

**Gensynthese, Expression und Refolding der Lipasen
aus *Pseudomonas species* KWI 56 und
*Chromobacterium viscosum***

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

vorgelegt von

Petra Christine Traub

aus Göppingen

Hauptberichter:

Prof. Dr. Rolf D. Schmid

Mitberichter:

Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der mündlichen Prüfung:

22. März 2000

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2000

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	LIPASEN	9
1.1.1	VORKOMMEN VON LIPASEN	9
1.1.2	EIGENSCHAFTEN	10
1.1.3	INDUSTRIELLE ANWENDUNG VON LIPASEN	10
1.1.3.1	Lipasen in Waschmitteln	10
1.1.3.2	Lipasen in der Nahrungsmittelindustrie	11
1.1.3.3	Lipasen in der Medizin	11
1.1.3.4	Lipasen in der organischen Synthese	12
1.1.4	STRUKTUR UND AUFBAU VON LIPASEN	12
1.1.4.1	α/β -Hydrolase fold	12
1.1.4.2	Katalytische Triade	13
1.1.4.3	Grenzflächenaktivierung und Lid	13
1.1.5	REAKTIONSMCHANISMUS	13
1.2	LIPASEN AUS PSEUDOMONADEN	15
1.2.1	BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN	15
1.2.2	GEWINNUNG VON <i>PSEUDOMONAS</i> -LIPASEN	16
1.3	ZIEL DER ARBEIT	18
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	GERÄTE	21
2.2	CHEMIKALIEN UND ENZYME	22
2.3	BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	24
2.4	MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	29
2.4.1	MEDIEN	29
2.4.2	ANTIBIOTIKA UND ANDERE MEDIENZUSÄTZE	30
2.4.3	ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN	30
2.5	ZELLKULTIVIERUNG	33
2.5.1	STAMMHALTUNG	33
2.5.2	ANZUCHTBEDINGUNGEN	33
2.5.3	EXPRESSIONSSYSTEME IN <i>E. COLI</i>	34
2.5.3.1	Das λ -Expressionssystem	34
2.5.3.2	Das T7-Expressionssystem	34
2.5.4	KULTIVIERUNG IM SCHÜTTELKOLBEN	34
2.6	MOLEKULARGENETISCHE TECHNIKEN	35
2.6.1	DNA-PRÄPARATION AUS <i>E. COLI</i>	35
2.6.1.1	Schnellisolierung von Plasmid-DNA	35
2.6.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA über Anionenaustausch-Säulen	36
2.6.2	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA	36
2.6.3	ETHANOL-PRÄZIPITATION VON PLASMID-DNA	36
2.6.4	ENZYMATISCHE BEHANDLUNG VON DNA	36
2.6.4.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	36
2.6.4.2	Behandlung mit Klenow-Enzym	37
2.6.4.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase	37
2.6.5	TRANSFER VON DNA IN <i>E. COLI</i>	37
2.6.5.1	Transformation mit TSS	37
2.6.5.1.1	Kompetente <i>E. coli</i> - Zellen für die TSS-Transformation	37
2.6.5.1.2	Transformation von Plasmid-DNA	38
2.6.5.2	Elektroporation	38
2.6.5.2.1	Kompetente <i>E. coli</i> Zellen für die Elektroporation	38

2.6.5.2.2	Transformation.....	38
2.6.6	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	39
2.6.7	GENSYNTHESE.....	39
2.6.7.1	„one-step“-Synthese-PCR	40
2.6.7.2	„two-step“-Synthese-PCR	41
2.6.8	REKOMBINANTE PCR: „SPlicing BY OVERLAP EXTENSION“	42
2.6.9	POSITIONSGERICHTETE MUTAGENESE	43
2.6.10	DNA-GELELEKTROPHORESE	44
2.6.10.1	Agarose-Gelelektrophorese	44
2.6.10.2	Gelelution von DNA-Fragmenten	45
2.6.11	DNA-SEQUENZIERUNG	45
2.7	PROTEINCHEMISCHE UND ANALYTISCHE METHODEN.....	45
2.7.1	SDS-PAGE	45
2.7.1.1	Färbung von SDS-Gelen.....	46
2.7.2	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	47
2.7.3	LIPASE-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG.....	47
2.7.3.1	Photometrischer Assay mit pNPP als Substrat	47
2.7.3.2	pH-Stat Assay	48
2.7.4	CHARAKTERISIERUNG DER LIPASE	49
2.7.4.1	Temperatureinfluß auf die Lipaseaktivität und Temperaturstabilität	49
2.7.4.2	pH-Einfluß auf die Lipaseaktivität und pH-Stabilität.....	49
2.7.4.3	Substratspezifität und Kettenlängenspezifität der Lipase.....	49
2.7.5	PROTEINBLOTTING	51
2.7.6	N-TERMINALE PROTEINSEQUENZIERUNG	51
2.8	FERMENTATION UND DOWNSTREAMPROCESSING	52
2.8.1	FERMENTATION.....	52
2.8.1.1	Batch-Fermentation im 5-l-Maßstab	52
2.8.1.2	Batch-Fermentation im 40 l-Maßstab.....	53
2.8.2	ZELLAUFSCHLUß	53
2.8.2.1	Ultraschallaufschluß	53
2.8.2.2	Harnstoffaufschluß	54
2.8.3	REINIGUNG UND AUFSCHLUß VON INCLUSION-BODIES.....	54
2.8.4	REKONSTITUTION DER LIPASE: <i>IN-VITRO</i> -REFOLDING UNTER EINSATZ DES HELPERPROTEINS	55
2.8.5	KONZENTRIERUNG DER LIPASE	55
2.8.5.1	Cross-flow-Filtration und Gefriertrocknung.....	55
3	ERGEBNISSE.....	57
3.1	LIPASE AUS <i>PSEUDOMONAS SPECIES</i> KWI 56.....	57
3.1.1	SYNTHESE DER GENE FÜR DIE LIPASE UND DAS HELFERPROTEIN AUS <i>PSEUDOMONAS</i> <i>SPECIES</i> KWI 56	57
3.1.1.1	Gen-Design.....	57
3.1.1.2	Synthese der Gen-Boxen	64
3.1.1.3	Gene-Assembly	69
3.1.2	EXPRESSION DER LIPASE UND DES HELFERPROTEINS AUS <i>PSEUDOMONAS SPECIES</i> KWI 56 IN <i>E. COLI</i>	72
3.1.2.1	Klonierung des Gens für die Lipase	72
3.1.2.1.1	Klonierung in pCYTEXP1	72
3.1.2.1.2	Klonierung in pET20b(+).....	73
3.1.2.2	Klonierung des Gens für das Helferprotein.....	74
3.1.2.2.1	Klonierung in pCYTEXP1	74
3.1.2.2.2	Klonierung in pET20b(+).....	76
3.1.2.3	Expression	76
3.1.2.3.1	Expression der Lipase aus <i>Pseudomonas species</i> KWI 56	77

3.1.2.3.2	Expression des Helferproteins aus <i>Pseudomonas species</i> KWI 56.....	78
3.1.3	N-TERMINALE AMINOSÄURESEQUENZEN VON OMPARLIP UND RLIP	80
3.1.4	IN-VITRO-REFOLDING DER LIPASE AUS <i>PSEUDOMONAS SPECIES</i> KWI 56	81
3.1.4.1	Schnell-Refolding	81
3.1.4.2	Aufschlußmethoden.....	82
3.1.4.3	Reinigung der Inclusion-Bodies und Bestimmung der spezifischen Aktivität.....	83
3.1.4.4	Verschiedene Expressionskonstrukte im Refolding	84
3.1.4.5	Einfluß verschiedener Puffer auf das <i>In-vitro</i> -Refolding	86
3.1.4.6	Kinetik des <i>In-vitro</i> -Refoldings.....	87
3.1.4.7	Einfluß der Verdünnung im Refolding	89
3.1.4.8	Verhältnis von Lipase und Helferprotein im <i>In-vitro</i> -Refolding.....	90
3.1.5	BATCH-FERMENTATION	91
3.1.6	CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN LIPASE AUS <i>PSEUDOMONAS SPECIES</i> KWI 56	92
3.1.6.1	Einfluß der Temperatur auf die Lipaseaktivität.....	92
3.1.6.2	Temperaturstabilität.....	93
3.1.6.3	pH-Einfluß auf die Lipaseaktivität	94
3.1.6.4	pH-Stabilität	95
3.1.6.5	Einfluß von CaCl ₂ auf die Lipaseaktivität.....	96
3.1.6.6	Substratspezifität der Lipase.....	97
3.2	LIPASE AUS <i>CHROMOBACTERIUM VISCOSUM</i>	99
3.2.1	SYNTHESE DER GENE FÜR DIE LIPASE UND DAS HELFERPROTEIN AUS <i>CHROMOBACTERIUM VISCOSUM</i>	99
3.2.1.1	Gen-Design.....	99
3.2.1.2	Synthese der Gen-Boxen	105
3.2.1.3	Gene-Assembly	109
3.2.2	EXPRESSION DER LIPASE UND DES HELFERPROTEINS AUS <i>CHROMOBACTERIUM VISCOSUM</i> IN <i>E. COLI</i>	112
3.2.2.1	Klonierung der Gene für die Lipase und deren Helferprotein in pET20b(+)	112
3.2.2.2	Expression der Lipase und ihres Helferproteins aus <i>Chromobacterium viscosum</i>	114
3.2.3	IN-VITRO-REFOLDING DER LIPASE AUS <i>CHROMOBACTERIUM VISCOSUM</i>	115
3.2.3.1	Schnell-Refolding.....	115
3.2.3.2	Aufschlußmethoden.....	116
3.2.3.3	Reinigung von Inclusion-Bodies und Bestimmung der spezifischen Aktivität.....	117
3.2.3.4	Refoldingkinetik.....	118
3.2.4	CHARAKTERISIERUNG DER LIPASE AUS <i>CHROMOBACTERIUM VISCOSUM</i>	119
3.2.4.1	Einfluß der Temperatur auf die Lipaseaktivität.....	120
3.2.4.2	Temperaturstabilität.....	120
3.2.4.3	Einfluß des pH-Wertes auf die Lipaseaktivität.....	121
3.2.4.4	pH-Stabilität	122
3.2.4.5	Einfluß von CaCl ₂ auf die Lipaseaktivität.....	123
3.2.4.6	Substratspezifität der Lipase.....	123
3.3	SPEZIFITÄT DER HELFERPROTEINE.....	125
4	DISKUSSION.....	129
4.1	GENSYNTHESE.....	129
4.2	REKOMBINANTE EXPRESSION DER <i>PSEUDOMONAS</i>-LIPASEN UND DEREN SPEZIFISCHEN HELFERPROTEINE IN <i>E. COLI</i>	130
4.3	IN-VITRO-REFOLDING	133
4.4	CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN LIPASEN AUS <i>PSEUDOMONAS SPECIES</i> KWI 56 UND <i>CHROMOBACTERIUM VISCOSUM</i>	135
4.5	SPEZIFITÄT DER HELFERPROTEINE.....	137

5 ZUSAMMENFASSUNG.....141

6 LITERATUR.....143

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp ^R	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninicacid
<i>bla</i>	β-Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase
Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	Doppelstrang DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EtOH	Ethanol
GC	Gaschromatographie
HMW	Proteinmarker im hohen Molekulargewichtsbereich
IB	Inclusion body
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
LMW	Proteinmarker im niedrigen Molekulargewichtsbereich
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSHFBA	N-Methyl-N-Trimethylheptafluorbutyramid
MWC	Molecular Weight Cut-off
n. b.	nicht bestimmt

OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ORF	„open reading frame“
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pNPP	p-Nitrophenylpalmitat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelstrang DNA
β-ME	β-Mercaptoethanol
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TCA	Trichloressigsäure
Tc ^R	Tetracyclinresistenz
TE	Tris/ EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tp ^R	Trimetoprimresistenz
Tris(-HCl)	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (pH mit HCl eingestellt)
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
TSS	Transformation Storage Solution
U	Units (Enzymeinheit)
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
X-gal	5-Brom-4-chlor-indolyl-β-D-galactopyranosid

1 EINLEITUNG

1.1 Lipasen

1.1.1 Vorkommen von Lipasen

Lipasen sind Triacylglycerolhydrolasen (EC 3.1.1.3) (Tipton, 1994), gehören zur Familie der Serin-Hydrolasen und sind sowohl in Pflanzen und Tieren als auch in Mikroorganismen weit verbreitet (Alberghina *et al.*, 1991; Bornscheuer & Kazlauskas, 1999; Schmid & Verger, 1998). Ihre biologische Funktion ist der hydrolytische Abbau von Triglyceriden in Glycerin, freie Fettsäuren und Mono- bzw. Diglyceride.

Unter den etwa 70 kommerziell erhältlichen Lipasen wird generell zwischen Lipasen aus Säugetieren, aus Pilzen und aus Bakterien unterschieden (Tabelle 1.1). Ihre Klassifizierung erfolgt über die Verwandtschaft der Proteinsequenzen, die mit einer Ähnlichkeit der Proteinstrukturen einhergeht.

Tabelle 1.1: Klassifizierung kommerziell erhältlicher Lipasen basierend auf Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz (Bornscheuer & Kazlauskas, 1999; Cygler *et al.*, 1993; Svendsen, 1994).

Klassifizierung	Größe	Beispiele
Lipasen aus Säugetieren (Pankreaslipasen)	50 kDa	Porcine pancreatic lipase (PPL)
Lipasen aus Pilzen		
<i>Candida rugosa</i> Familie	60-65 kDa	Lipasen aus <i>Candida rugosa</i> (CRL), <i>Geotrichum candidum</i> (GCL)
<i>Rhizomucor</i> Familie	30-35 kDa	Lipasen aus <i>Candida antarctica</i> (CAL-B), <i>Rhizomucor miehei</i> (RML), <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL), <i>Humicola lanuginosa</i> (HLL)
Sonstige		Lipasen aus <i>Aspergillus niger</i> (ANL), <i>Candida antarctica</i> (CAL-A), <i>Candida lipolytica</i> (CLL)
Lipasen aus Bakterien		
<i>Pseudomonas cepacia</i> Familie	30-35 kDa	Lipasen aus <i>Pseudomonas cepacia</i> (PCL), <i>Pseudomonas glumae</i> (PGL)
<i>Staphylococcus</i> Familie	40-45 kDa	Lipase aus <i>Bacillus thermocatenuatus</i> (BTL2)

1.1.2 Eigenschaften

Lipasen katalysieren die Hydrolyse von Triglyceriden (Abb. 1.1). Ihre bevorzugten Substrate sind schwer wasserlösliche, langkettige Triacylglyceride, sie vermögen jedoch außer ihren natürlichen Substraten ein breites Spektrum weiterer schwer wasserlöslicher Ester zu hydrolysieren. Neben der Hydrolyse katalysieren Lipasen auch andere Biotransformationen, wie die Veresterung primärer, sekundärer und tertiärer Alkohole, Umesterungsreaktionen und Alkoholysen (Bornscheuer & Kazlauskas, 1999; Haas & Joerger, 1995).

