerin suspendiert und nach nochmaliger Zentrifugation in 250 µl 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Zellen lassen sich bei -70°C für 6 Monate lagern.

Für die Elektroporation werden 40 µl Zellen mit 1-2 µl DNA versetzt und die Mischung eine Minute auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ohm gepulst. Es wird sofort 1 ml LB-Medium zugegeben, die Zellen werden in ein 1 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 30 min bei 37°C regeneriert, anschließend wird der Ansatz ausplattiert.

6.3.13.2 TSS-Methode (Chung et al., 1989)

50 ml LB-Medium werden aus einer Übernachtskultur 1:100 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 kultiviert. Die Zellen werden durch 10 min zentrifugieren bei 11000 x g abgetrennt und in 2 ml TSS Medium vorsichtig resuspendiert. Zu je 200 µl Zellsuspension werden 1-20 µl DNA-Lösung gegeben und die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Probe 45 s auf 42°C erhitzt und sofort 800 µl LB-Medium zugegeben. Zur Regeneration werden die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend ausplattiert.

6.3.14 Protoplasten-Transformation bei Streptomycceten

Die Transformation von Streptomycceten erfolgt durch eine Polyethylenglycol-induzierte DNA-Aufnahme von Protoplasten. Die Protoplasten werden auf einem speziellen Medium regeneriert und durch Übersichten mit Weichagar, der zehnfach konzentriertes Antibiotikum enthält, selektioniert.

6.3.14.1 Protoplastierung (Hopewood et al., 1983)

Streptomycces lividans wird zwei bis drei Tage in S-Medium + 1% Glycin kultiviert und anschließend abzentrifugiert (10 min, 4000 x g). Das Zellpellet wird mit 10 ml TE/Saccharose (10%) gewaschen und vorsichtig in 10 ml P-Puffer (1 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Die Suspension wird 15-60 min bei 30°C inkubiert und regelmäßig mikroskopisch auf den Fortschritt der Protoplastierung hin untersucht. Bei weitgehender Protoplastierung wird die Lyse durch Zugabe von 20 ml eisgekühltem P-Puffer abgestoppt und die Lösung durch sterile Watte filtriert.

Das Protoplasten Filtrat wird zentrifugiert (5 min, 6000 x g) und das Pellet wieder in 2 ml eisgekühltem P-Puffer aufgenommen. Die Suspension wird in 200 µl Aliquots aufgeteilt und kann entweder direkt zur Transformation verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

6.3.14.2 Standardtransformation (Kieser et al., 1982)

Die Protoplasten werden langsam auf Eis aufgetaut. Zu 200 µl Protoplasten-Suspension werden 10 µl DNA-Lösung und 500 µl T-Puffer gegeben und die Mischung wird sofort auf vier R5-Platten ausgestrichen. Zur Regenerierung werden die Zellen 16-20 h bei 30°C inkubiert und anschließend mit 2,5 ml Weichagar mit zehnfacher Antibiotikakonzentration zur Selektion überschichtet.

6.4 Biochemische Methoden

6.4.1 SDS-PAGE

Gelelektrophoresen werden nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Es werden 12,5% Acrylamid Gele verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist Tabelle 6.7 zu entnehmen. Die Polymerisation wird durch Zugabe von 4 µl TEMED gestartet.

	Zusammensetzung
Trenngel	2,0 ml 4 x Lower Tris (1,5 M Tris/HCl, 4% (m/v) SDS pH 8), 3,33 ml Acrylamid (30%(m/v)), 2,67 ml H ₂ O, 40 µl 10%(m/v) APS
Sammelgel	1,0 ml 4 x Upper Tris (0,5 M Tris/HCl, 4% (m/v) SDS pH 6,8), 0,52 ml Acrylamid (30% (m/v)), 2,47 ml H ₂ O, 40 µl 10% (m/v) APS
SDS Probenpuffer	20% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 6% (m/v) SDS, 0,0025% (m/v) Bromphenolblau in 1 x Upper Tris
Elektrodenpuffer	25 mM Tris-HCl, 0,192 M Glycin, 0,1% (m/v) SDS pH 8,4

Tabelle 6.7: Lösungen für die SDS-PAGE

Die zu analysierenden Proben werden vor der Gelelektrophorese 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung 5 min auf 95°C erhitzt. Als Standard dient ein Gemisch aus Phosphorylase b 97,4 kDa, Serumalbumin 66,2 kDa, Ovalbumin 45,0 kDa, Carbonic anhydrase 31 kDa, Trypsin inhibitor 21,5 kDa und Lysozym 14 kDa. Die Auftrennung wird nach 10 min Konzentrationsphase bei 10 mA, 60 min bei 25 mA durchgeführt. Anschließend wird das Gel mit Coomassie Blue Lösung (0,1% Coomassie, Brilliant Blue R250, 10% Essigsäure, 30% Methanol) gefärbt. Die Entfärbung wird in 30% Methanol, 10% Essigsäure durchgeführt.

6.4.2 Pharmacia PHAST-PAGE®

Für empfindlichere Nachweise von Proteinen wurde das PHAST ® System von Pharmacia sowie die dazugehörigen Fertiggele und Pufferstreifen nach Angabe des Herstellers verwendet.

6.4.3 Lipaseaktivitätsfärbung

Um Lipaseaktivität in einem Proteingel nachzuweisen, wird das Gel 30-60 min lang in 50 ml 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7,5 mit 0,5% (w/v) Triton® X-100 renaturiert und anschließend durch Mischung einer Lösung von 20 mg α -Naphthylacetat (in 5 ml Aceton gelöst) in 50 ml 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7,5 und einer Lösung von 50 mg Fast Red in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7,5 gefärbt.

6.4.4 Western Blot und N-terminale Sequenzierung

Für die Bestimmung der N-terminalen Sequenz wird ein automatisierter Edmann-Abbau (Edman, 1950) eingesetzt. Um das Protein auf die PVDF-Membran zu blotten (Matsudaira, 1987), wird das Gel 15 min in Kathodenpuffer (25 mM Tris, 10% (v/v) Methanol, pH 9,4) angefeuchtet. Drei Filterpapiere werden ebenfalls in drei verschiedenen Puffern equilibriert, Filter 1 in Anodenpuffer 1 (0,3 M Tris, 10% (v/v) Methanol, pH 10,4), Filter 2 in Anodenpuffer 2 (25mM Tris, 10% (v/v) Methanol, pH 10,4), Filter 3 in Kathodenpuffer. Eine PVDF-Membran wird auf Gelgröße zugeschnitten und einige Sekunden in 100% Methanol geschwenkt, anschließend wird die Membran 2-3 min in Anodenpuffer 2 equilibriert. Der Blot wird wie folgt aufgebaut: 1. Filterpapier 1 in Anodenpuffer, 2. Filterpapier 2 in Anodenpuffer 2, 3. PVDF-Membran in Anodenpuffer 2, 4. Gel in Kathodenpuffer, 5. Filterpapier 3 in Kathodenpuffer. Nach 15 min Blotting bei 15 V wird die Membran mit Coomasie (0,025% Coomasie Brilliant Blue R-250 gelöst in 40% (v/v) Methanol) gefärbt und anschließend 1-5 min in 50% (v/v) Methanol entfärbt, bis die Banden sichtbar werden. Die Membran wird mehrmals gewaschen und anschließend getrocknet. Die interessierenden Banden werden ausgeschnitten und mit dem Gas-Phasen-Sequenzer Applied Biosystems 470A nach Herstellerangaben sequenziert.

6.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des „BCA-Protein Assay Reagent-Kits“ von Pierce. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} durch Proteine zu Cu^+ , welche mit Bicinchoninic acid (BCA) unter Bildung eines bei 562 nm absorbierenden Komplexes detektiert werden können. Mit dem „enhanced Assay“ können Proteinkonzentrationen von 5-250 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt werden.

6.5 Proteinaufreinigung über „Immobilized Metal Affinity Chromatografie“ (IMAC)

6.5.1 Im Hochdurchsatzscreening (HTS)

Um eine Vielzahl von vergleichenden Proteinaufreinigungen durchzuführen, werden „96 well“ Multiscreen Platten (0,2 µm) verwendet. Die chelatisierende Matrix (NTA-Sepharose) wird durch Rühren suspendiert und es werden 4 x 250 µl in jedes „well“ gegeben. Die Platten werden auf den Biomek 2000 überführt und die weiteren Schritte erfolgen automatisiert. Jedem Pipettierschritt schließt sich eine zweiminütige Zentrifugation (400 x g) oder ein 30sekündiges Vakuumanlegen mit Hilfe des Beckman „Vacuum Manifolds“ an. Die „Säulen“ werden drei mal mit 250 µl Wasser gewaschen und anschließend mit 250 µl der Metalllösung beladen. Anschließend werden die „Säulen“ dreimal mit 250 µl Laufpuffer (50mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, pH 7,5) equilibriert. Anschließend werden 200 µl des Zellaufschlusses (s. Abschnitt) in jedes „well“ pipettiert und das ungebundene Protein mit zweimal 250 µl Laufpuffer ausgewaschen. Die Elution erfolgt nach Zugabe von 100 µl 0,5 M Imidazol in 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, pH 7,5 in schwarze „96 well“ Mikrotiterplatten. Die „Säulen“ lassen sich durch Zugabe von 250 µl 50 mM EDTA, 1 M NaCl in Wasser pH 8 wieder regenerieren.

6.5.2 In Qiagen Ni-NTA Spin Columns®

Um 25 ml Kultivierungen aufzureinigen, wurden Qiagen Ni-NTA Säulen verwendet. Um die Säule zu equilibrieren werden 600 µl Laufpuffer (50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, pH 7,5) auf die Säule gegeben und 2 min bei 960 x g zentrifugiert. Anschließend werden 750 µl Zellaufschluß (s. Abschnitt 6) aufgebracht und wieder 2 min bei 960 x g zentrifugiert. Die Säule wird anschließend zweimal mit 750 µl Laufpuffer (jeweils 2 min bei 960 x g zentrifugieren) gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt durch Zugabe von zweimal 200 µl 0,3 M Imidazol in 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl pH 7,5.

6.5.3 FPLC-Aufreinigungen

Große Proteinmengen werden über eine Glassäule (Innendurchmesser 16 mm) aufgereinigt. Die Säule wird an zwei peristaltische Pumpen mit Mischer zum Aufbringen eines Gradienten auf die Säule, sowie einen UV-Detektor (LKB UV-MII), einen Schreiber (LKB RIC 102) und einen Fraktionssammler (LKB Frac-200) angeschlossen. Die Säule wird mit „Chelating Sepharose®“, sie wird mit drei Säulenvolumina Wasser gewaschen, und anschließend mit drei Säulenvolumina 0,3 M Metallsalzlösung beladen. Die Equilibrierung geschieht durch 3 Säulenvolumen Laufpuffer (50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, pH 7,5). 1 ml Zellaufschluß (s. Abschnitt 6.10.1.3) wird mit einer Flußrate von 1,5 ml/min aufgebracht und nicht gebundenes Protein anschließend mit 10 Säulenvolumen Laufpuffer bei gleicher Flußrate gewaschen. Die Elution erfolgt über einen Gradienten gegen 0,5 M Imidazol in 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, pH 7,5. Abschließend kann die Säule mit 50 mM EDTA in 1 M NaCl Lösung regeneriert werden.

6.6 Aktivitätsbestimmungen

6.6.1 Spektrophotometrischer Lipase Assay

Für schnelle Messungen der Lipaseaktivität wird die Methode von Winkler und Stuckmann (Winkler und Stuckmann, 1979) mit leichten Änderungen angewandt. Lösung A enthält 10 mM *p*-Nitrophenylpalmitat (pNPP), welches im Ultraschall in Isopropanol gelöst wird. Lösung B setzt sich aus 0,8% (w/v) Cholat und 1% (w/v) Gummi arabicum in 0.1 M Tris-HCl Puffer pH 7,5 zusammen. Für die Aktivitätsbestimmung werden neun Teile Lösung B auf einen Teil Lösung A gegeben und 10-100 μ l Enzym hinzugefügt. Die Aktivität wird bei 410 nm gemessen. 1 Unit (U) ist definiert als die Menge Enzym, welche 1 μ mol *p*-Nitrophenol pro Minute freisetzt.