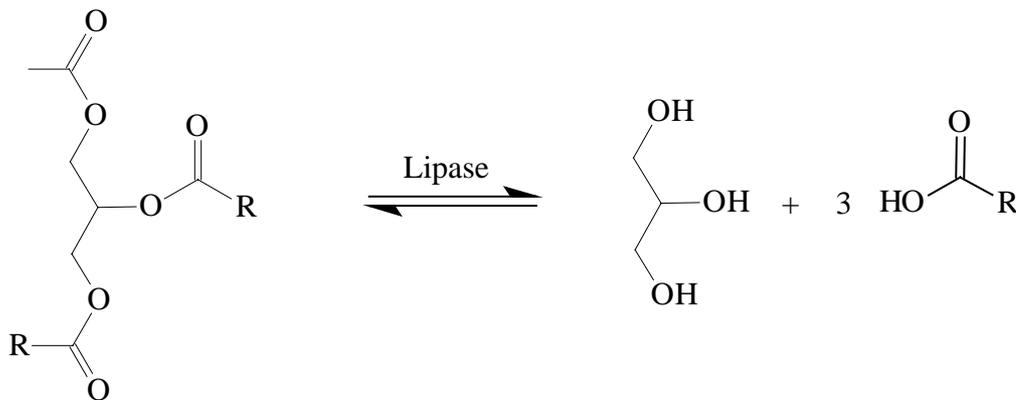


Abbildung 1.1: Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Triglycerides. R: Fettsäurerest.

1.1.3 Industrielle Anwendung von Lipasen

Lipasen finden aufgrund der großen Vielfalt der von ihnen katalysierten Reaktionen in der Industrie breite Anwendungsmöglichkeiten. Nach Proteasen und Carbohydrasen stehen Lipasen an dritter Stelle beim weltweiten Umsatz auf dem Enzymmarkt. Sie werden vor allem in der Waschmittelindustrie, der Nahrungsmittelindustrie und in der organischen Synthese eingesetzt (Bornscheuer & Kazlauskas, 1999; Schmid & Verger, 1998).

1.1.3.1 Lipasen in Waschmitteln

In nahezu allen modernen Waschmitteln sind Lipasen enthalten. Sie dienen zur Lösung von Fettverschmutzungen aus der Textilfaser und verhindern außerdem die erneute Anlagerung bereits gelöster Fette an die Faser. Die hierfür verwendeten Lipasen sind alle mikrobiellen Ursprungs. Sie müssen bei hohen Washtemperaturen und hohen pH-Werten stabil sein.

Bekannte Produkte sind z.B. Lipolase™ bzw. LipoPrime™ (Lipase aus *Humicola lanuginosa*) von Novo-Nordisk, Lipomax™ (Lipase aus *Pseudomonas pseudoalcaligenes*) von Gist-Brocades und Lumafast™ (Lipase aus *Pseudomonas mendocina*) von Genencor.

1.1.3.2 Lipasen in der Nahrungsmittelindustrie

In der Lebensmittelindustrie finden Lipasen Anwendung in der Milchwirtschaft und bei der Modifikation von Fetten und Ölen.

Bei der Herstellung von Käse werden Lipasen zur Beschleunigung der Reifung, zur Geschmacksverstärkung und zur Veränderung des Käsearomas eingesetzt. Außerdem ermöglichen sie die Herstellung „Enzym-modifizierten Käsearomas“ (EMC), das vor allem in den USA bei der Herstellung von Crackern, Dips, Salatsaucen, usw. verwendet wird. Zum Einsatz kommen hierbei insbesondere pregastrische Lipasen von Schaf und Ziege, sowie mikrobielle Lipasen aus *Mucor miehei* und *Aspergillus*.

Darüberhinaus werden Lipasen in der Nahrungsmittelindustrie bei der Herstellung strukturierter Triglyceride verwendet. Zum einen kann durch Umesterung der Triglyceride das Streichverhalten bzw. die Schmelztemperatur eines Fettes verändert werden. So werden z.B. große Mengen an Kakaobutter-Äquivalenten durch Umesterung des wesentlich preiswerteren Palmöls mit Stearinsäure hergestellt. Zum anderen können „funktionelle“ Triglyceride für Säuglingsnahrung oder spezielle Diäten synthetisiert werden. Beispiele hierfür sind Betapol™ von Unichema, ein menschliches Milchfett (1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerid, OPO), das als Diätfett für frühgeborene Kinder dient, oder Triglyceride vom Typ MLM mit einer langkettigen Fettsäure (L) in Position *sn*-2 und mittelkettigen Fettsäuren (M) in den Positionen *sn*-1 und *sn*-3, die leicht verdaut und im Darm resorbiert werden können, und denen teilweise sogar pharmakologische Wirkung zugeschrieben wird.

1.1.3.3 Lipasen in der Medizin

In der Medizin werden Lipasen zur Behandlung von Pankreasinsuffizienz als Substitutionstherapeutikum eingesetzt. Beachtung finden die Lipasen jedoch in letzter Zeit auch zunehmend als Ziel von Lipaseinhibitoren in Schlankheitsmitteln. Beispiel eines solchen Schlankheitsmittels ist Xenical™ von Roche.

1.1.3.4 Lipasen in der organischen Synthese

In der organischen Synthese finden Lipasen bei einer Vielzahl von Reaktionen zur Darstellung von Feinchemikalien und Zwischenstufen pharmazeutisch relevanter Verbindungen Verwendung. Die Lipasen werden dabei hauptsächlich als Biokatalysatoren bei der Darstellung enantiomerenreiner Verbindungen eingesetzt. Für einen umfangreichen Überblick sei an dieser Stelle auf Bornscheuer & Kazlauskas (1999) verwiesen.

1.1.4 Struktur und Aufbau von Lipasen

1.1.4.1 α/β -Hydrolase fold

Lipasen unterscheiden sich sowohl in ihrer Größe als auch in ihrer Proteinsequenz signifikant. Die Molekulargewichte der bekannten Lipasen reichen von ca. 20 kDa (*Candida antarctica* Lipase B) bis zu ca. 60 kDa (*Candida rugosa* Lipase). Vergleiche der dreidimensionalen Strukturen offenbarten jedoch ein für Lipasen und Esterasen charakteristisches Faltungsmuster, den sogenannten α/β -Hydrolase fold (Ollis *et al.*, 1992) (Abb. 1.2). Der α/β -Hydrolase fold besteht aus acht antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen, die durch α -Helices miteinander verbunden sind.

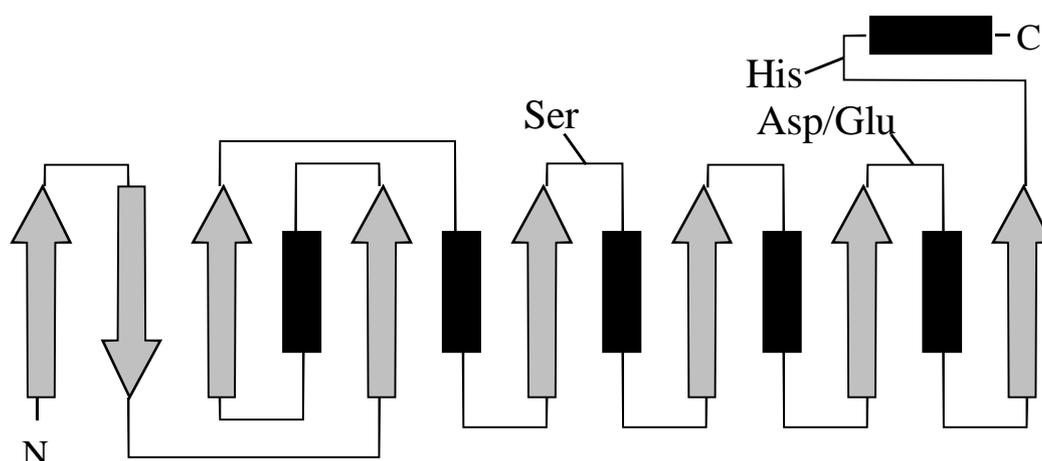


Abbildung 1.2: α/β -Hydrolase fold von Lipasen. β -Faltblattstrukturen sind als Pfeile, α -Helices als Balken dargestellt. Die Bereiche, in denen sich die Reste der katalytischen Triade befinden (Ser, Asp/Glu und His), sowie die Lage des Oxyanion holes sind gekennzeichnet. N steht für N-Terminus, C für C-Terminus.

1.1.4.2 Katalytische Triade

Ein weiteres in allen Lipasen konserviertes Strukturelement ist die katalytische Triade. Die katalytische Triade stellt das aktive Zentrum der Lipase dar und besteht aus den drei Aminosäureresten Serin, Histidin und Aspartat bzw. Glutamat (Cygler *et al.*, 1993). Die AS-Sequenz um das aktive Serin ist in einem Pentapeptid mit dem Motiv Gly-X-Ser-X-Gly hoch konserviert, wobei X entweder His oder Tyr sein kann (Woolley & Petersen, 1994).

1.1.4.3 Grenzflächenaktivierung und Lid

Eine Besonderheit von Lipasen ist die Aktivierung der Lipase bei der Anlagerung an die Interphase zwischen wasserunlöslichem Substrat und wässriger Lösung. Dieser Übergang von katalytisch inaktivem zu aktivem Enzym wird als Grenzflächenaktivierung bezeichnet (Sarda & Desnuelle, 1958). Der Reaktionsort der Lipase ist die Interphase, wobei deren Größe auch die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzungen bestimmt.

In wässriger Lösung ist das aktive Zentrum der Lipase von dem sogenannten Lid, das aus einer oder zwei α -Helices besteht, verdeckt und somit für das Substrat nicht zugänglich (Brady *et al.*, 1990; Schrag *et al.*, 1991b; Schrag *et al.*, 1991a; Winkler *et al.*, 1990). Diese Konformation wird als geschlossene Form bezeichnet. Bei der Aktivierung der Lipase an der Grenzfläche öffnet sich das Lid, wodurch das katalytische Zentrum für das Substrat zugänglich wird, die Lipase liegt dann in der offenen, aktiven Form vor (Brzozowski *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1993; Grochulski *et al.*, 1994; Tilbeurgh *et al.*, 1993).

1.1.5 Reaktionsmechanismus

Die Lipase-katalysierte Esterspaltung verläuft über verschiedene Zwischenstufen. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 1.3 skizziert. Im ersten Reaktionsschritt erfolgt ein nukleophiler Angriff des aktiven Serins an das Substrat, wodurch ein tetraedrisches Intermediat entsteht. Im zweiten Reaktionsschritt wird der Alkohol abgespalten und es entsteht ein Acyl-Enzym-Komplex, in dem der Imidazolring des Histidins aus dem aktiven Zentrum das freiwerdende Proton des aktiven Serins übernimmt. Das negativ geladene Intermediat wird im sogenannten Oxyanion hole, einem Strukturelement, das aus den zwei Amidgruppen zweier Aminosäuren gebildet wird, durch Ausbildung zweier Wasserstoffbrücken stabilisiert. Im dritten Reaktionsschritt wird ein Wassermolekül an den Acyl-Enzym-Komplex gebunden,

wodurch ein zweites tetraedrisches Intermediat entsteht. Dieses zerfällt im vierten Reaktionsschritt in Enzym und Produkt, womit der Katalyseprozeß abgeschlossen und ein Molekül freie Fettsäure entstanden ist.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Lipase-katalysierten Hydrolyse ist die Bildung des ersten tetraedrischen Intermediats (Beer *et al.*, 1996).

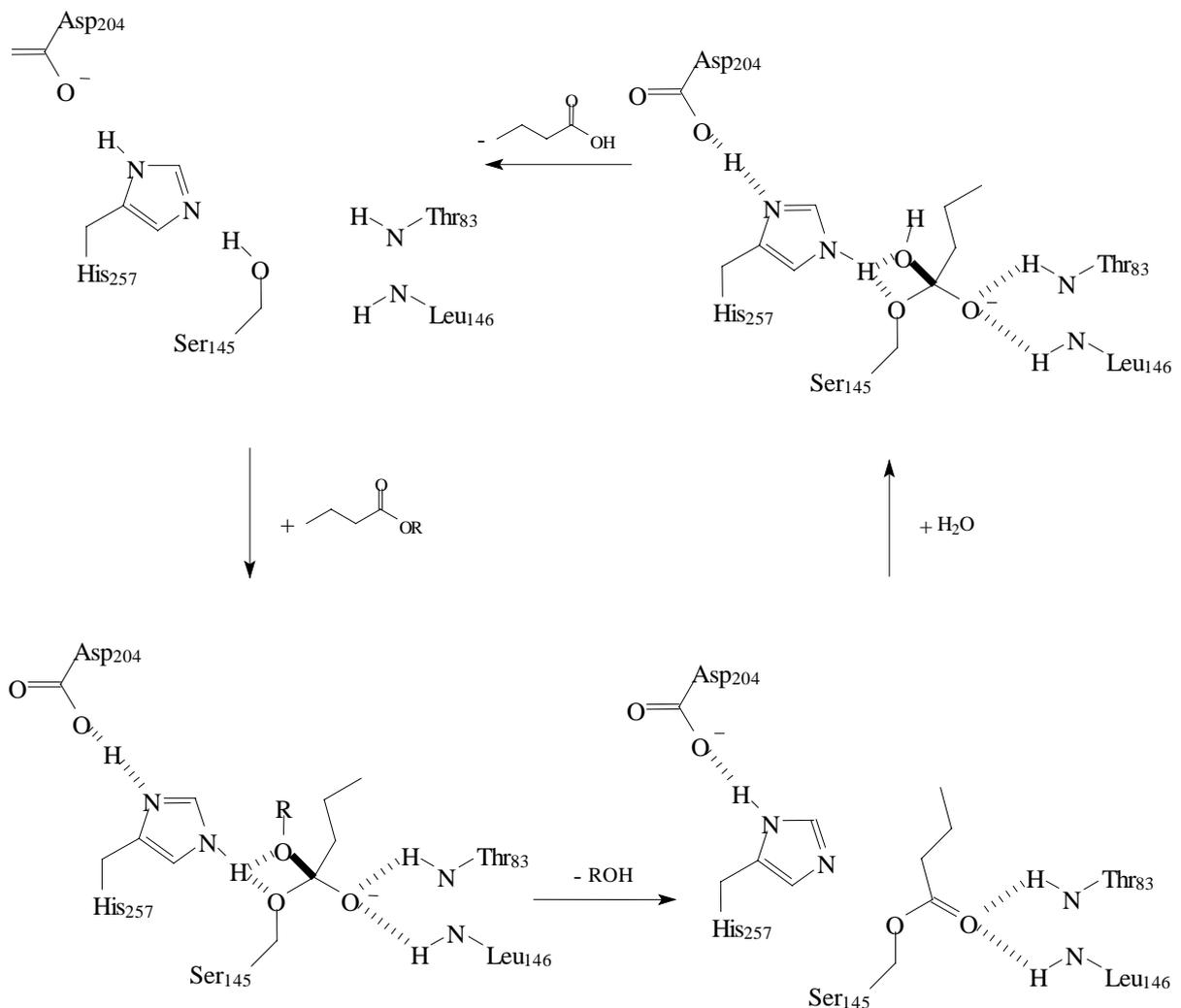


Abbildung 1.3: Reaktionsmechanismus von Lipasen (Carter & Wells, 1988) am Beispiel der Hydrolyse eines Butyrats. Die dargestellten Aminosäuren und ihre Sequenznummern entsprechen dem aktiven Zentrum der Lipase aus *Rhizopus oryzae* (Bornscheuer & Kazlauskas, 1999). H-Brücken Bindungen sind gestrichelt, die gespaltene Bindung ist fett hervorgehoben.

1.2 Lipasen aus Pseudomonaden

1.2.1 Biochemische Eigenschaften

Unter den bakteriellen Lipasen sind die der Gattung *Pseudomonas* sowohl biochemisch als auch molekulargenetisch am besten charakterisiert. Alle Lipasen aus *Pseudomonas* sind chromosomal kodierte Exolipasen mit einem GC-Gehalt von etwa 67 %. Sie weisen hohe Thermostabilität auf und besitzen ein pH-Optimum im alkalischen Bereich (Sobéron-Chávez & Palmeros, 1994; Svendsen *et al.*, 1995).

Generell können die *Pseudomonas*-Lipasen in drei Homologiegruppen eingeteilt werden (Tabelle 1.2).

Die Lipasen aus *Ps. aeruginosa*, *Ps. pseudoalcaligenes*, *Ps. fragi* und *Ps. species 109* bilden die Gruppe I. Sie zeichnen sich durch ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa aus und besitzen eine Signalsequenz sowie eine Disulfidbrücke. Zur korrekten Faltung in ihre aktive Form benötigen diese Lipasen ein Helferprotein. Im Genom von *Pseudomonas* liegt das Gen für das Helferprotein im selben Gencluster wie das Gen für die Lipase.

Die Lipasen aus Gruppe II, zu denen die Lipasen aus *Ps. cepacia*, *Ps. glumae* und *Ps. species KWI 56* gehören, haben ein Molekulargewicht von ca. 33 kDa, zeigen ein breites Substratspektrum und besitzen wie Gruppe I Lipasen eine Signalsequenz und eine Disulfidbrücke. Auch sie benötigen ein Helferprotein zur Aktivierung. Lipasen und Helferproteine aus Gruppe I sind bis zu 66 % homolog zu Gruppe II.

Zu Gruppe III gehören die Lipasen aus *Ps. fluorescens* und *Ps. species LS107d2*. Diese stellen mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa die größten Lipasen dar. Ihr Substratspektrum ist breit. Sie zeigen außer dem Pentapeptid der katalytischen Triade kaum Homologie zu Lipasen aus Gruppe I und II. Sie benötigen kein Helferprotein, besitzen keine Signalsequenz und keine Disulfidbrücke.

Aufgrund ihrer großen Vielseitigkeit in Bezug auf Substratspektrum, Reaktionsbedingungen und Stereoselektivität spielen die Lipasen aus *Pseudomonas* eine wichtige Rolle in der Biotechnologie. Industriell werden die *Pseudomonas*-Lipasen vor allem als Zusätze in Detergentien (z.B. *Ps. alcaligenes* Lipase) und in der organischen Synthese (z.B. Lipasen aus *Ps. cepacia*, *Ps. glumae* und *Ps. fluorescens*) verwendet (Reetz & Jaeger, 1998).

Tabelle 1.2: Lipasen aus *Pseudomonas*. Klassifizierung der *Pseudomonas*-Lipasen nach Gilbert (1993).

Familie	Spezies	Referenz
I	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EF 2	(Gilbert <i>et al.</i> , 1991)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 1	(Andreoli <i>et al.</i> , 1989; Wohlfarth <i>et al.</i> , 1992; Wohlfarth & Winkler, 1988)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAC 1R	(Jaeger <i>et al.</i> , 1992)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TE 3285	(Chihara-Siomi <i>et al.</i> , 1992; Nishioka <i>et al.</i> , 1991)
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> M 1	(Andreoli <i>et al.</i> , 1989)
	<i>Pseudomonas species</i> 109	(Ihara <i>et al.</i> , 1991; Ihara <i>et al.</i> , 1992)
	<i>Pseudomonas fragi</i> IFO 3458	(Kugimiya <i>et al.</i> , 1986)
	<i>Pseudomonas fragi</i> IFO 12049	(Aoyama <i>et al.</i> , 1988)
II	<i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC 21808	(Hom <i>et al.</i> , 1991a; Kordel <i>et al.</i> , 1991)
	<i>Pseudomonas cepacia</i> DSM 3959	(Aamand <i>et al.</i> , 1994; Jorgensen <i>et al.</i> , 1991)
	<i>Pseudomonas cepacia</i> M 1233	(Nakanishi <i>et al.</i> , 1989; Nakanishi <i>et al.</i> , 1991)
	<i>Pseudomonas species</i> KWI 56	(Iizumi <i>et al.</i> , 1991)
	<i>Pseudomonas glumae</i>	(Batenburg <i>et al.</i> , 1991a; Frenken <i>et al.</i> , 1992)
III	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	(Chung <i>et al.</i> , 1991b; Chung <i>et al.</i> , 1991a)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B 52	(Tan & Miller, 1992)
	<i>Pseudomonas species</i> LS 107 d2	(Johnson <i>et al.</i> , 1992)

1.2.2 Gewinnung von *Pseudomonas*-Lipasen

Alle Lipasen aus *Pseudomonas* sind chromosomal kodierte Exolipasen. Die meisten kommerziell erhältlichen *Pseudomonas*-Lipasen wurden zunächst aus ihren Wirtstämmen isoliert. Die Ausbeuten bei diesem Verfahren sind relativ gering, die Produktionskosten hoch. Darüberhinaus sind die Enzympräparationen oft durch andere Enzyme verunreinigt, der

Lipase-Anteil liegt z.T. sogar unter 5 %. Außerdem erfordern viele *Pseudomonas*-Stämme aufgrund ihrer Pathogenität besondere Sicherheitsvorkehrungen bei ihrer Kultivierung.

Um diese Probleme zu umgehen, finden rekombinante Technologien zunehmend Einzug in die Lipase-Produktion. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Lipase-Genen aus Pseudomonaden isoliert und in verschiedenen rekombinanten Wirtsstämmen, wie *Bacillus*, *Streptomyces*, *E. coli*, *Saccharomyces* oder *Pseudomonas* exprimiert (Tabelle 1.3).

Tabelle 1.3: Klonierte *Pseudomonas*-Lipasen

<i>Pseudomonas</i> -Lipase	Transformierter Wirt	Referenz
<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Ps. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	(Chihara-Siomi <i>et al.</i> , 1992; Wohlfarth <i>et al.</i> , 1992; Wohlfarth & Winkler, 1988)
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	<i>Ps. putida</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ps. pseudoalcaligenes</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>E. coli</i>	(Andreoli <i>et al.</i> , 1989)
<i>Ps. species 109</i>	<i>E. coli</i>	(Ihara <i>et al.</i> , 1991; Ihara <i>et al.</i> , 1992)
<i>Ps. fragi</i>	<i>E. coli</i>	(Aoyama <i>et al.</i> , 1989; Aoyama <i>et al.</i> , 1988; Kim <i>et al.</i> , 1994; Kugimiya <i>et al.</i> , 1986)
<i>Ps. cepacia</i>	<i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ps. fluorescens</i> , <i>Ps. oleovorans</i> , <i>Ps. cepacia</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Strep. lividans</i>	(Hom & Mielenz, 1991b; Hom <i>et al.</i> , 1991a; Jorgensen <i>et al.</i> , 1991; Nakanishi <i>et al.</i> , 1989; Nakanishi <i>et al.</i> , 1991; Quyen <i>et al.</i> , 1999)
<i>Ps. species KWI 56</i>	<i>Ps. species</i> , <i>E. coli</i>	(Iizumi & Fukase, 1994a; Iizumi <i>et al.</i> , 1994b; Iizumi <i>et al.</i> , 1991; Nakamura <i>et al.</i> , 1992)
<i>Ps. glumae</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ps. putida</i> , <i>Sacch. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	(Batenburg <i>et al.</i> , 1991b; Frenken <i>et al.</i> , 1992)
<i>Ps. fluorescens</i>	<i>E. coli</i>	(Chung <i>et al.</i> , 1991b; Chung <i>et al.</i> , 1991a; Tan & Miller, 1992)
<i>Ps. species LS 107 d2</i>	<i>E. coli</i>	(Johnson <i>et al.</i> , 1992)

Inzwischen werden die meisten kommerziell erhältlichen *Pseudomonas*-Lipasen homolog rekombinant in *Pseudomonas* exprimiert. Die dabei erzielten Ausbeuten sind gegenüber der Gewinnung aus den Wildtyp-Stämmen allgemein um ein Vielfaches erhöht (Hom & Mielenz, 1991b; Nakamura *et al.*, 1992). Allerdings ist in vielen Fällen die Lipase-Produktion aufgrund der Instabilität der Expressionsplasmide dieser Stämme nicht stabil. Auch gelten einige der für die rekombinante Lipase-Produktion verwendeten *Pseudomonas*-Stämme als potentiell pathogen, bei ihrer Kultivierung müssen also ebenfalls besondere Sicherheitsmaßnahmen getroffen werden.

Daher wurden andere Stämme, insbesondere *E. coli* als bewährtes und sehr gut erforschtes System, für die rekombinante Expression der *Pseudomonas*-Lipasen untersucht. Die Überexpression einer aktiven Lipasen aus *Pseudomonas* in *E. coli* konnte bisher allerdings nicht erreicht werden. Bei den *Pseudomonas*-Lipasen der Familien I und II wird die aktive Expression schon dadurch verhindert, daß diese Lipasen zur korrekten Faltung in ihre aktive Form ein Helferprotein benötigen. Doch auch bei der Überexpression von Lipasen der dritten Familie, die kein Helferprotein besitzen, wurde die Bildung von inaktiven Inclusion-Bodies in *E. coli* beobachtet (Chung *et al.*, 1991b). Erst nach Überexpression sowohl der Lipase als auch ihres Helferproteins in jeweils einem rekombinanten *E. coli*-Stamm konnte von Quyen *et al.* (1999) für die Lipase aus *Pseudomonas cepacia* ATCC21808 ein effektives *In-vitro*-Refolding entwickelt werden, das es erlaubte, eine *Pseudomonas*-Lipase in *E. coli* überzuexprimieren und quantitativ in ihre aktive Form rückzufalten.

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines rekombinanten Expressionssystems für die Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* in *E. coli* und ihre funktionelle Rückfaltung.

Die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* entspricht in ihren biochemischen Eigenschaften und ihrer Sequenz der Lipase aus *Pseudomonas glumae* (Lang *et al.*, 1996; Taipa *et al.*, 1995) und gehört daher gleichsam der Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 zur Familie II der *Pseudomonas*-Lipasen. Beide Lipasen werden kommerziell in der organischen Synthese verwendet und werden derzeit durch homologe Expression in *Pseudomonas* gewonnen (Bornscheuer & Kazlauskas, 1999).

Gegenüber der homologen Expression hat die Produktion der Lipasen in *E. coli* jedoch verschiedene Vorteile. So zählt *E. coli* zu den „sicheren“ Produktionsstämmen, wohingegen viele Pseudomonaden als potentiell pathogen gelten und ihre Kultivierung daher spezielle Sicherheitsmaßnahmen erfordert. Darüberhinaus sind bei einer Verbesserung der funktionellen Eigenschaften der beiden Lipasen durch rationales Design oder insbesondere evolutive Strategien beim High-Throughput-Screening der in *Pseudomonas* exprimierten Lipase-Mutanten gegenüber in *E. coli* exprimierten Mutanten zusätzliche Klonierungs- und Transformationsschritte notwendig (Jaeger & Reetz, 1998; Reetz *et al.*, 1997).

Um bei der Herstellung der Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* Risiken zu vermeiden, eine kostengünstige Produktion zu ermöglichen und die Grundlage für eine gezielte genetische Optimierung dieser vielseitigen Lipasen zu schaffen, sollte daher in der vorliegenden Arbeit ein effizientes Konzept zur rekombinanten Expression der Lipasen in *E. coli* etabliert und ein schnelles *In-vitro*-Refolding entwickelt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese:	DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell (BioRad); Video Copy Processor P66E (Mitsubishi); BWM 9X Monitor (Javelin Electronics); UV-Leuchttisch (MWG-Biotech)
Autoklav:	PACS 2000 (Getinge)
Brutschränke:	WTE (Binder); UM 500 (Memmert)
Cross-flow:	Cross Filtron GH 982 (Filtron); Pellicon 2 (Millipore)
Dialyse:	Millipore Filter, 0,025 µm (Millipore)
DNA-Sequenzierer:	373A DNA Sequencer (PE Applied Biosystems); ABI Prisma 377 (PE Applied Biosystems);
Elektroporation:	Gene Pulser, Pulse Controller (BioRad)
Elisa-Reader:	Elisa-Reader Titertek Plus (ICN)
Fermenter:	5-l-Fermenter Labfors (Infors); 42-l-Labor-Pilot-Fermenter LP 351 (Bioengineering)
Gaschromatograph:	GC 800 (Fisons Instruments)
Gefriertrockner:	LYOVAC GT 2 (Finn Aqua)
Geltrockner:	Gel-dryer 583 (BioRad)
Homogenisator:	Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel)
Inkubatoren:	HT-Schüttelinkubator (Infors AG); Certomat R (Braun)
Mikroskop:	Axiolab E (Zeiss)
Mikrowellengerät:	Micro-Chef FM A935 (Moulinex)
Netzgeräte:	Power Pac 3000, Power Pac 300, Model 200/2.0 Power Supply (BioRad)
PAGE:	Minigel-Twin G42 (Biometra); Model 583 Gel Dryer (BioRad); Phast System (Pharmacia)
PCR-Geräte:	Master Cycler Gradient (Eppendorf), DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer); Robocycle Gradient 40 (Stratagene)
pH-Meter:	Digital pH-Meter pH525 (WTW)
Photometer:	UV/VIS-Spektrophotometer Ultrospec 3000 (Pharmacia)

pH-Stat-Meßeinrichtung:	Impulsomat 614, pH-Meter 620, Dosimat 665 (Metrohm); Wasserbad B3 (Haake-Fisons); X/Y-Schreiber L200 (Linseis)
Protein Blot:	Trans Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell (BioRad)
Protein-Sequenzierer:	491 Protein Sequencer, 140 C Microgradient System, 785 Programmable Absorbance Detector (PE Applied Biosystems); Power Macintosh 7200/90 (Apple Macintosh)
Retsch-Mühle:	MM 2000 (Retsch, Haan)
Speed-vac:	Concentrator 5301 (Eppendorf)
Thermomixer:	Thermomixer 5436 (Eppendorf)
Ultrafiltration:	Ultrafiltrationskammern (Filtron)
Ultraschall:	Sonifier W-250 (Branson); Sonorex Super RK 514 H (Bandelin)
Vortex:	Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
Waagen:	Basic, MC1 Research RC 210 D (Sartorius); Precision Advanced (OHAUS)
Zentrifugen:	Centrifuge 5417 C, Centrifuge 5415 R, Centrifuge 5810 R (Eppendorf); Sorvall RC - 5B, Rotor: SA 600 (Du Pont Instruments); Universal 30 F (Hettich)

2.2 Chemikalien und Enzyme

Amresco, Solon/USA	Phenol
ARK, Darmstadt	Oligonukleotide
Biomol Feinbiochemica, Hamburg	Ampicillin
BIO-RAD Laboratories, München	„BIO-RAD Protein-Assay“ zur Protein- bestimmung, SDS-Markerproteine, PVDF- Membran
Boehringer Mannheim, Mannheim	Alkalische Phosphatase, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, T4 DNA-Ligase, RNase A, Restriktionsenzyme, S1-Nuklease
Difco Laboratories, Detroit/USA	Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton, Casaminoacids

Life Technologies, Karlsruhe	Taq-DNA-Polymerase, DNA-Längenstandard, dNTPs für PCR, 10x TBE für Sequenzierung, Restriktionsenzyme
Fluka Chemie, Buchs/Schweiz	DMSO, EDTA, Chemikalien p.a.
FMC BioProducts, Rockland/USA	LMP-Seaplaque GTG Agarose
Interactiva, Ulm	Oligonukleotide
Invitrogen, Groningen/Niederlande	Klonierungsvektoren
MBI Fermentas, St. Leon-Roth	Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, alkalische Phosphatase, DNA-Längenstandard
Merck, Darmstadt	Chemikalien p.a.
Millipore, Eschborn	Millipore Nitrocellulose Filter 0,025 µm für Dialyse
New England Biolabs, Schwalbach	Deep-Vent-DNA-Polymerase, Restriktionsenzyme
PE Applied Biosystems, Weiterstadt	Chemikalien zur DNA- und Proteinsequenzierung
Pharmacia LKB, Freiburg	dNTPs für PCR
Pierce, BA oud-Beijerland/NL	BCA Protein Assay Reagenz
Qiagen, Hilden	Plasmid Midi Kit, PrepSpin Plasmid Mini Kit, Qiaquick Gel Extraction Kit; Taq-Polymerase
Roth GmbH, Karlsruhe	Ethanol p.a., Agarose NEEO, Rotiphorese Gel 30 30% Acrylamid-Bisacrylamid, Tris -Base, IPTG
Sartorius, Göttingen	Cellulose Nitrate Filter 0,45 µm bzw. 1,2 µm
Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg	SDS, Coomassie Brilliant Blue R250 & G250, Ficoll 400, Ethidiumbromid, TEMED
Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen	Antibiotika, BSA, Lysozym, Spermin, PEG
Stratagene, La Jolla/USA	Quik-Change-Mutagenese-Kit, Pfu Turbo DNA Polymerase

Alle weiteren Chemikalien der Grade „reinst“ oder „p.a.“ wurden von der Firma Fluka, Neu-Ulm, oder Sigma, Deisenhofen, bezogen.