6.6.2 pH-Stat Assay

10 mM Triglycerid werden in destilliertem Wasser mit 2% (w/v) versetzt und im Ultraturax bei maximaler Drehzahl homogenisiert. 20 ml der Suspension werden mit 470 μ l 22% (w/v) CaCl₂ in die temperierbare Reaktionskammer des pH-Statens gegeben, der pH-Wert wird eingestellt und das Enzym zugegeben. Der pH-Stat hält den eingestellten pH-Wert durch Zugabe von Natronlauge. 1 U ist definiert als die Menge Enzym, welches 1 μ mol Fettsäure pro Minute freisetzt.

6.6.3 Epoxidhydrolase Assay in Mikrotiterplatten

Der Nachweis von Epoxidhydrolase Aktivität in Mikrotiterplatten erfolgt mit dem von F. Zocher (Zocher et al., 1999) entwickelten Mikrotiterplattenassay.

Eine Stammlösung von Styroloxid (1,3 M in Aceton) wird und mit Aceton verdünnt (Endkonzentration: 1,3 M, 0,65 M, 0,32 M, 0,16 M, 0,08 M) . 50 μ l der Lösungen werden zu 100 μ l Zellsuspension gegeben und das Gemisch wird (unter guter Belüftung) zwei Stunden bei 30-40°C inkubiert. Zur Detektion des verbleibenden Epoxides werden 50 μ l Triethylglycoldimethylether, 50 μ l Triemthylamin und 50 μ l 5% (w/v) NBP-Stammlösung

in Methoxyethanol zugegeben. Nach 45 min Inkubation wird die Absorbtion bei 560 nm gegen eine Referenz von 650 nm gemessen.

6.6.4 Bestimmung der Fluoreszenz

6.6.4.1 In Mikrotiterplatten

In eine schwarze Mikrotiterplatte (Nunc) werden 20-250 µl egfp-Lösung überführt und die Fluoreszenz mit dem FLUOstar (BMG) bestimmt. Die Anregung erfolgt bei 485 nm (Maximum 488 nm) und die Emission wird bei 538 nm (Maximum 507 nm) detektiert.

6.6.4.2 Küvettenmessungen

1 ml der verdünnten egfp Lösung wird in eine Fluoreszenzküvette überführt und die Fluoreszenz im Multiwellenlängen Fluorimeter (Shimazu FL324) bei 488 nm Anregung und 507 nm Emission bestimmt.

6.7 Expressionssysteme

6.7.1 Expression in *E. coli*

6.7.1.1 Der *lac*-Promotor

pUC Vektoren enthalten ein DNA Fragment, welches für das α -Fragment einer β -Galactosidase codiert. Die Vektoren zeigen α -Komplementation. Eine Zelle, welche eine Deletion am 5'-Ende des *lacZ* Gens aufweist, produziert ein inaktives C-terminales Fragment der β -Galactosidase (ω -Fragment). Gleiches gilt für Deletionen am 3'-Ende (α -Fragment). Enthält eine Zelle jedoch zwei Gene von denen eines für das α - und das andere für das ω -Fragment codiert, so läßt sich Galactosidaseaktivität nachweisen. Die Vektoren enthalten ein kleines, gut handhabbares *lac*- α - Fragment, die genutzten *E. coli* Stämme müssen das komplementäre ω -Fragment enthalten, um einen aktiven Komplex bilden zu können. Das Gen wird oft auf einem F'-Plasmid zur Verfügung gestellt. Die Zellen können mit IPTG induziert werden, welches den *lac* Repressor inaktiviert und somit die Synthese des ω -Peptides ermöglicht, die erhaltene Galactosidaseaktivität läßt sich mit XGal nachweisen.

6.7.1.2 Der λ -Promotor

Das Plasmid pCYTEXP1 trägt die starken Promotoren P_R und P_L aus dem Bakteriophagen λ als Tandem. Die beiden Promotoren stehen unter Kontrolle des temperatursensitiven Repressors aus dem Gen *cIts857* (Belev et al., 1991). Bei einer Temperatur zwischen 30°C und 37°C wird der Repressor auf den Promotor λP_1 expremiert. Bei 42°C wird der Repressor inaktiviert und es findet keine weitere Kontrolle des λP_1 mehr statt, so daß die Expression beginnt.

6.7.2 Expression in *S. lividans*

6.7.2.1 Der thio-Promotor

Die beiden Vektoren pIJ6021 und pIJ4123 (Takano et al., 1995) tragen den starken tipA Promotor (P_{tipA}) aus *Streptomyces lividans* 66. Der Promotor steht unter Kontrolle des 19kDa großen tipA Gens welches (vermutlich im Resistenzmechanismus) bereits ab Konzentrationen von 5 pmol Thiostrepton exprimiert wird (Murakami et al. 1989). Die Induktion erfolgt also bereits bei einem 200hunderstel der bakterioziden Konzentration. pIJ4123 besitzt zusätzlich das 30kDa schwere *redD* Protein als Selektionsmarker und zur vereinfachten Proteinaufreinigung einen (His)₆-Tag.

6.8 Biotransformation von Styroloxid mit Streptomyceten Stämmen

Nach 72stündiger Kultivierung wird eine 250ml Kultur abzentrifgiert (30 min, 4000 x g) und die erhaltenen Zellen zweimal mit 50 ml Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,5, 150 mM NaCl) gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 20 ml Phosphatpuffer (0.1 M, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 20 min auf Eis gestellt, anschließend erfolgt der Ultraschallaufschluß.

Zu 1,5 ml geklärtem Zelllysate werden 5 µl Styroloxid und 75 µl DMSO zugegeben. Die Mischung wird auf dem Thermoschüttler bei 30°C inkubiert. Anschließend werden die Proben mit 300 µl Diethylether extrahiert und anschließend gaschromatografisch untersucht (75°C isotherm, 130 kPa Druck).

6.9 Zellvereinzlung in Mikrotiterplatten

Um große Mutantenbibliotheken zu durchmustern, müssen die einzelnen Klone in diskrete Reaktionsumgebungen (Mikrotiterplatten, Filter oder definierte Abstände auf Agarplatten) gebracht werden.