2.3 Bakterienstämme und Plasmide

Alle verwendeten *E. coli*-Stämme sind K12-Derivate. Genetische Merkmale und Herkunft dieser Stämme sind in Tabelle 2.1 zusammengefaßt, die Abkürzungen für die Geno- und Phänotypen entsprechen der Nomenklatur von (Bachmann, 1990). Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2, die verwendeten Oligonukleotide in den Tabellen 2.3, 2.4 und 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
BL21 (DE3)	<i>hsdS gal</i> (λ cIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>)	(Studier & Moffatt, 1986)
DH5 α	<i>F</i> (ϕ 80d Δ lacZ)M15) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	(Hanahan, 1983)
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>F'</i> [<i>traD36 proAB lacI^f lacZ</i> Δ M15]	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
JM110	<i>rpsL thr leu thi lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>F'</i> [<i>traD36 proAB lacI^f lacZ</i> Δ M15]	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Resistenz	Herkunft/Referenz
pUC19	Expressionsvektor, P_{lac}	Ap ^R	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pET20b(+)	Expressionsvektor, P_{T7}	Ap ^R	(Studier & Moffatt, 1986)
pCYTEXP1	Expressionsvektor, P_{RPL}	Ap ^R	(Belev <i>et al.</i> , 1991)
pT-Lip-Hp	Gen für die reife Lipase und ihr Helferprotein aus <i>Ps. cepacia</i> ATCC21808 in pCYTEXP1	Ap ^R	(Quyen <i>et al.</i> , 1999)

pTompAd70HpHis	Verkürztes Helfergen aus <i>Ps. cepacia</i> ATCC21808 fusioniert mit ompA und His-Tag in pCYTEXP1	Ap ^R	(Quyen <i>et al.</i> , 1999)
pTEompAd67LipB	Verkürztes Helfergen aus <i>Ps. aeruginosa</i> TE3285 fusioniert mit ompA in pCYTEXP1	Ap ^R	(Dieterich, 1998)

Tabelle 2.3: Für die Sequenzierung allgemein verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
M13-F	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung von pUC-Derivaten
M13-R	GTTTTCCCAGTCACGAC	Sequenzierung von pUC-Derivaten
SDM1	CCAACACTACGTTTTAACTGAAACAACTGG	Sequenzierung von pCYTEXP1-Derivaten
SDM3	GCGAACGCCAGCAAGACGTAGCC CAGC	Sequenzierung von pCYTEXP1-Derivaten
PET-F	TAATACGACTCACTATAGG	Sequenzierung von pET-Derivaten
PET-R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierung von pET-Derivaten

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide bei der Gensynthese und Klonierung der Lipase und ihres Helferproteins aus *Pseudomonas species* KWI 56. Es sind nur die für die Amplifikation bei der PCR, Sequenzierung und Mutagenese verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Die für die Gensynthese verwendeten langen Oligonukleotide sind in Kapitel 3.1 in der Abbildung 3.1.3 dargestellt.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
KWI1a	GGGGGATATCAATACATATG	Gensynthese Box 1, Sequenzierung
KWI1b	CCCCGAATTCACCAGGTAACTTTGGTAGC	Gensynthese Box 1
KWI2a	GCTACCAAAGTTAACCTGGT	Gensynthese Box 2, Sequenzierung

KWI2b	CCCCGAATTCTGGACGGATCCAG AACGTTA	Gensynthese Box 2
KWI3a	TAACGTTCTGGATCCGTCCA	Gensynthese Box 3, Sequenzierung
KWI3b	CCCCGAATTCACCTTCCCGGGAG GTCATAG	Gensynthese Box 3
KWI4a	CTATGACCTCCCGGGAAGGT	Gensynthese Box 4, Sequenzierung
KWI4b	CCCCGAATTCTCACGAAGCTTAG CCAGAGC	Gensynthese Box 4
KWI5a	GCTCTGGCTAAGCTTCGTGA	Gensynthese Box 5, Sequenzierung
KWI5b	CCCCGAATTCCACGAGCGGCCGC TTCCGGA	Gensynthese Box 5
KWI6a	TCCGGAAGCGGCCGCTCGTG	Gensynthese Box 6, Sequenzierung
KWI6b	CCCGGAATTCTTAACGAGCA	Gensynthese Box 6, Sequenzierung
KWI1c	ACCAGGTAACTTTGGTAGC	Sequenzierung
KWI2c	TGGACGGATCCAGAACGTTA	Sequenzierung
KWI3c	ACCTTCCCGGGAGGTCATAG	Sequenzierung
KWI4c	TCACGAAGCTTAGCCAGAGC	Sequenzierung
KWI5c	CACGAGCGGCCGCTTCCGGA	Sequenzierung
SeqKWI1d	TCACGGTCTGTCTGGTACCG	Sequenzierung
SeqKWI1e	TGTCGGTACCAGACAGACCG	Sequenzierung
SeqKWI2d	GGACGCTCTGGCTGCTCTGC	Sequenzierung
SeqKWI2e	GCAGAGCAGCCAGAGCGTCC	Sequenzierung
SeqKWI4d	GGCTGGTTCTTCTGCTCCGC	Sequenzierung
SeqKWI4e	GCGGAGCAGAAGAACCAGCC	Sequenzierung
SeqKWI5d	CCCGACCCTGACCGACGCTC	Sequenzierung
SeqKWI5e	GAGCGTCGGTCAGGGTCGGG	Sequenzierung
RepKW3.2F	GTTCTGTCTACCTCTTACAAATG GAACC	Reparatur von Box 3 (Mutagenese)
RepKW3.2R	GGTTCCATTTGTAAGAGGTAGAC AGAAC	Reparatur von Box 3 (Mutagenese)
RepKW4.60F	GGGAAGGTCGTGCTCCGCTGGCT CGTCG	Reparatur von Box 4 (Mutagenese)
RepKW4.60R	CGACGAGCCAGCGGAGCACGAC CTTCCC	Reparatur von Box 4 (Mutagenese)

RepKW22.3F	CGATCGTGGTGCTGGTTCTGCTC GTTAAG	Reparatur von Box 5/6 (Mutagenese)
RepKW22.3R	CTTAACGAGCAGAACCAGCACCA CGATCG	Reparatur von Box 5/6 (Mutagenese)
OmpAF	AGCATTCAAAGCAGAAGGCTTTG G	Klonierung von <i>ompA</i>
NdeIdLipKwi	GGGGGGGAAGGACATATGGCTG ACGGTTACGCTGC	Klonierung von <i>rlip</i>
LipKWIEcoRI	GGGGGAATTCATTAACCTCCTGC CAGTTTC	Klonierung von <i>rlip</i> und <i>ompArlip</i>
OmpAdLipKWIR	GCGTAACCGTCAGCAGCCTGCGC TACGGTAGCG	Fusion von <i>ompA</i> mit <i>rlip</i>
dLipKWIompAF	GCAGGCTGCTGACGGTTACGCTG C	Fusion von <i>ompA</i> mit <i>rlip</i>
NdeIActKWI	GGGGGGGAAGGACATATGACCT CCCGGGAAGGTCG	Klonierung von <i>act</i>
NdeId70ActKWI	GGGGGGGAAGGACATATGCCGC CGTCTCTGGCTGG	Klonierung von <i>d70act</i>
ompAActKWIR	CCTTCCCGGGAGGTAGCAGCCTG CGCTACGGTAGC	Fusion von <i>ompA</i> und <i>act</i>
ActKWIompAF	GCAGGCTGCTACCTCCCGGGAAG C	Fusion von <i>ompA</i> und <i>act</i>
OmpAd70ActKWIR	CAGAGACGGCGGAGCAGCCTGC GCTACGGTAGC	Fusion von <i>ompA</i> und <i>d70act</i>
D70ActKWIompAF	GCAGGCTGCTCCGCCGTCTCTGG	Fusion von <i>ompA</i> und <i>d70act</i>

Tabelle 2.5: Verwendete Oligonukleotide bei der Gensynthese und Klonierung der Lipase und ihres Helferproteins aus *Chromobacterium viscosum*. Es sind nur die für die Amplifikation bei der PCR, Sequenzierung und Mutagenese verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Die für die Gensynthese verwendeten langen Oligonukleotide sind in Kapitel 3.2 in der Abbildung 3.2.3 dargestellt.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
CV1A:	GGGGAATTCACATATGGTTCG	Gensynthese Box 1, Sequenzierung
CV1B:	GGGGAAGCTTCGATCAGGTAACT TTAGTAGC	Gensynthese Box 1
CV2A:	TACTAAAGTTAACCTGATCG	Gensynthese Box 2, Sequenzierung

CV2B:	GGGGAAGCTTGGTGCTGGGATCC ACCAACG	Gensynthese Box 2
CV3A:	CGTTGGTGGATCCCAGCACC	Gensynthese Box 3, Sequenzierung
CV3B:	GGGGAAGCTTATCGATTAAACTCC CTGCAG	Gensynthese Box 3
CV4A:	CTGCAGGGAGTTTAATCGATGG	Gensynthese Box 4, Sequenzierung
CV4B:	GGGGAAGCTTCAGTGCGTCTAGA GCCGCCG	Gensynthese Box 4
CV5A:	CGGCGGCTCTAGACGCACTGG	Gensynthese Box 5, Sequen- zierung
CV5B:	GGGGAAGCTTCCTGCTGAGCATGC AGTGCTG	Gensynthese Box 5
CV6A:	AGCACTGCATGCTCAGCAGG	Gensynthese Box 6, Sequen- zierung, Reparatur Box 6
CV6B:	GGGGAAGCTTATTAACCACC	Gensynthese Box 6, Sequenzierung, Reparatur Box 6
CV1C:	CGATCAGGTAACTTTAGTAGC	Sequenzierung
CV2C:	GGTGCTGGGATCCACCAACG	Sequenzierung
CV3C:	ATCGATTAAACTCCCTGCAG	Sequenzierung
CV4C:	CAGTGCGTCTAGAGCCGCCG	Sequenzierung
CV5C:	CCTGCTGAGCATGCAGTGCTG	Sequenzierung
CV4.1mut1100F	GGGAGTTTAATCGATGGCACAGG CTGACCGCCCGG	Reparatur von Box 4 (Mutagenese)
CV4.1mut1100R	GCCGGGCGGTCAGCCTGTGCCATC GATTAAACTCC	Reparatur von Box 4 (Mutagenese)
CV5mut1799F	GCTCGCCTGGCAGCACTGGATGCT CAGCTGACCCCGG	Reparatur von Box 5 (Mutagenese)
CV5mut1799R	CCGGGGTCAGCTGAGCATCCAGTG CTGCCAGGCGAGC	Reparatur von Box 5 (Mutagenese)
CV6.6repR	GCGTAAGCCTGGTAACGGG	Reparatur von Box 6 (mit CV6A, rekombinante PCR)
CV6.18repF	ACCCGTTACCAGGCTTACGC	Reparatur von Box 6 (mit CV6B, rekombinante PCR)
NdeCVrlip	GGGGGGGAATTCCATATGGCTGA CACCTACGCTGCTACC	Klonierung von <i>rlipA</i> in pET20b(+)
rlipCVEco	CGGAATTCTTAAACTCCCTGCAGT TTCAGACGG	Klonierung von <i>rlipA</i> in pET20b(+)

NdeCVd79act	GGGGGGGAATTCCATATGCCGGG TGCACTGGCTGGTTC	Klonierung von d79 <i>lipB</i> in pET20b(+)
NdeCVact	GGGGGGGAATTCCATATGGCACA GGCTGACCGCCCG	Klonierung von <i>lipB</i> in pET20b(+)
actCVEco	CGGAATTCTTATTAACCACCAGCG CCACGG	Klonierung von <i>lipB</i> und d79 <i>lipB</i> in pET20b(+)

2.4 Medien, Puffer und Lösungen

2.4.1 Medien

LB (Luria-Bertani) Medium:	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
	pH 7,5	
	(1,5 % Agar)	

M9 Minimal Medium: (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	5 x Salze	200 ml
	MgSO ₄	2,5 mM
	CaCl ₂	0,1 mM
	Thiamin	2,5 mM
	Glukose	2 %

5 x Salze:	Na ₂ HPO ₄	30 g
	KH ₂ PO ₄	15 g
	NaCl	2,5 g
	NH ₄ Cl	5g
	H ₂ O	ad 1 l
	pH 7,4 (1,5 % Agar)	

TSS: (Chung <i>et al.</i> , 1989)	PEG6000	10 g
	DMSO	5 ml
	1 M MgCl ₂	5 ml
	LB	ad 100 ml
	pH 6,5	
NZYM: (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	2 g
	H ₂ O	ad 1 l
	pH 7,0	

2.4.2 Antibiotika und andere Medienzusätze

Die Stammlösungen der Medienzusätze wurden mit Sterilfiltern (0,2 µm; Rotilabo, Roth) sterilisiert.

	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	25 mg/ml	25 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin	20 mg/ml	20 µg/ml
Nalidixinsäure	40 mg/ml	40 µg/ml
IPTG	1 M	1 mM
X-gal	40 mg/ml	40 µg/ml

2.4.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

TE 10.1:	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA, pH 8,0	1 mM

TE 10.01:	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA, pH 8,0	0,1 mM
Agarose-Gelelektrophorese:		
TAE (50x):	Tris Base	242 g
	Eisessig	57 ml
	0,5 M EDTA, pH 8,0	100 ml
	H ₂ O	ad 1 l
DNA-Auftragspuffer (5x):	Ficoll 400	20 %
	Bromphenolblau	0,1 %
	EDTA, pH 7,5	25 mM
SDS-PAGE:		
Lower Tris (4x):	Tris	36,34 g
	SDS	0,8 g
	H ₂ O	ad 200 ml
	pH 8,8	
Upper Tris (4x):	Tris	12,11 g
	SDS	0,8 g
	H ₂ O	ad 200 ml
	pH 6,8	
Trenngel (15%):	Acrylamidlösung 30%/0,8%	4 ml
	4x Lower Tris	2 ml
	H ₂ O	2 ml
	TEMED	4 µl
	APS (10%)	40 µl

Sammelgel (4%):	Acrylamidlösung 30%/0,8%	0,52 ml
	4x Upper Tris	1 ml
	H ₂ O	2,47 ml
	TEMED	4 µl
	APS (10%)	40 µl
Laufpuffer (5x): (Laemmli, 1970)	Tris Base	15 g
	Glycin	72 g
	SDS	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
	pH 8,3	
Probenpuffer (5x):	Tris/HCl, pH 6,8	320 mM
	Glycerin	50 %
	SDS	10 %
	β-Mercaptoethanol	25 %
	Bromphenolblau	0,1 %
Coomassie-Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue R-250	2 g
	Ethanol	0,5 g
	Methanol	42,5 %
	Eisessig	10 %
Entfärber für SDS-PAGE:	Methanol	40 %
	Eisessig	10 %
Proteinblotting: Anoden-Puffer 1:	Tris	0,3 M
	Methanol	10 %
	pH 10,4	

Anoden-Puffer 2:	Tris	25 mM
	Methanol	10 %
	pH 10,4	
Kathoden-Puffer:	Tris	25 mM
	6-Aminocapronsäure	40 mM
	Methanol	10 %
	pH 9,4	
PVDF-Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue R-250	0,025 %
	Methanol	40 %
PVDF-Entfärbelösung:	Methanol	50 %

2.5 Zellkultivierung

2.5.1 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit LB gewaschen, in 500 µl LB-Medium resuspendiert und mit 500 µl Glycerin vermischt. Die Dauerkulturen wurden bei -70°C gelagert.

2.5.2 Anzuchtbedingungen

Aus Glycerinkulturen wurden Einzelkoloniausstriche auf selektiven LB-Agar-Platten angefertigt. Für Vorkulturen wurden 5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit einer Einzelkolonie inokuliert und, wenn nicht anders vermerkt, 8-15 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Für Tageskulturen wurden diese Vorkulturen 1:100 in entsprechendem

Medium verdünnt und wiederum im Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Zellzahl wurde jeweils durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt (Spektrophotometer Ultrospec 3000).

2.5.3 Expressionssysteme in *E. coli*

2.5.3.1 Das λ -Expressionssystem

Der Expressionsvektor pCYTEXP1 trägt den Promotor (P_{LR}) des Bakteriophagen Lambda (Belev *et al.*, 1991). Hierbei handelt es sich um einen unter der Kontrolle des temperatursensitiven λ -Repressors stehenden Promotor. Der Repressor, kodiert durch das auf dem Plasmid befindliche cI857-Gen, wird durch Erhöhung der Temperatur von 30°C auf 42°C inaktiviert und dadurch die Transkription des im Anschluß an den Promotor inserierten rekombinanten Gens gestartet.

2.5.3.2 Das T7-Expressionssystem

Das T7-RNA-Polymerase-Promotor-System eignet sich besonders zur Überexpression von Genen in *Escherichia coli* (Tabor & Richardson, 1985). Die T7-RNA-Polymerase ist sehr aktiv und sehr selektiv für ihren eigenen Promotor. Im Expressionsvektor pET-20b(+) wird das zu exprimierende Gen unter die Kontrolle des T₇-Promotors gestellt. Die Expression erfolgt im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3), der das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lac*-Promotors trägt. Die Induktion der Expression der T7-RNA-Polymerase und somit auch des rekombinanten Gens erfolgt durch Zugabe von IPTG (Studier & Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990).

2.5.4 Kultivierung im Schüttelkolben

Für die Expression der unter Kontrolle des temperaturinduzierbaren P_{LR} -Promotors stehenden Gene wurden 50 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) 1:100 mit einer Übernachtskultur des das entsprechende Expressionsplasmid enthaltenden *E. coli*-Stammes inokuliert und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD_{578} von ca. 1,0 erfolgte die

Induktion durch Überführen der Kultur in ein auf 42°C erwärmtes Schüttel-Wasserbad. Die Expression wurde über einen Zeitraum von 4 h durchgeführt.

Für die Expression der unter Kontrolle des T₇-Promotors stehenden Proteine wurden 50 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) 1:100 mit einer Übernachtskultur des das entsprechende Expressionsplasmid enthaltenden *E. coli* BL21(DE3)- Stammes inokuliert und bei 37°C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD₅₇₈ von ca. 0,8 erfolgte die Induktion durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die Expression wurde über einen Zeitraum von 4 h durchgeführt.

2.6 Molekulargenetische Techniken

2.6.1 DNA-Präparation aus *E. coli*

2.6.1.1 Schnellisolierung von Plasmid-DNA (Birnboim & Doly, 1979)

1,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden in einem Eppendorfgefäß durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415C) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl eiskalter GET-Lösung (50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH 8) resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur protoplastiert und anschließend nach Zugabe von 200 µl frischer NaOH/SDS Lösung (0,2 N NaOH, 1% SDS) durch vorsichtiges Schütteln lysiert. Zur Fällung der Proteine wurde das Lysat vorsichtig mit 150 µl 3 M K⁺/5 M Acetat-Lösung gemischt, 5 min auf Eis inkubiert und 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml Phenol/Chloroform (1:1) gemischt und 2 min zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurde die Plasmid-DNA mit 1 ml 100% Ethanol 5 min bei Raumtemperatur gefällt und sedimentiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE10.01 mit 20 mg/ml RNase A resuspendiert.

2.6.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA über Anionenaustausch-Säulen

Zum Erhalt sehr sauberer Plasmid-DNA für DNA-Sequenzierung, Klonierung und PCR wurde das PrepSpin Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) oder für größere Mengen an DNA das Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) jeweils nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.6.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die genaue Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch photometrische Messung bei 260 nm. Bei einer Schichtdicke von 10 mm ergibt sich die DNA-Konzentration für doppelsträngige bzw. einzelsträngige DNA nach folgenden Formeln:

$$c_{\text{dsDNA}} = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c_{\text{ssDNA}} = \text{OD}_{260} \times 33 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

2.6.3 Ethanol-Präzipitation von Plasmid-DNA

Zur DNA-haltigen Lösung wurde 1/10 des Volumens 3 M Na-Acetat (pH 5,3) und 2,5 Volumen Ethanol (-20°C) gegeben. Die Präzipitation der DNA erfolgte 15 min bei -70°C. Zur Sedimentation der DNA wurde zentrifugiert (14000 Upm, 15 min, 4°C). Nach Waschen des erhaltenen DNA-Pellets mit 70%igem Ethanol (-20°C) und erneutem Abzentrifugieren der DNA wurde diese in der Speed-vac (Eppendorf) getrocknet und in H₂O_{bidest.} gelöst. Die DNA-Lösung konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

2.6.4 Enzymatische Behandlung von DNA

2.6.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für analytische und präparative Restriktionsanalysen wurden 0,5-1 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 15 µl mit 1-2 U des jeweiligen Restriktionsenzym in dem den Angaben des Herstellers entsprechenden Reaktionspuffer geschnitten. Die Inkubation erfolgte 1-2 h bei enzylspezifischer Temperatur.

Sollte die DNA einer Klenow-Behandlung unterzogen werden, wurde die DNA aus diesem Ansatz durch Zugabe von 1 Vol Isopropanol und 1/5 Vol 3 M NaAc pH 6,2 10 min bei Raumtemperatur gefällt und in der Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde je einmal mit 70% und 100% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 6 µl H₂O resuspendiert.

2.6.4.2 Behandlung mit Klenow-Enzym

Beim Klenow-Enzym handelt es sich um das große Fragment der DNA-Polymerase I, das 5'-überstehende Enden auffüllen bzw. 3'-überhängende Enden abbauen kann. 100 ng DNA wurden in 6 µl H₂O, 2 µl 4 mM dNTP, 1 µl 10x Puffer M (Boehringer Mannheim) resuspendiert und nach Zugabe von 1 U Klenow-Enzym 30 min bei 37°C inkubiert. Sollte die DNA einem zweiten Restriktionsverdau unterzogen werden, wurde sie aus diesem Ansatz mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, aus der wässrigen Phase mit ½ Vol 3 M NaAc pH 6,2 und 5 Vol 100% Ethanol für 20 min bei -20°C gefällt und pelletiert (20 min, 13000 Upm). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 5-10 µl H₂O resuspendiert.

2.6.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase

Äquimolare Mengen von DNA-Fragmenten (max. je 100 ng) wurden in 12.5 µl H₂O resuspendiert. Nach Zugabe von 1.5 µl 10x Ligase Puffer (Boehringer Mannheim) und 1 U T4 DNA-Ligase wurden die Proben für mindestens 1 h bei RT oder 3-15 h bei 12-16°C inkubiert.

2.6.5 Transfer von DNA in *E. coli*

2.6.5.1 Transformation mit TSS (Chung *et al.*, 1989)

2.6.5.1.1 Kompetente *E. coli*- Zellen für die TSS-Transformation

50 ml LB wurden 1:100 aus einer Übernachtskultur von *E. coli* angeimpft und im Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 bis 0.5 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min bei 4°C

abzentrifugiert (3000 Upm; Hettich Universal 30F), in 2 ml TSS resuspendiert und mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Diese Zellen wurden sofort zur Transformation verwendet oder portionsweise in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.6.5.1.2 Transformation von Plasmid-DNA

100 ng Plasmid-DNA wurden mit 200 µl kompetenten Zellen gemischt, 20 min auf Eis inkubiert, nach einem Hitzschock von 30 s bei 42°C in 2 ml LB überführt und 1 h bei 37°C geschüttelt (Multitron AJ111, Infors). 100 µl dieses Ansatzes wurden auf selektiven Agarplatten ausplattiert und 12 bis 15 h bei 37°C inkubiert. Die Transformationsrate lag bei etwa 10^9 Transformanden / µg DNA.

2.6.5.2 Elektroporation (Dower *et al.*, 1988)

2.6.5.2.1 Kompetente *E. coli* Zellen für die Elektroporation

Für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation wurden 250 ml LB 1:100 mit einer 15 h-Kultur inokuliert und im Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Danach wurden die Zellen 20 min auf Eis gekühlt und 15 min bei 5000 Upm abzentrifugiert (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments). Das Zellpellet wurde zweimal mit 0,5 l kaltem H₂O und einmal mit 20 ml 10 % Glycerin gewaschen und zum Schluß in 2,5 ml 10 % Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 40 µl -Portionen aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die Zellkonzentration sollte bei $1-3 \times 10^{10}$ Zellen/ml liegen.

2.6.5.2.2 Transformation

40 µl kompetente Zellen wurden mit 100 ng Plasmid-DNA gemischt und sofort in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette im Gene-Pulser (Bio-Rad Laboratories) elektroporiert (2,5 kV, 200 Ohm, ca. 4 ms) . Nach sofortiger Zugabe von 1 ml LB wurde die Suspension in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bei 37°C für 1 h im Thermoblock inkubiert. Hiervon wurden 50 bis 100 µl auf Selektivagarplatten plattiert und für 15 h bei 37°C

inkubiert. Sollten Ligationsansätze transformiert werden, mußte die DNA vor der Transformation zur Entfernung der Salze auf einem Filter (0,025 µm-Poren, Millipore) 30 min bei RT gegen H₂O dialysiert werden. DNA aus einer Plasmidminipräparation konnte direkt zur Transformation eingesetzt werden.

2.6.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986)

In einem Reaktionsvolumen von 100 µl wurden ca 1 µg Matrizen-DNA (Template), je 100 pmol PCR-Primer, 10 µl 10 x Reaktionspuffer, 8 µl MgCl₂ (25 mM), 2 U *Taq*-Polymerase (MBI Fermentas) und je 0,25 mM Nukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) gemischt, ggf. mit Mineralöl überschichtet und im Thermocycler (Perkin Elmer, Eppendorf, Stratagene) inkubiert. Der Ansatz wurde 7 min bei 95°C denaturiert. Dann erfolgten 25 Zyklen mit den folgenden Temperaturschritten: 1 min 95°C Denaturierung, 1 min 53°C Annealing der Primer, 1-2 min 72°C Polymerisation. Anschließend erfolgte ein weiterer Polymerisationsschritt mit 7 min bei 72°C. Der PCR-Ansatz wurde bei 4°C oder -20°C gelagert.

2.6.7 Gensynthese

Zur Gensynthese mittels PCR wird das Gen in ca 400 bp große Kassetten aus je vier synthetischen Oligonukleotiden von etwa 120 bp Länge eingeteilt, von denen zwei homolog zum Forward- und zwei homolog zum Reverse-Strang sind. Diese Primer (1 bis 4) überlappen sich an ihren Enden um jeweils 20 Basen. Bei der „one-step“-Synthese-PCR werden alle vier Matrizen-Primer zusammengegeben, so daß sie sich nach Hybridisierung gegenseitig als Primer dienen können. Durch Zusatz kurzer randständiger Primer wird die komplette Kasette weiter amplifiziert (Abb.2.1).

Bei der „two-step“-Synthese-PCR werden zuerst doppelsträngige DNA-Fragmente aus je 2 überlappenden Oligonukleotiden gebildet. In der PCR-Reaktion dienen sich die beiden langen Oligos 1 und 2 bzw. 3 und 4 gegenseitig als Primer. Im zweiten Schritt der asymmetrischen Synthese-PCR dienen sich die Produkte der ersten beiden PCRs, im folgenden Oligodimere genannt, gegenseitig als Primer. Mittels kurzer randständiger Primer wird die Kasette weiter amplifiziert (Abb. 2.2).

Alle für die Gensynthese eingesetzten Primer wurden von Interactiva oder ARK in der jeweils besten Reinigungsqualität bezogen.

2.6.7.1 „one-step“-Synthese-PCR

In einem 50 µl Ansatz wurden 6 µl dNTP (10 mM), 5 µl 10x PCR-Reaktionspuffer, 40 pmol jedes der 4 langen Oligonukleotide, je 100 pmol der beiden kurzen randständigen Primer, 2 U Deep Vent-DNA-Polymerase (Biolabs) und die entsprechende Menge H₂O gemischt, mit 50 µl Mineralöl überschichtet und im Thermocycler (DNA Thermal Cycler P19525, Perkin Elmer) inkubiert. Zur Denaturierung wurde der Ansatz 7 min bei 96°C inkubiert, danach folgten 30 Zyklen mit je drei Temperaturschritten: 1,5 min Denaturierung bei 96°C, 1,5 min Annealing der Oligonukleotide bei 50°C, 40 sec Polymerisierungsreaktion bei 72°C. Zum Schluß erfolgte ein weitere Polymerisierungsschritt für 7 min bei 72°C. Das PCR-Produkt wurde über ein 2%iges Agarose Gel (Agarose Serva, Serva) aufgetrennt, mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gereinigt und so zur blunt-end-Klonierung in pUC19 oder für weitere PCR-Schritte eingesetzt.