6.9.1 Biopick

Der Pickroboter BioPick (Biorobotics) erfaßt über eine CCD-Kamera das Bild einer Agarplatte und erfaßt mittels eines Bilderkennungssystems die Lage einzelner Kolonien, welche dann von einer Nadel gepickt und in mit LB Medium gefüllte Mikrotiterplatten überführt werden. Die Parameter zur Erkennung von *E. coli* sind in Tabelle 6.8 aufgeführt.

Parameter	Wert
small diameter variance	2
medium diameter variance	3
large diameter variance	4
smallest size	30
largest size	500
filterstrength	20

Tabelle 6.8: Erkennungsparameter für *E. coli* bei dem Pickroboter BioPick

6.9.2 Zellsorter

Um plasmidtragende *E. coli* sehr schnell nach der Transformation zu vereinzeln, wurde ein Zellsorter mit Einzelablage benutzt (Enzelberger et al., 1998).

Eine *E. coli*-Kultur wird mit 200 mM NaCl Lösung auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,01 verdünnt und dem Zellsorter (Ortho Cytofluograph Model 50H; BASF AG Ludwigshafen) zugeführt. Die Bakterien werden mit einem 100 mW Argon Laser bei 488 nm (Extinktionsmaximum egfp) angeregt. Die Zellflußrate wurde auf 500-1000 Zellen pro Sekunde eingestellt. Das Gerät ermöglichte die Einzelablage von fluoreszierenden Klonen in Mikrotiterplatten und auf Agarplatten.

6.10 Fermentation und Zellaufschluß

6.10.1 *E. coli*

6.10.1.1 In Mikrotiterplatten

250 µl LB Medium (100 µg/ml Ampicillin) in einem „well“ einer „96 well“-Mikrotiterplatte werden durch den Zellsorter (Abschnitt: 6.9.2), den Pickroboter (Abschnitt: 6.9.1) oder mit sterilen Zahnstochern mit einer Kolonie oder Zelle angeimpft. Die Mikrotiterplatte wird über Nacht inkubiert (37°C, 250 U/min) und bei Bedarf durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,05 mM) (*lac*-Promotor) oder einem Temperaturshift (λ -Promotor) zu 42°C für 3 Stunden induziert. Die Zellen werden durch Zentrifugation (10 min, 4000 x g, 4°C) sedimentiert und in 250 µl Lyse Puffer (0,1 M Na-Phosphat, 300 mM NaCl, optional 1 mM PMSF) aufgenommen und durch drei Gefrier- (-20°C) Tau-(37°C) Zyklen aufgeschlossen. Die Zellfragmente werden wenn nötig anschließend durch Zentrifugation (10 min, 4000 x g, 4°C) abgetrennt.

6.10.1.2 Im 5 – 250 ml Maßstab

5 ml LB Kulturen (100 µg/ml Ampicillin) werden direkt von einer Kolonie, alle größeren Volumina 1:100 aus einer Übernachtskultur, angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,2 kultiviert und anschließend durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,05 mM) (*lac*-Promotor) oder einem Temperaturshift (λ -Promotor) zu 42°C für 3 Stunden induziert.

Für den Aufschluß mittlerer Kultivierungsvolumina werden die Zellen bei 8000 x g für 30 min sedimentiert und anschließend in Lyse Puffer (0,1 M Na-Phosphat, 300 mM NaCl, optional 1 mM PMSF) (10 ml Puffer pro g Feuchtwicht) resuspendiert. Die Zellen werden zweimal je 2 min auf Eis mit Ultraschall (Branson Sonifier W-250, Leistungsstärke 4, Beschallungsintervall 30%) behandelt. Die Zelltrümmer werden anschließend durch Zentrifugation abgetrennt (20 min, 8000 x g, 4°C).

6.10.1.3 Im 25 l-Maßstab

25 l LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) werden mit 2,5 l Übernachtskultur angeimpft und bei 30°C, p(O₂) 50% und 300 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2-1,5 fermentiert. Die Temperatur wird auf 42°C erhöht und die Zellen weitere 3-4 Stunden kultiviert. Die Abtrennung der Zellen erfolgte durch Crossflow-Filtration (10 kDa) und anschließende Zentrifugation (10 min 11000 x g, 4°C). Der Zellaufschluß erfolgte in Lyse-Puffer (0,1 M Na-Phosphat, 300 mM

NaCl, optional 1mM PMSF) (10ml Puffer pro g Feuchtgewicht) mit Hilfe einer Durchfluß-French-Press.

6.10.2 Streptomyceten

6.10.2.1 Anzucht der Wildtypstämme im 250 ml Maßstab

Es werden 250 ml Malzmedium mit Sporen der Streptomyceten angeimpft und 48-72 h bei 30° und 210 U/min inkubiert. Das Mycel wird durch Zentrifugation bei 8000 x g für 30 min sedimentiert und anschließend in Lyse Puffer (0,1 M Na-Phosphat, 300 mM NaCl, 1 mg/ml Lysozym; optional 1 mM PMSF) (10 ml Puffer pro g Feuchtgewicht) resuspendiert. Es wird eine Stunde auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend zweimal je 2 min auf Eis mit Ultraschall (Branson Sonifier W-250, Leistungsstärke 4, Beschallungsintervall 30%) behandelt.

6.10.2.2 Anzucht des rekombinanten *Streptomyces lividans* im 250 ml Maßstab

Es werden 250 ml Malzmedium mit Kanamycin (50 µg/ml) mit Sporen oder einer Kolonie des rekombinanten Streptomyceten angeimpft. Zur Induktion wird Thiostropton zugegeben (5 µg/ml) und anschließend 48-72 h bei 30° und 210 U/min inkubiert. Das Mycel wird durch Zentrifugation bei 8000 x g für 30 min sedimentiert und anschließend in Lyse Puffer (0,1 M Na-Phosphat, 300 mM NaCl, 1 mg/ml Lysozym; optional 1 mM PMSF) (10 ml Puffer pro g Feuchtgewicht) resuspendiert. Es wird eine Stunde auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend zweimal je 2 min auf Eis mit Ultraschall (Branson Sonifier W-250, Leistungsstärke 4, Beschallungsintervall 30%) behandelt.

7 Literatur

Albano, C. R., Randers-Eichhorn, L., Bentley, W. E. und Rao, G. (1998). Green fluorescent protein as a real time quantitative reporter of heterologous protein production. *Biotechnol. Prog.* *14*, 351-4.

Altenbuchner, J. und Cullum, J. (1984). DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Gen. Genet.* *195*, 134-8.

Anne, J. und Van Mellaert, L. (1993). *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production. *FEMS Microbiol. Lett.* *114*, 121-8.

Arand, M., Müller, F., Mecky, A., Hinz, W., Urban, P., Pompon, D., Kellner, R. und Oesch, F. (1999). Catalytic triad of microsomal epoxide hydrolase: replacement of Glu⁴⁰⁴ with Asp leads to a strongly increased turnover rate. *Biochem. J.* *337*, 37-43.

Arand, M., Wagner, H. und Oesch, F. (1996). Asp³³³, Asp⁴⁹⁵, and His⁵²³ from the catalytic triad of rat soluble epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* *271*, 4223-9.

Archelas, A. und Furstoss, R. (1998). Epoxide hydrolases: new tools for the synthesis of fine organic chemicals. *Trends Biotechnol.* *16*, 108-16.

Arnold, F. H. und Moore, J. C. (1997). Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* *58*, 1-14.

Atkins, D. und Izant, J. G. (1995). Expression and analysis of the green fluorescent protein gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* *28*, 585-8.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1993). *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: Greene Publishing Associates and Wiley Interscience).

-
- Baker, C. A., Poorman, R. A., Kezdy, F. J., Staples, D. J., Smith, C. W. und Elhammer, A. P. (1996). A scintillation proximity assay for UDP-GalNAc:polypeptide, N-acetylgalactosaminyltransferase. *Anal. Biochem.* 239, 20-4.
- Balkenhohl, F., Ditrich, K., Hauer, B. und Ladner, W. (1997). Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation. *J. Prakt. Chem.* 339, 381-4.
- Beetham, J. K., Grant, D., Arand, M., Garbarino, J., Kiyosue, T., Pinot, F., Oesch, F., Belknap, W. R., Shinozaki, K. und Hammock, B. D. (1995). Gene evolution of epoxide hydrolases and recommended nomenclature. *DNA Cell. Biol.* 14, 61-71.
- Belev, T. N., Singh, M. und McCarthy, J. E. G. (1991). A fully moderator vector system for the optimization of gene Expression in *Escherichia coli*. *Plasmid* 26, 147-50.
- Bender, E., Koller, K. P. und Engels, J. W. (1990). Secretory synthesis of human interleukin-2 by *Streptomyces lividans*. *Gene* 86, 227-32.
- Bender, E., Vogel, R., Koller, K. P. und Engels, J. (1990). Synthesis and secretion of hirudin by *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 203-7.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraktion procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* 7, 1513-23.
- Borhan, B., Jones, A. D., Pinot, F., Grant, D. F., Kurth, M. J. und Hammock, B. D. (1995). Mechanism of soluble epoxide hydrolase. Formation of an α -hydroxy ester-enzyme intermediate through Asp-333. *J. Biol. Chem.* 270, 26923-30.
- Bornscheuer, U. T. (1998). Directed evolution of enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37, 3105-8.
- Bornscheuer, U. T., Altenbuchner, J. und Meyer, H. H. (1998). Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of Epothilones. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 554-9.

Bornscheuer, U. T. und Kazlauskas, R. (1999). *Hydrolases in Organic Synthesis; Regio- and Stereoselective Biotransformations* (Weinheim: Wiley-VCH).

Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., Schmid, R. D. und Schmid, U. (1998). Preparation of symmetrical triglycerides ABA. In 6 pp. (*European Patent EP 88 27 92* (Unilever N.V.) (Chem. Abstr. 130:51410)).

Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L. und Menge, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343, 767-70.

Brawner, M. E. (1994). Advances in heterologous gene expression by *Streptomyces*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 475-81.

Brock, T. D. und Madigan, M. T. (1988). Cell wall: eubacteria. In *Biology of Microorganisms*, P. H., Hrsg. (New York: Englewood Cliffs), S. 72-95.

Cadwell, R. C. und Joyce, G. F. (1992). Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Meth. Appl.* 2, 28-33.

Cambillau, C. und Tilbeurgh, H. v. (1993). Structure of hydrolases - lipases and cellulases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 885-95.

Cao, L., Fischer, A., Bornscheuer, U. T. und Schmid, R. D. (1997). Lipase-catalyzed solid phase preparation of sugar fatty acid esters. *Biocatal. Biotransform.* 14, 269-83.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-5.

Chen, C. S., Wu, S. H., Girdaukas, G. und Sih, C. J. (1987). Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 2812-7.

Chen, X.-J., Archelas, A. und Furstoss, R. (1993). Microbiological transformations. 27. The first examples for preparative-scale enantioselective or diastereoselective epoxide hydrolyses using microorganisms. An unequivocal access to all four Bisabolol stereoisomers. *J. Org. Chem.* *58*, 5528-32.

Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *86*, 2172-5.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* *16*, 10881-90.

Cramer, A., Raillard, S. A., Bermudez, E. und Stemmer, W. P. (1998). DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* *391*, 288-91.

Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E. und Stemmer, W. P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnol.* *14*, 315-9.

Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E. und Stemmer, W. P. C. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnol.* *14*, 315-9.

De Vos, P., Schmitt, J., Verhoeven, G. und Stunnenberg, G. (1994). Human androgen receptor expressed in HeLa cells activates transcription in vitro. *Nucl. Acids Res.* *22*, 1161-6.

Deichsel, H., Friedel, S., Detterbeck, A., Coyne, C., Hamker, U. und MacWilliams, H. K. (1999). Green fluorescent proteins with short half-lives as reporters in *dictyostelium discoideum*. *Dev. Genes Evol.* *209*, 63-8.

Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M. und Derewenda, Z. S. (1992). Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* *31*, 1532-41.

Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Yamaguchi, S., Joerger, R., Haas, M. J. und Derewenda, Z. S. (1994). Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng.* 7, 551-7.

Deutscher, M. P. (1990). Guide to Protein Purification. In *Methods in Enzymology*, J. N. Abelson und M. I. Simon, eds. (San Diego: Academic Press).

Doolittle, R. F. (1997). A bug with excess gastric avidity. *Nature* 388, 515-6.

Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acid Res.* 16, 6127-45.

Edman, P. (1950). Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* 4, 283-93.