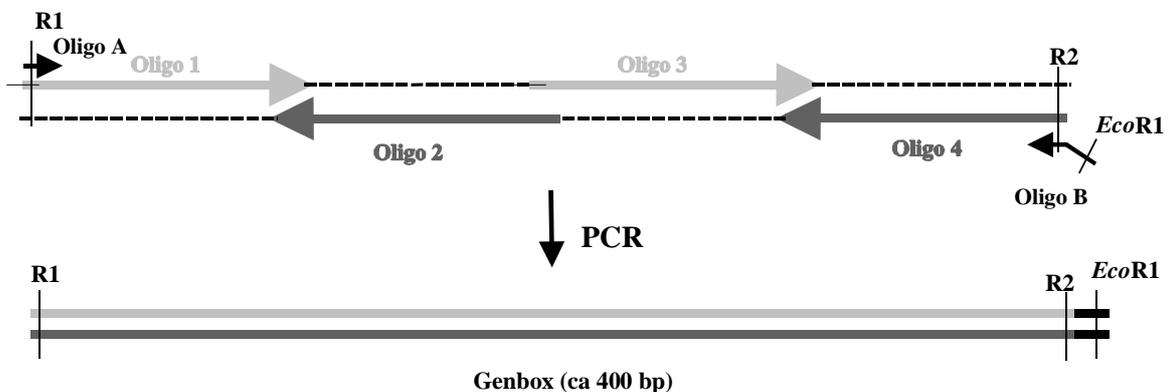


Abbildung 2.1: Prinzip der „one-step“-Synthese-PCR. Die flankierenden Oligonukleotide der Genbox sind mit R1 und R2 gekennzeichnet.

2.6.7.2 „two-step“-Synthese-PCR

Im ersten Schritt der „two-step“-Synthese-PCR (PCR IA und PCR IB) wurden in zwei 50 µl Ansätzen je 6 µl dNTP (10 mM), 5 µl 10x PCR- Reaktionspuffer, 40 pmol der beiden langen Oligonukleotide 1 und 2 bzw. 3 und 4, 2 U Deep Vent-DNA-Polymerase (Biolabs) und die entsprechende Menge H₂O gemischt, mit 50 µl Mineralöl überschichtet und im Thermocycler (DNA Thermal Cycler P19525, Perkin Elmer) inkubiert. Zur Denaturierung wurde der Ansatz 7 min bei 96°C inkubiert, danach folgten 30 Zyklen mit je drei Temperaturschritten: 1,5 min Denaturierung bei 96°C, 1,5 min Annealing der Oligonukleotide bei 50°C, 20 sec Polymerisierungsreaktion bei 72°C. Zum Schluß erfolgte ein weitere Polymerisierungsschritt für 7 min bei 72°C. Die so entstandenen Oligodimere dienen sich im zweiten Schritt der Gen-Synthese (PCR II) gegenseitig als Primer.

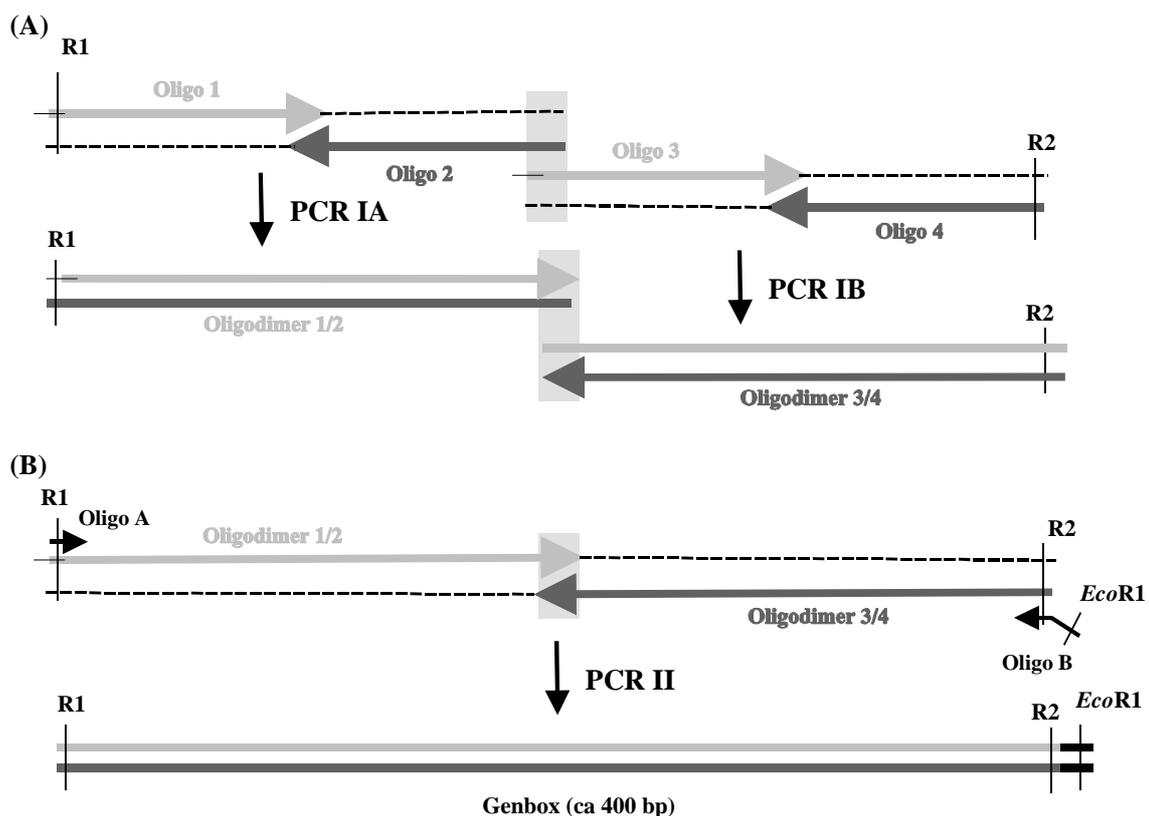


Abbildung 2.2: Prinzip der „two-step“-Synthese-PCR. Die die Genbox flankierenden Restriktionsschnittstellen sind mit R1 und R2 bezeichnet.

Hierzu wurden in einem 50 µl Ansatz 6 µl dNTP (10 mM), 5 µl 10x PCR-Reaktionspuffer, 100 pmol der beiden kleinen randständigen Amplifikationsprimer, je 10 µl aus den PCR-Ansätzen des ersten Schrittes, 2 U Deep-Vent-DNA-Polymerase (Biolabs) und die entsprechende Menge H₂O gemischt, mit 50 µl Mineralöl überschichtet und im Thermocycler (DNA Thermal Cycler P19525, Perkin Elmer) inkubiert. Zur Denaturierung wurde der Ansatz 7 min bei 96°C inkubiert, danach folgten 30 Zyklen mit je drei Temperaturschritten: 1,5 min Denaturierung bei 96°C, 1,5 min Annealing der Oligonukleotide bei 50°C, 40 sec Polymerisierungsreaktion bei 72°C. Zum Schluß erfolgte ein weiterer Polymerisierungsschritt für 7 min bei 72°C. Das PCR-Produkt wurde in einem 2 %igen Agarose Gel aufgetrennt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel isoliert. Das gereinigte Fragment wurde zur blunt-end-Klonierung in pUC19 oder für weitere PCR-Schritte eingesetzt.

2.6.8 Rekombinante PCR: „Splicing by overlap extension“ (Ho *et al.*, 1989; Horton *et al.*, 1989)

Mit der rekombinanten PCR können zwei DNA-Fragmente an einer genau definierten Stelle verknüpft werden. Da für die Methode keine Restriktionsschnittstelle an der Verknüpfungsstelle erforderlich ist, kann sie für jede beliebige Verknüpfung eingesetzt werden.

Erreicht wird dies durch eine Folge von drei PCRs (Abb. 2.3). In der ersten PCR wird das erste DNA-Fragment mit Hilfe eines 5'-überhängenden Primers um den Anfang des zweiten Fragmentes verlängert. In einer zweiten PCR wird das zweite DNA-Fragment amplifiziert. In der dritten PCR können sich die Produkte dieser beiden PCR Reaktionen gegenseitig als Primer dienen. Die Ausbeute wird dabei durch den Zusatz der randständigen Primer erhöht. Die praktische Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.6.7 beschrieben.

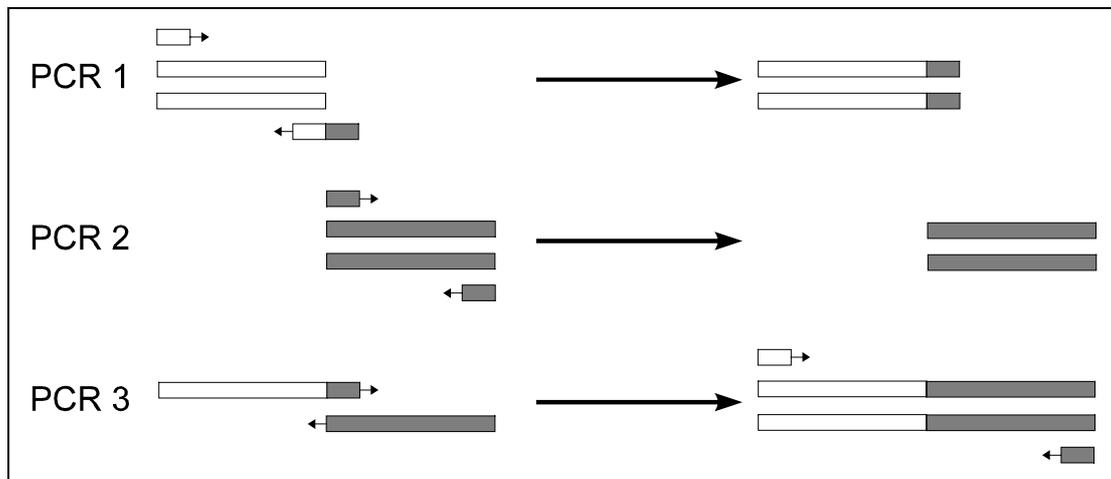


Abbildung 2.3: Prinzip des „Splicing by overlap extension“.

2.6.9 Positionsgerichtete Mutagenese (Ho *et al.*, 1989; Kunkel, 1985)

Mit der positionsspezifischen Mutagenese können Punktmutationen erzeugt und einzelne oder mehrere Aminosäuren deletiert oder inseriert werden. Für die positionsgerichtete Mutagenese wurde das Protokoll des QuikChange™ Kit (Stratagene) modifiziert. Bei dieser Methode wird von einem doppelsträngigen Plasmid mit dem zu mutierenden Gen und zwei komplementären Oligonukleotiden mit der gewünschten Mutation ausgegangen (Abb. 2.4). Die Oligos sind komplementär zu gegenüberliegenden Strängen des Vektors und dienen als Primer für die Mutagenese-PCR, in der das ganze Plasmid amplifiziert wird. Durch den Einbau der Primer und wird ein mutiertes Plasmid mit zwei versetzten Einzelstrangbrüchen erzeugt. Anschließend werden die parentalen, methylierten DNA-Stränge mit *DpnI* verdaut. Nach Dialyse wird die DNA mit der eingebauten Mutation direkt in *E. coli* transformiert.

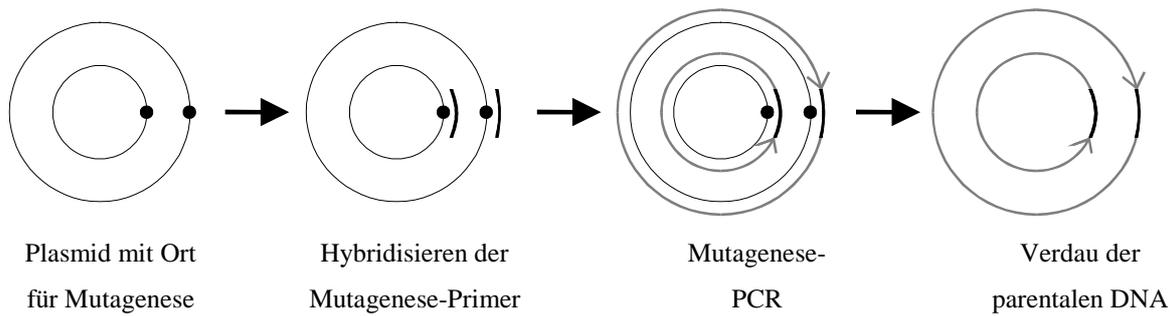


Abbildung 2.4: Prinzip der positionsgerichteten Mutagenese.

In einem Reaktionsvolumen von 100 μl wurden 1 μg Matrizen-DNA (Template), je 5 pmol PCR-Primer, 10 μl 10 x *Pfu*-Puffer (Stratagene), 10 μl DMSO, 2 U *Pfu*-Polymerase (Stratagene) und je 0,05 mM Nukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) gemischt und im Thermocycler (Eppendorf) inkubiert. Der Ansatz wurde 7 min bei 95°C denaturiert. Dann erfolgten 20 Zyklen mit den folgenden Temperaturschritten: 1 min 95°C Denaturierung, 1,5 min 58°C Annealing der Primer, 10 min 68°C Polymerisation. Ein weiterer Polymerisationsschritt mit 20 min bei 68°C wurde angeschlossen.

50 μl des PCR-Ansatzes wurden mit 1 μl *DpnI* für 1 h bei 37°C verdaut und 15 μl des Verdau auf einem Filter (0,025 μm , Millipore) für 1 h bei RT gegen H₂O dialysiert. Zum Schluß wurden kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen mit 10 μl des dialysierten Ansatzes transformiert.

2.6.10 DNA-Gelelektrophorese

2.6.10.1 Agarose-Gelelektrophorese

Doppelsträngige DNA-Moleküle wurden in 0,7 bis 2,0 % Agarosegelen in TAE-Puffer mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid elektrophoretisch nach Molekulargewicht aufgetrennt (Sharp *et al.*, 1973). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/5 Vol 5x Auftragspuffer versetzt. Die

Elektrophorese wurde in Flachbett-Agarosegelkammern (BIO-RAD) bei 120 V für 30 min durchgeführt. Als Standard dienten 10 µl eines 1 kb DNA ladders (50 nmol/µl).

2.6.10.2 Gelelution von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in 1 bis 2 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Gelstücke mit den zu isolierenden DNA-Fragmenten wurden ausgeschnitten, und die DNA nach Protokoll mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert.

2.6.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Methode des „Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing“ (Ansorge *et al.*, 1987; Ansorge *et al.*, 1986; Sanger *et al.*, 1977; Zimmermann *et al.*, 1988). Hierfür wurden der BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) und der ABI Prism™ Taq Dye Deoxy™ Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Sequenzierreaktionen wurden im Thermocycler (Perkin Elmer) nach folgendem Zyklus durchgeführt: Schmelzen: 30 sec. 95°C; Annealing: 30 sec. 55°C; Reaktion: 4 min 60°C (25 Zyklen). Die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzierprodukte erfolgte mit dem DNA Sequencing System 373A (PE Applied Biosystems) oder ABI Prisma 377 (PE Applied Biosystems) nach Anweisung des Herstellers.