Enzelberger, M. M. (1996). Versuche zur enzymkatalysierten Darstellung enantiomerenreiner 1,4-Dihydropyridine und optisch aktiver γ - und δ -Lactone. In *Diplomarbeit am Institut für technische Biochemie (Stuttgart: Universität Stuttgart)*.

Enzelberger, M. M., Zocher, F., Schmidt-Dannert, C., Bornscheuer, U. T., Hauer, B., Eipel, H. und Schmid, R. D. (1998). Vereinzelung von Enzymmutanten durch den Einsatz von FACS und des GFP. *BioForum* 21, 192-4.

Erpicum, T., Granier, B., Delcour, M., Lenzini, V. M., Nguyen-Distéche, M., Dusart, J. und Frère, J. M. (1990). Enzyme production by genetically engineered *Streptomyces* strains. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 719-23.

Faber, K. (1997). *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3. Auflage (Berlin: Springer).

Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F. und Kluepfel, D. (1995). Production and secretion of proteins by *Streptomyces*. *Microbiol. Lett.*, 323-7.

Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B. und Cygler, M. (1993). Insight into interfacial activation from an 'open' structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem* 268, 12843-7.

Grogan, G., Roberts, S. M. und Willetts, A. J. (1996). Novel aliphatic epoxide hydrolase activities from dematiaceous fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 239-3.

Heim, R., Prasher, D. C. und Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12501-4.

Heim, R. und Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* 6, 178-82.

Hermes, J. D., Parekh, S. M., Blacklow, S. C., Koster, H. und Knowles, J. R. (1989). A reliable method for random mutagenesis: the generation of mutant libraries using spiked oligodeoxyribonucleotide primers. *Gene* 84, 143-51.

Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., R., G. und Stüber, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate absorbent. *Biotechnology*, 1321-5.

Hopewood, D. A., Kieser, T., Wright, H. M. und Bibb, M. J. (1983). Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2257-65.

Horinouchi, S., Nishiyama, M., Nakamura, A. und Beppu, T. (1987). Construction and characterization of multicopy expression-vectors in *Streptomyces sp.* *Mol Gen Genet* 210, 468-75.

Hubner, P., Iida, S. und Arber, W. (1988). Random mutagenesis using degenerate oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 73, 319-25.

Hulshof, L. A. und Roskam, J. H. (1989). Phenylglycidate stereoisomers, conversion products thereof with e.g. 2-nitrophenol and preparation of diltiazem. In Eur. Pat. Appl. 0343714 to Stamicarbon (Chem. Abstr. 113: 76603).

Hutchens, T. W. und Yip, T.-T. (1992). Synthetic metal binding protein surface domains for metal ion-dependent interaction chromatography; II. Immobilization of synthetic metal-binding peptides from metal ion transport proteins as model bioactive protein surface domains. *J. Chromatogr.* 604, 133-41.

Janssen, D. B., Pries, F., van der Ploeg, J., Kazemier, B., Terpstra, P. und Witholt, B. (1989). Cloning of 1,2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of the *dh1A* gene. *J. Bacteriol.* 171, 6791-9.

Kazlauskas, R. J. und Bornscheuer, U. T. (1998). Biotransformations with lipases. In *Biotechnology-Series*, H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. J. W. Stadler und D. R. Kelly, Hrsg. (Weinheim: VCH-Wiley), S. 37-191.

Kettman, J. R., Davies, T., Chandler, D., Oliver, K. G. und Fulton, R. J. (1998). Classification and properties of 64 multiplexed microsphere sets. *Cytometry* 33, 234-43.

Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces* and *E. coli*. *Plasmid* 12, 16-32.

Kieser, T., Hopwood, D. A., Wright, H. M. und Thompson, C. J. (1982). pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Mol. Gen. Genet.* 185, 223-8.

Koller, K. P., Riess, G., Sauber, K., Uhlmann, E. und Wallmeier, H. (1989). Recombinant *Streptomyces lividans* secretes a fusion protein of tendaminostat and proinsulin. *Bio/Technology* 7, 1055-8.

Koskinen, A. M. P. und Klivanov, A. M. (1996). *Enzymatic Reactions in Organic Media* (Glasgow: Chapman & Hall).

- Kroutil, W., Mischitz, M., Plachota, P. und Faber, K. (1996). Deracemization of (\pm)-*cis*-2,3-epoxyheptane *via* enantioconvergent biocatalytic hydrolysis using *Nocardia* EH1-epoxide hydrolase. *Tetrahedron Lett.* *37*, 8379-82.
- Kroutil, W., Orru, R. V. A. und Faber, K. (1998). Stabilization of *Nocardia* EH1 epoxide hydrolase by immobilization. *Biotechnol. Lett.* *20*, 373-7.
- Kuchner, O. und Arnold, F. H. (1997). Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol.* *15*, 523-30.
- La Vallie, E. R. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *BioTechnology* *11*, 187-93.
- Labigne, A. und de Reuse, H. (1996). Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infect. Agents Disease* *5*, 191-202.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* *227*, 680-5.
- Le Grice, S. F. und Leitch-Gruninger, F. (1990). Rapid purification of homodimer and heterodimer HIV-1 reverse transcriptase by metal chelate affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* *187*, 307-14.
- Leung, D. W., Chen, E. und Goeddel, D. V. (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* *1*, 11-5.
- Magnolo, S. K., Leenutaphong, D. L., DeModena, J. A., Curtis, J. E., Bailey, J. E., Galazzo, J. L. und Hughes, D. E. (1991). Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin. *Biotechnology* *9*, 473-6.
- Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of protein electroblotted onto polyvinylidene difluorid membranes. *J. Biol. Chem.* *262*, 10035-8.

Melchers, K. (1996). Cloning and membrane topology of two P type ion pumps of *Helicobacter pylori*, a cation resistance ATPase and a membrane pump necessary for urease activity. *Gut* 39 (suppl. 2), A67-A77.

Mikaelian, I. und Sergeant, A. (1992). A general and fast method to generate multiple site directed mutations. *Nucleic Acids Res* 20, 376-9.

Misawa, E., Chan Kwo Chion, C. K., Archer, I. V., Woodland, M. P., Zhou, N. Y., Carter, S. F., Widdowson, D. A. und Leak, D. J. (1998). Characterisation of a catabolic epoxide hydrolase from a *Corynebacterium* sp. *Eur. J. Biochem.* 253, 173-83.

Mischitz, M., Faber, K. und Willetts, A. (1995). Isolation of a highly enantioselective epoxide hydrolase from *Rhodococcus* sp. NCIMB11216. *Biotechnol. Lett.* 17, 893-98.

Mischitz, M., Mirtl, C., Saf, R. und Faber, K. (1996). Regioselectivity of *Rhodococcus* sp. NCIMB11216 epoxide hydrolase: Applicability of *E*-values for description of enantioselectivity depends on substrate structure. *Tetrahedron: Asymmetry* 7, 2041-46.

Moore, J. C. und Arnold, F. H. (1996). Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nature Biotechnol.* 14, 458-67.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Ehrlich, H. (1986). Specific enzymatic quantification of DNA in vitro, the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quantl. Biol.* 51, 263-7.

Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 51, 335-9.

Nellaiah, H., Morisseau, C., Archelas, A., Furstoss, R. und Baratti, J. C. (1996). Enantioselective hydrolysis of *p*-nitrostyrene oxide by an epoxide hydrolase preparation from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 70-7.

- Nieba, L., Nieba-Axmann, S. E., Persson, A., Hamalainen, M., Edebratt, F., Hansson, A., Lidholm, J., Magnusson, K., Karlsson, A. F. und Pluckthun, A. (1997). BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip. *Anal. Biochem.* 252, 217-28.
- Noack, D., Geuther, R., Tonew, M., Breitling, R. und Behnke, D. (1988). Expression and secretion of interferon-alpha 1 by *Streptomyces lividans*: use of staphylokinase signals and amplification of a neo gene. *Gene* 68, 53-62.
- Nolan, J. P., Lauer, S., Prossnitz, E. R. und Sklar, L. A. (1999). Flow cytometry: a versatile tool for all phases of drug discovery. *Drug Discovery Today* 4, 173-80.
- Nolan, J. P. und Sklar, L. A. (1998). The emergence of flow cytometry for sensitive, real-time measurements of molecular interactions. *Nature Biotechnol* 16, 633-8.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S., Harel, M., Remington, S. J. und Silman, I. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 5, 197-211.
- Osprian, I., Kroutil, W., Mischitz, M. und Faber, K. (1997). Biocatalytic resolution of 2-methyl-2-(aryl)alkyloxiranes using novel bacterial epoxide hydrolases. *Tetrahedron: Asymmetry* 8, 65-71.
- Patwardhan, A. V., Goud, G. N., R.R., K. und Atai, M. M. (1997). Selection of optimum affinity tags from a phage displayed peptide library; Application to immobilized copper(II) affinity chromatography. *J. Chromatography A* 787, 91-100.
- Pavia, M. R. (1997). Compound Sourcing: chemically generated screening libraries. In *High throughput screening*, J. P. Devlin, Hrsg. (New York: Marcel Dekker), S. 147-150.
- Payne, G. F., Delacruz, N. und Coppella, S. J. (1990). Improved production of heterologous protein from *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 395-400.
- Peczynska-Czoch, W. und Mordarski, M. (1988). Actinomycete enzyme. In *Actinomycetes in Biotechnology*, M. Goodfellow, S. T. Williams und M. Mordarski, Hrsg. (San Diego: Academic Press).

Pedragosa-Moreau, S., Archelas, A. und Furstoss, R. (1996). Microbiological transformations. 32. Use of epoxide hydrolase mediated biohydrolysis as a way to enantiopure epoxides and vicinal diols: Application to substituted styrene oxides. *Tetrahedron* 52, 4593-606.

Pedragosa-Moreau, S., Morisseau, C., Zylber, J., Archelas, A., Baratti, J. und Furstoss, R. (1996). Microbiological transformations. 33. Fungal epoxide hydrolases applied to the synthesis of enantiopure *para*-substituted styrene oxides. A mechanistic approach. *J. Org. Chem.* 61, 7402-7.

Poppenborg, L., Friehs, K. und Flaschel, E. (1997). The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring. *J. Biotechnol.* 58, 79-88.

Porath, J. (1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* 3, 263-81.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G. (1974). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-9.

Prasher, D. C. (1995). Using GFP to see the light. *Trends Genet.* 11, 320-3.

Preussmann, R., Schneider, H. und Epple, F. (1969). Untersuchungen zum Nachweis alkylierender Agentien. *Arzneimittel-Forsch.* 19, 1059-63.

Ransac, S., Carrière, F., Rogalska, E., Verger, R., Marguet, F., Buono, G., Melo., E. P., Cabral, J. M. S., Egloff, M. P. E., Tilbeurgh, H. v. und Cambillau, C. (1996). The kinetics specificities and structural features of lipases. In *Molecular Dynamics of Biomembranes*, J. A. F. o. d. Kamp, Hrsg. (Heidelberg, Berlin: Springer), S. 254-304.

Reece, R., Rickles, R. und Ptshane, M. (1993). Overproduction and single step purification of GAL4 fusion proteins from *E. coli*. *Gene* 126, 105-7.

Reetz, M. T., Becker, M. H., Klein, H.-W. und Stöckigt, D. (1999). Eine Methode zum High-Throughput-Screening von enantioselektiven Katalysatoren. *Ange. Chem.* 111, 1872-5.

Reetz, M. T., Zonta, A., Schimossek, K., Liebeton, K. und Jaeger, K.-E. (1997). Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by *in vitro* evolution. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36, 2830-2832.

Rellos, R. und Scopes, R. K. (1994). Polymerase chain reaction-based random mutagenesis: production and characterization of thermostable mutants of *Zymomonas mobilis* Alcohol Dehydrogenase-2. *Protein expression and purification* 8, 12-6.

Rink, R., Fennema, M., Smids, M., Dehmel, U. und Janssen, D. B. (1997). Primary structure and catalytic mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. *J. Biol. Chem.* 272, 14650-7.

Robey, R. B., Ruiz, O., Santos, A. V., Ma, J., Kear, F., Wang, L. J., Li, C. J., Bernardo, A. A. und Arruda, J. A. (1998). pH-dependent fluorescence of a heterologously expressed *Aequorea* green fluorescent protein mutant: in situ spectral characteristics and applicability to intracellular pH estimation. *Biochemistry* 37, 9894-901.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. Auflage (Cold Spring Harbor: Laboratory Press).