2.7 Proteinchemische und analytische Methoden

2.7.1 SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-PAGE in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem (8 x 8 x 0,1 cm, Minigel Twin Typ G42, Biometra, Göttingen). Ein 12,5 %iges Trenngel wurde nach dessen Polymerisation mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet und der Probenauftragskamm eingeführt.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der Proteinmarker LMW (Low Molecular Weight) und HMW (High Molecular Weight) der Firma BIO-RAD.

	LMW	HMW
	[kDa]	[kDa]
Myosin		200,0
β-Galaktosidase		116,3
Phosphorylase B	97,4	97,4
BSA	66,2	66,2
Ovalbumin	45,0	45,0
Carboanhydrase	31,0	
Trypsininhibitor	21,5	
Lysozym	14,4	

Die Proteinproben wurden mit 1/2 Volumen SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95°C denaturiert und sofort auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese in SDS-PAGE-Laufpuffer erfolgte für 1-2 h bei 20-25 mA pro Gel, bis die Lauffront das Ende des Gels erreichte. Als Proteinmarker dienten Standardproteingemische LMW und HMW der Firma BIO-RAD (Tabelle 2.6).

2.7.1.1 Färbung von SDS-Gelen

Polyacrylamidgele wurden in Coomassie-Färbelösung für 15-45 min gefärbt und 0,5-1 h in Entfärber entfärbt. Das Gel wurde in 7 % Essigsäure aufbewahrt oder mit Hilfe des Gel-Dryers 583 (Bio-Rad) unter Vakuum getrocknet und so für Dokumentationszwecke aufbewahrt.

Zur Detektion von Proteinbanden mit lipolytischer Aktivität auf den Gelen wurde die Aktivitätsfärbung nach (Sztajer *et al.*, 1992) verwendet. Hierzu wurde zunächst zur Entfernung des SDS und Renaturierung der Lipase das Gel 30 min in 0,5 %iger Triton X-100 Lösung (0,5 % Triton X-100 in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5) inkubiert. Anschließend wurde das Gel in frisch angesetzter Färbelösung III bis zum Sichtbarwerden einer Bande gefärbt und zum Schluß für 30 min in Entfärbelösung entfärbt.

Färbelösungen für die Aktivitätsfärbung:

Lösung I: 20 mg 1-Naphtylacetat, 5 ml Aceton, 50 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5

Lösung II: 50 mg Fast Red TR in 50 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5

Lösung III: Lösungen I und II im Verhältnis 1:1

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des BCA-Protein Assay Reagent-Kits von Pierce nach den Angaben des Herstellers. Die dabei angewandte Methode beruht auf der Reaktion von Proteinen mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischem Medium unter Bildung von Cu^+ -Ionen, welche durch Reaktion mit Bicinchoninsäure (BCA) unter Bildung eines bei 562 nm absorbierenden Komplexes detektiert werden können (Smith *et al.*, 1985).

2.7.3 Lipase-Aktivitätsbestimmung

2.7.3.1 Photometrischer Assay mit pNPP als Substrat (Winkler & Stuckmann, 1979)

Die Methode zur Bestimmung der Lipaseaktivität basiert auf der enzymkatalysierten Spaltung von p-Nitrophenylpalmitat (pNPP). Das bei der Spaltung entstandene p-Nitrophenol kann bei 410 nm photometrisch bestimmt werden. Dabei wird 1 Unit als die Menge an Lipase definiert, die 1 μmol pNPP pro Minute unter den Assaybedingungen hydrolysiert.

Zur Durchführung des Assays wurden 10 μl Enzymlösung mit 990 μl Lösung C vermischt und die Zunahme der Absorption bei 410 nm bestimmt (Ultrospec, Pharmacia). Die Messung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 60°C.

Assaylösungen:

Lösung A: 90 mg pNPP wurden in 30 ml Isopropanol durch 5 minütige Ultraschallbehandlung gelöst.

Lösung B: 0,8 g Taurocholat und 100 mg Gummi arabicum wurden in 100 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 gelöst.

Lösung C: Zu 9 Teilen Lösung B wurde ein Teil Lösung A tropfenweise unter Rühren zugegeben.

Die Aktivität (A) in U/ml errechnet sich aus der gemessenen Absorptionsänderung $\Delta E_{410\text{nm}}$ wie folgt:

$$A [\text{U/ml}] = \Delta E_{410\text{nm}} / (\text{Zeit} [\text{min}] \times \epsilon [\text{l/mol cm}] \times d [\text{cm}]) \times \text{Vol}_{\text{Ansatz}} [\text{ml}] / \text{Vol}_{\text{Enzymlösung}} [\text{ml}],$$

wobei $\epsilon = 1500 \text{ l/mol cm}$ (molarer Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol)

und $d = 1 \text{ cm}$ (Schichtdicke)

2.7.3.2 pH-Stat Assay (Peled & Krenz, 1981)

Grundlage für die Lipaseaktivitätsbestimmung im pH-Stat Assay ist die Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Triglycerides. Die dabei freiwerdenden Fettsäuren werden automatisch mit Natronlauge titriert, um den pH-Wert konstant zu halten. Aus dem Verbrauch an Natronlauge, der auf einem X/Y-Schreiber in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen wird, kann die Enzymaktivität berechnet werden. Als eine Unit wurde die Enzymmenge definiert, die 1 μmol Fettsäure pro Minute freisetzt. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$A = f_x \cdot f_y \cdot c_{\text{NaOH}} \cdot \frac{1}{V_E} \cdot \frac{\Delta x}{\Delta y}$$

A [U ml⁻¹]: Aktivität

c_{NaOH} [mol l⁻¹] Konzentration der NaOH

f_x [$\mu\text{l mm}^{-1}$] Schreiberparameter bzgl. NaOH-Verbrauch

f_y [mm min^{-1}] Schreiberparameter bzgl. Reaktionszeit

V_E [μl] Volumen der eingesetzten Enzymlösung

$\Delta x/\Delta y$ [mm mm^{-1}] Steigung

Zur Aktivitätsbestimmung der Lipase wurden 20 mM Lösungen von Triglyceriden in H₂O mit 20 mg/ml Gummi arabicum mit Hilfe eines Homogenisators (Ultra Turrax) für 10 min bei mittlerer Geschwindigkeit emulgiert. 20 ml Substratlösung wurden temperiert und der gewünschte pH-Wert eingestellt. Die Messung der Aktivität erfolgte durch Zugabe von 20 bis 100 μl Enzymlösung. Standardbedingungen für die Aktivitätsmessung der Lipase waren 60°C und pH 8 mit Triolein als Substrat.

Da in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Temperatur Autohydrolyse erfolgte, wurde vor der Enzymzugabe die Autohydrolyseaktivität bestimmt. Die eigentliche Enzymaktivität ergab sich dann aus der Subtraktion der Autohydrolyseaktivität von der Gesamthydrolyseaktivität.

2.7.4 Charakterisierung der Lipase

2.7.4.1 Temperatureinfluß auf die Lipaseaktivität und Temperaturstabilität

Das Temperaturoptimum der Lipaseaktivität wurde photometrisch mit pNPP als Substrat bei den Temperaturen 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 und 90°C bestimmt (s. Kapitel 2.7.3.1).

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität wurden je 500 µl des Refoldingansatzes in H₂O bei RT, 37, 50, 60, 70, 80 und 90°C inkubiert. Die Restaktivität wurde jeweils photometrisch mit pNPP als Substrat nach 0,5, 1, 2, 4, 7 und 20 h bestimmt(s. Kapitel 2.7.3.1).

2.7.4.2 pH-Einfluß auf die Lipaseaktivität und pH-Stabilität

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der Lipase wurde mit dem pH-Stat Assay bei verschiedenen pH-Werten (pH-Bereich 4-10) bei 60°C mit Tributyrin als Substrat gemessen (s. Kapitel 2.7.3.2).

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Stabilität der Lipase wurde durch Inkubation von 50 µl Aliquots des Refoldingansatzes in 450 µl 0,1 M Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten (Glycin/HCl-Puffer pH 3, Acetat-Puffer pH 4,0-6,0, Tris/HCl-Puffer pH 6,0-9,0, Glycin/NaOH-Puffer pH 9,0-12,0) für 16 h bei 30°C untersucht. Die Restaktivität wurde photometrisch mit pNPP als Substrat bestimmt (s. Kapitel 2.7.3.1).

2.7.4.3 Substratspezifität und Kettenlängenspezifität der Lipase

Die Spezifität der Lipase gegenüber Triglyceriden mit unterschiedlicher Fettsäurekettenlängen wurde mit dem pH-Stat Assay bei pH 8,0 und 60°C untersucht (s. Kapitel 2.7.3.2). Es wurden Triacylglyceride mit folgenden unterschiedlichen Fettsäurekettenlängen als Substrate untersucht: Triacetin (C2) (Sigma), Tributyrin (C4) (Fluka), Tricaproin (C6) (Sigma), Tricaprylin (C8) (Sigma), Tricaprin (C10) (Fluka),

Trilaurin (C12) (Fluka), Trimyristin (C14) (Fluka), Tripalmitin (C16) (Fluka), Triolein (C18:1) (Fluka).

Zur Bestimmung der Kettenlängenspezifität wurde außerdem ein Gemisch aus verschiedenen Triglyceriden mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen an allen 3 Positionen („Random oil“, Unilever) verwendet. Die Zusammensetzung der Triglyceride ist in Tabelle 2.7 dargestellt. Dabei sind die Fettsäuren gleichmäßig auf die verschiedenen Positionen (sn1,3; sn2) im Glycerin verteilt.

Tabelle 2.7: Fettsäurezusammensetzung des „Random oils“

Fettsäure	Gewichtsanteil in %	Molarer Anteil in %
C8:0	8,3	13,2
C10:0	6,6	8,9
C12:0	13,2	15,6
C14:0	5,3	5,5
C16:0	13,8	12,9
C18:0	12,7	10,8
C18:1	19,3	16,4
C18:2	17,1	14,6
C18:3	2,2	1,9
C20:0	0,5	0,4

1 g „Random oil“ und 0,4 g Gummi arabicum wurden in 20 ml H₂O mit Hilfe eines Homogenisators (Ultra Turrax) für 10 min bei mittlerer Geschwindigkeit emulgiert. Der Umsatz des „Random oils“ erfolgte im pH-Stat mit 500 U Lipase bei 40°C und pH 7 unter Einsatz von 0,1 M NaOH (s. Kapitel 2.6.3.2). Bei 0, 5, 10, 15 und 20 % Umsatz (dies entspricht einem NaOH-Verbrauch von 0, 2, 4, 6 und 8 ml) wurden 2 ml Probe entnommen. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Probe mit 0,1 ml 85 % Phosphorsäure versetzt und bei -20°C aufbewahrt. Die Fettsäuren wurden 3 mal mit jeweils 2 ml Hexan/Diethylether (1:1) extrahiert und anschließend unter N₂ auf 1 ml Endvolumen eingengt. Zur Silylierung der Fettsäuren mit MSHFBA wurden 100 µl Probe entnommen, mit N₂ getrocknet, der Rückstand mit 50 µl MSHFBA versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Dichlormethan wurde 1 µl Probe im Gaschromatographen (Fisons) auf einer unpolaren Kapillar-Säule (Optima 5, 25 m x 0,25 mm ID, Filmdicke: 0,25 µm, Macherey & Nagel) unter

den in Tabelle 2.8 aufgeführten Bedingungen aufgetrennt und mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) analysiert. Der Anteil an den einzelnen Fettsäuren wurde über das Flächenverhältnis unter Einbeziehung von Responsefaktoren berechnet. Die Bestimmung der Responsefaktoren erfolgte über eine Standardmischung der verschiedenen Fettsäuren.

Tabelle 2.8: GC-Analyse von Fettsäuren:

Temperaturprogramm:	50°C 5°C/min 300°C 300°C (2 min)
Injektortemperatur:	370°C
Detektortemperatur:	370°C
Trägergas:	H ₂ (100 kPa)

2.7.5 Proteinblotting (Matsudaira, 1987)

Für die automatische N-terminale Proteinsequenzierung wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Hierzu wurde je 1 auf die Größe des SDS-Gels zugeschnittenes Filterpapier (Whatman) 5 - 10 min in Anoden-Puffer 1, Anoden-Puffer 2 bzw. Kathoden-Puffer inkubiert. Die zugeschnittene PVDF-Membran wurde einige Sekunden in 100 % Methanol geschwenkt und danach 2 - 3 min in Anoden-Puffer 2 inkubiert. Die so vorbereiteten Materialien wurden in der Blotting-Apparatur schichtweise (als Sandwich) von unten (Anode) nach oben (Kathode) in der folgenden Reihenfolge übereinander gelegt: Filter Anodenpuffer 1, Filter Anodenpuffer 2, PVDF-Membran, SDS-Gel, Filter Kathodenpuffer. Das Blotten erfolgte für 10-20 min bei 15 V. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Coomassie R250 gefärbt (0,1% Coomassie R250, 50% Methanol), in 10% Essigsäure/50% Methanol entfärbt, anschließend mit H₂O gewaschen und an der Luft getrocknet. Die gewünschte Proteinbande wurde ausgeschnitten und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

2.7.6 N-terminale Proteinsequenzierung

Die aminoternale Sequenzbestimmung von Proteinen wurde nach der Methode von Edman mit Hilfe eines Gasphasensequenzierers (Protein Sequencer 491, PE Applied Biosystems)

entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt (Edman, 1950). Als Probe diente auf PVDF-Membran geblottetes Protein.

2.8 Fermentation und Downstreamprocessing

2.8.1 Fermentation

2.8.1.1 Batch-Fermentation im 5-l-Maßstab

In einem 5 l-Fermenter (Labfors) wurden *E. coli* Stämme, die ein entsprechendes Expressionsplasmid für Lipase oder Helferprotein trugen, für 6 bis 10 h unter folgenden Bedingungen fermentiert:

Rührertyp:	Scheibenrührer
Rührgeschwindigkeit:	500 Upm
Belüftung:	7 NI/min
Medium:	LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin; 0,1 % Antischaum)
pH-Wert:	7,0 (online-Regulation)
Temperatur:	37°C bzw. 42°C
Inokulum:	200 ml 16 h-Schüttelkultur in LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin)
Induktion :	Temperaturshift auf 42°C (bei OD ₅₇₈ =1,0) oder durch Zugabe von 1 mM IPTG (bei OD ₅₇₈ =0,8)
Fermentationsdauer:	4 h nach Induktion

Online wurden der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) sowie die O₂ und CO₂-Menge im Abgas gemessen. Offline wurden die optische Dichte (OD₅₇₈), die Biofeuchtmasse und die Expression der Zielproteine im Fermentationsverlauf bestimmt.

Nach Beendigung der Fermentation wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert (15 min, 10000 Upm, Sorvall-Zentrifuge) und anschließend bei -20°C gelagert.