Sarda, L. und Desnuelle, P. (1958). *Biochim. Biophys. Acta* 30, 513-521.

Schäfer, K. (1997). *Helicobacter pylori*, rationale Ansätze für seine Ausmerzung. In *Gentechnik im Pharmabereich* (Stuttgart).

Schmid, R. D. und Verger, R. (1998). Lipases - interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37, 1608-33.

Schmidt, T. G., Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255, 753-66.

Schmidt-Dannert, C., Rúa, M. L., Atomi, H. und Schmid, R. D. (1996). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1301, 105-14.

Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U. und Schmid, R. D. (1993). Screening, purification and properties of a thermophile lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1214, 43-53.

Scopes, R. K. (1994). *Protein Purification* (Berlin: Springer).

Seidegard, J. und Pierre, J. W. d. (1983). Microsomal epoxide hydrolase. Properties, regulation and function. *Biochim. Biophys. Acta* 695, 251-70.

Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H. und Galbraith, D. W. (1995). Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* 8, 777-84.

Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Schmid, U. und Schmid, R. D. (1998). Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis. *Fett/Lipid* 100, 156-60.

Spee, J. H., Vos, W. M. d. und Kuipers, O. P. (1993). Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP. *Nucl. Acids. Res.* 21, 777-8.

Spelberg, J. H. L., Rink, R., Kellogg, R. M. und Janssen, D. B. (1998). Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*. *Tetrahedron: Asymmetry* 9, 459-466.

Spelberg, J. H. L., Rink, R., Kellogg, R. M. und Janssen, D. B. (1998). Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*. *Tetrahedron: Asymmetry* 9, 459-66.

Sporeno, E., Paonessa, G., Salvati, A. L., Graziani, R., Delmastro, P., Ciliberto, G. und Toniatti, C. (1994). Oncostatin M binds directly to gp130 and behaves as interleukin-6 antagonist on a cell line expressing gp130 but lacking functional oncostatin M receptors. *J. Biol. Chem.* 269, 10991-5.

Stemmer, W. P. C. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10747-51.

Takano, E., White, J., Thompson, C. J. und Bibb, M. J. (1995). Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene* 166, 133-7.

Uber, D. C., Jaklevic, J. M., Theil, E. H., Lishanskaya, A. und McNeely, M. R. (1991). Application of robotics and image processing to automated colony picking and arraying. *Biotechniques* 11, 642-7.

van den Heuvel, D. J., Kooyman, R. P., Drijfhout, J. W. und Welling, G. W. (1993). Synthetic peptides as receptors in affinity sensors: a feasibility study. *Anal Biochem* 215, 223-30.

Viikari, L., Kantelinen, A., Rättö, M. und Sundquist, J. (1991). Enzymes in pulp and paper processing. *ACS. Symp. Ser.* 12, 460.

Virnekas, B., Ge, L., Pluckthun, A., Schneider, K. C., Wellnhofer, G. und Moroney, S. E. (1994). Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucl. Acids Res.* 22, 5600-7.

Voss, S. und Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10, 975-82.

Wagegg, T., Enzelberger, M. M., Bornscheuer, U. T. und Schmid, R. D. (1998). The use of methoxy acetoxy esters significantly enhances reaction rates in the lipase-catalyzed preparation of optical pure 1-(4-chloro-phenyl) ethyl amines. *J. Biotechnol.* *61*, 75-8.

Wallace, R. W. und Goldman, M. E. (1997). Bioassay design and implementation. In *High throughput screening*, J. P. Devlin, Hrsg. (New York: Marcel dekker), S. 279-306.

Ward, W. W. und Bokman, S. H. (1982). Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry* *21*, 4535-40.

Weijers, C. A. G. M. (1997). Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*. *Tetrahedron: Asymmetry* *8*, 639-47.

Winkler, F. K., D'Arcy, A. und Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature* *343*, 771-4.

Winkler, U. K. und Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* *138*, 665-70.

Wünsche, K., Schwaneberg, U., Bornscheuer, U. T. und Meyer, H. H. (1996). Chemoenzymatic route to β -blockers via 3-hydroxy esters. *Tetrahedron: Asymmetry* *7*, 2017-22.

Yang, F., Moss, L. G. und Phillips, G. N., Jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnol.* *14*, 1246-51.

Youvan, D. C. und Michel-Beyerle, M. E. (1996). Structure and fluorescence mechanism of GFP. *Nature Biotechnol.* *14*, 1219-20.

Zhang, J. H., Dawes, G. und Stemmer, W. P. (1997). Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 4504-9.

Zhijian, L., Di Blassio, E. A., Grant, K. L., Warne, N. W., LaVallie, E. R., Collins-Racie, L. A., Folletie, M. T., Williamson, M. J. und McCoy, J. M. (1996). Histidine Patch Thioredoxins. *J. Biol. Chem.* 271, 5059-65.

Zocher, F. (1999). Erstellung einer Enzybibliothek über gerichtete Evolution, Entwicklung von Assaysystemen zur Durchmusterung von Enzybibliotheken auf Epoxidhydrolaseaktivität, Aufreinigung einer Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus*. In Doktorarbeit: Institut für Technische Biochemie (Stuttgart: Universität Stuttgart).

Zocher, F., Enzelberger, M. M., Bornscheuer, U. T., Hauer, B. und Schmid, R. D. (1999). A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity. *Anal. Chim. Acta* 391, 345-51.

Curriculum vitae

1969	geboren in München
1970-1975	Umzüge: Kön, Münster
1975	1. Klasse Grundschule Münster
1976-1978	2.+3. Klasse Grundschule Wunstorf bei Hannover
1979	4. Klasse Grundschule Lichtenwald
1980-1989	Gymnasium Plochingen (Abitur)
1989-1990	Zivildienst: Altenpflegeheim Bethanien (Stuttgart Möhringen)
1990-1996	Studium (Diplom Chemie)
1993	Vordiplom
1995-1996	Diplomarbeit: „Versuche zur enzymkatalysierten Darstellung enantiomerenreiner 1,4 Dihydropyridine und optisch aktiver γ - und δ - Lactone“
seit 1996	wiss. Angestellter am Institut für technische Biochemie
1998	Heirat mit Heike Lampart