2.8.1.2 Batch-Fermentation im 40 l-Maßstab

In einem 42 l-Fermenter (LP 351, Bioengineering) wurden *E. coli* Stämme, die ein entsprechendes Expressionsplasmid für Lipase oder Helferprotein trugen, für 6 bis 10 h unter folgenden Bedingungen fermentiert:

Rührertyp:	Scheibenrührer
Rührgeschwindigkeit:	400 Upm
Belüftung:	zunächst 10 NI/min, nach ca. 4 h 25 NI/min
Medium:	LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin; 0,1 % Antischaum)
pH-Wert:	7,0 (online-Regulation)
Temperatur:	37°C bzw. 42°C
Inokulum:	1000 ml 16 h-Schüttelkultur in LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin)
Induktion :	Temperaturshift auf 42°C (bei OD ₅₇₈ =1,0) oder durch Zugabe von 1mM IPTG (bei OD ₅₇₈ =0,8)
Fermentationsdauer:	4 h nach Induktion

Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) in der Lösung wurde online gemessen. Offline wurden die optische Dichte (OD₅₇₈), die Biofeuchtmasse und die Expression der Zielproteine im Fermentationsverlauf bestimmt.

Nach Beendigung der Fermentation wurden die Zellen geerntet. Durch Crossflow-Filtration mit einer 0,2 µm Mikrofiltrationsmembran (Millipore) wurde das Volumen der Zellkultur auf etw 2 l eingengt. Im Anschluß wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min, 10 000 Upm, Sorvall-Zentrifuge) und das Zellpellet bei -20°C gelagert.

2.8.2 Zellaufschluß

2.8.2.1 Ultraschallaufschluß

Escherichia coli Zellen wurden durch Behandlung mit Ultraschall (Branson Sonifier W-250) aufgeschlossen. Dafür wurden die Zellen pro g Zellnaßgewicht in 10 ml Puffer (50 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) suspendiert und mit einer Mikrospritze bis zu 10 min (Leistungsstärke 4,

Beschallungsintervall 30%) beschallt. Mit Hilfe eines Eisbads wurden die Zellen gekühlt. Nach Erreichen der vollständigen Lyse, welche mikroskopisch kontrolliert wurde, erfolgte durch Zentrifugation (20 min, 15000 Upm, 4°C) die Trennung der löslichen Proteine von den Zellbruchstücken. Eventuell vorhandene Inclusion-Bodies fanden sich im Präzipitat wieder.

2.8.2.2 Harnstoffaufschluß

Zum Aufschluß von Zellen und zur gleichzeitigen Solubilisierung von Inclusion-Bodies wurden 2 g Zellaßgewicht in 20 ml Puffer B (8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄; 10 mM Tris/HCl; pH 8,0) resuspendiert und 2 h bei RT geschüttelt oder gerührt. Durch anschließende 10-minütige Zentrifugation (5000 Upm, Hettich) konnten die gelösten Proteine von den Zelltrümmern befreit werden.

2.8.3 Reinigung und Aufschluß von Inclusion-Bodies

Bei der Überexpression von Proteinen in *E. coli* kommt es häufig zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten, die sich aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen oder intermolekularen Disulfidbrücken ausbilden (Marston & Hartley, 1990). Diese Einschlußkörper, sogenannte Inclusion bodies (IB), können durch Zentrifugation des Zell-Lysats isoliert und durch verschiedenen Waschschriffe aufgereinigt werden.

Dazu wurde das aus dem Aufschluß von 2 g Zellaßgewicht erhaltene Präzipitat in 15 ml Puffer A (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert und zweimal erneut mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert. Der Aufschluß der als Pellet vorliegenden gereinigten Inclusion bodies erfolgte mit 8 M Harnstoff. Dazu wurden die präzipitierten Inclusion-Bodies in 25 ml Puffer B (8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄; 10 mM Tris/HCl; pH 8,0) resuspendiert und der Ansatz 2 h bei RT gerührt. Die auf diese Weise solubilisierten Inclusion-Bodies konnten durch Zentrifugation (s.o.) von den restlichen Zelltrümmern abgetrennt werden.

2.8.4 Rekonstitution der Lipase: *In-vitro*-Refolding unter Einsatz des Helferproteins (Quyên *et al.*, 1999)

Beim *In-vitro*-Refolding der Lipase unter Einsatz des Helferproteins können verschiedene Protein-Aufarbeitungen verwendet werden. Die Lipase kann direkt durch Harnstoffaufschluß der Lipase-exprimierenden Zellen oder durch Solubilisierung der zuvor gereinigten Inclusion-Bodies mit Harnstoff gewonnen werden (vergl. Kapitel 2.8.2 und 2.8.3). Das Helferprotein kann entweder im denaturierten Zustand direkt aus dem Überstand eines Harnstoffaufschlusses der Zellen eingesetzt werden, oder im nativen Zustand aus dem Überstand nach Aufschluß der Zellen mit Ultraschall.

Das *In-vitro*-Refolding der Lipase erfolgt unter Einsatz äquimolarer Mengen Lipase und Helferprotein bei einer Verdünnung von 1:100 in H₂O (jeweils ca. 75 µg/ml Endkonzentration) für 24 h bei 4°C.

2.8.5 Konzentrierung der Lipase

2.8.5.1 Cross-flow-Filtration und Gefriertrocknung

Das Volumen der Lipaselösung aus einem 5 l Refolding Ansatz wurde durch Cross-flow-Filtration mit einer Ultrafiltrationsmembran (Filtron) mit einem MWC von 10 kDa auf bis zu 200 ml eingengt und im Gefriertrockner (Finn Aqua) lyophilisiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56

3.1.1 Synthese der Gene für die Lipase und das Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56

Die Gene für die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 (*lip*) und deren Helferprotein (*act*) sollten synthetisch hergestellt werden. Hierfür gab es verschiedene Gründe. Die Synthese eines Gens bietet gegenüber der herkömmlichen Klonierung aus dem Originalstamm mehrere Vorteile. Die Gene aus *Pseudomonas* sind sehr GC-reich und verwenden selten oder gar nicht natürlich in *E. coli* vorkommende Codons (Sharp *et al.*, 1988; West & Iglewski, 1988). Dies führt oft zu geringer Produktausbeute und Wachstumsinhibierung bei Überexpression der entsprechenden Proteine (Mattes, 1993; Zahn, 1996). Bei der Gensynthese kann die Codon-Usage von *E. coli* verwendet und der GC-Gehalt der Gene gesenkt werden. Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit der Einführung singulärer Restriktionsschnittstellen. Synthetische Gene können modularartig zusammengesetzt werden, eine Veränderung oder der Austausch einzelner Regionen ist leicht realisierbar.

3.1.1.1 Gen-Design

Die Nukleotidsequenz der Gene der Lipase (*lip*) und ihres Helferproteins (*act*) aus *Pseudomonas species* KWI 56 wurde von den bekannten Aminosäuresequenzen abgeleitet (Iizumi *et al.*, 1991). Die synthetischen Gene *lip* und *act* wurden so geplant (Abb. 3.1.1), daß eine Expression in *E. coli* sowohl unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in pUC19 als auch unter der Kontrolle des temperaturinduzierbaren P_L-Promotors von pCYTEXP1 erfolgen kann. Der Abstand zwischen *lip* und *act* von 3 Basenpaaren wurde entsprechend der Genstruktur im Genom von *Pseudomonas species* KWI 56 beibehalten (Iizumi *et al.*, 1991), zur Erhöhung der Expression von *act* wurde jedoch im optimalen Abstand zum Startcodon von *act* vor dem Stopcodon von *lip* eine Shine-Dalgarno-Consensussequenz (SD) eingeführt

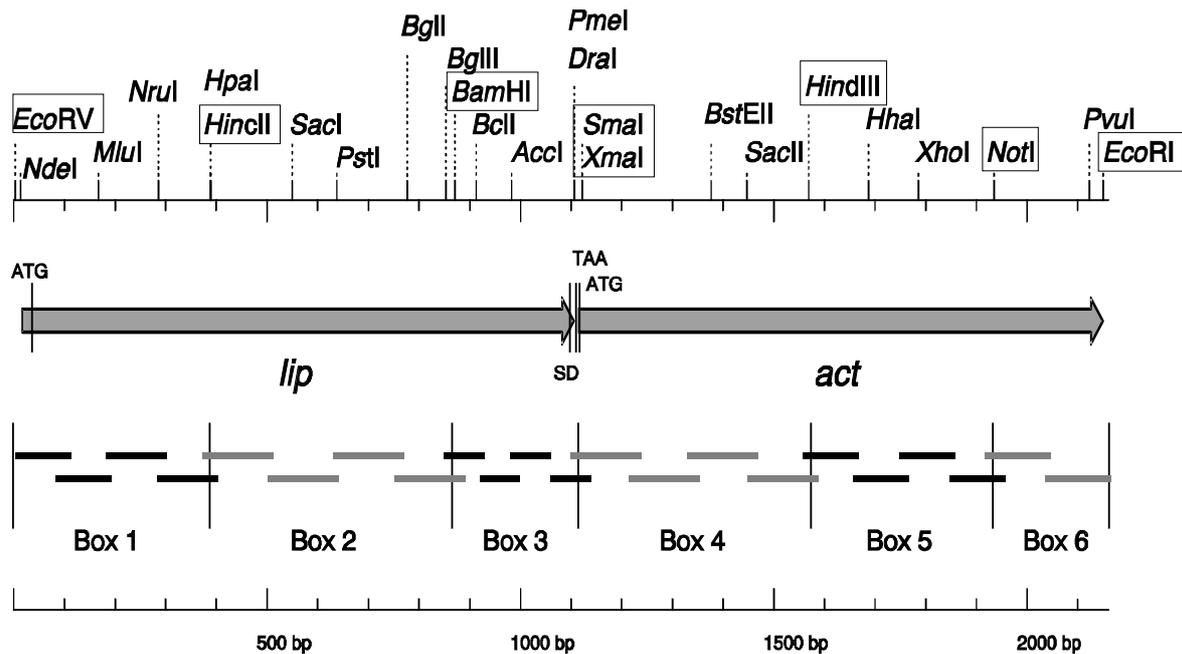


Abbildung 3.1.1: Aufbau der synthetischen Gene *lip* und *act* aus *Pseudomonas species* KWI 56. Die synthetischen Gene *lip* und *act* sind mit grauen Pfeilen dargestellt. Die Startcodons von *lip* und *act* (ATG), die Stopcodons (TAA) und die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) vor *act* sind in den Genen markiert. Die eingeführten singulären Restriktionsschnittstellen sind über dem Gen angezeichnet. Die schwarz umrahmten Restriktionsschnittstellen begrenzen die jeweiligen Boxen. Die einzelnen Boxen wurden aus den unten durch schwarze und graue Linien angezeichneten Oligonukleotiden synthetisiert.

(Schoner *et al.*, 1990). Da diese innerhalb des codierenden Bereichs des Lipasegens liegt, wurde eine SD-Sequenz gewählt, die der optimalen SD für *E. coli* (TAAGGAGGT) im Rahmen der Freiheiten für die codierende DNA-Sequenz möglichst nahe kommt. Die Gene wurden in 6 Genfragmente (Boxen) von etwa 400 bp aufgeteilt, die jeweils von Restriktionsschnittstellen flankiert sind. Zusätzlich wurden alle 100 bis 200 Basenpaare singuläre Restriktionsschnittstellen eingefügt, die den Zusammenbau der Gene und nachfolgendes Genetic Engineering erleichtern.

Die Codon-Usage wurde für eine Expression der Gene in *E. coli* optimiert (Baneyx, 1999; Weickert *et al.*, 1996). Codons, die selten in *E. coli* verwendet werden (z.B. AGA, AGG für Arginin, CCC für Prolin und ATA für Isoleucin) wurden vermieden, häufig in stark von *E. coli* exprimierten Genen verwendete Codons bevorzugt gewählt. In den Tabellen 3.1.2 und 3.1.3 sind die verwendeten Codons im Wildtyp und in den synthetischen Genen von Lipase und Helferprotein aufgeführt.

Gene aus Pseudomonaden weisen üblicherweise einen sehr hohen GC-Gehalt auf (ca. 70 bis 80 %) (West & Iglewski, 1988), wohingegen der GC-Gehalt von Genen aus Enterobacteriaceae bei etwa 50 % liegt. Ein hoher GC-Gehalt erhöht die Schmelztemperatur der DNA und kann daher die Transkription dieser Gene in *E. coli* behindern oder zu

```

1 TAATCAGGAG AACATGCATG GCCAGAACGA TGC GTTCCAG GGTGGTGGCA GGAGCAGTGG
1 GGGGGATATC AATACATATG GCTCGTACCA TGC GTTCTCG TGTGTTGCT GGTGCTGTTG
      Lip M A R T M R S R V V A G A V
      Signalsequenz

61 CATGCGCGAT GAGCATCGCG CCGTTCGCGG GGACGACCGC AGTGATGACG CTCGCGACGA
61 CTTGTGCTAT GTCTATCGCT CCGTTCGCTG GTACCACCGC TGTATGACC CTGGCTACCA
      A C A M S I A P F A G T T A V M T L A T

121 CGCACGCGGC GATGGCGGCG ACCGCGCCCG CCGATGGCTA CGCGGCGACG CGTTATCCGA
121 CCCACGCTGC TATGGCTGCT ACCGCTCCGG CTGACGGTTA CGCTGCTACG CGTTACCCGA
      T H A A M A A T A P A D G Y A A T R Y P
      reife Lipase (rLip)

181 TCATCCTCGT GCACGGGCTC TCGGGTACCG ACAAGTACGC CGGCGTGGTC GAGTATTGGT
181 TCATCCTGGT TCACGGTCTG TCTGGTACCG ACAAATACGC TGGTGTGTTT GAATACTGGT
      I I L V H G L S G T D K Y A G V V E Y W

241 ATGGCATCCA GGAAGACCTG CAGCAGAACG GTGCGACCGT CTACGTCGCG AACCTGTCTGG
241 ACGGTATCCA GGAAGACCTG CAACAGAACG GTGCTACCGT TTACGTCGCG AACCTGTCTG
      Y G I Q E D L Q Q N G A T V Y V A N L S

301 GGTTCCAGAG CGACGACGGC GCGAACGGGC GCGGCGAACA GTTGCTCGCT TACGTGAAGA
301 GTTTCCAGTC TGACGACGGT GCTAACGGTC GTGGTGAACA GCTGCTGGCT TACGTTAAAA
      G F Q S D D G A N G R G E Q L L A Y V K

361 CCGTGCTCGC GCGACGGGC GCGACCAAGG TCAATCTCGT CGGCCACAGC CAGGGCGGGC
361 CCGTTCGGC TGCTACCGGT GCTACCAAAG TTAACCTGGT TGGTCACTCT CAGGGTGGTC
      T V L A A T G A T K V N L V G H S Q G G

421 TCACGTCGCG CTATGTCGCG GCCGTCGCGC CCGATCTCGT GCGCTCGGTG ACGACGATCG
421 TGACCTCTCG TTACGTTGCT GCTGTTGCTC CGGACCTGGT TGCTTCTGTT ACCACCATCG
      L T S R Y V A A V A P D L V A S V T T I

481 GCACGCCGCA TCGCGGCTCC GAGTTTGCCG ACTTCGTGCA GAACGTGCTG GCGTACGATC
481 GTACCCCGCA CCGTGGTTCT GAATTTGCTG ACTTCGTTCA GAACGTTCTG GCTTACGACC
      G T P H R G S E F A D F V Q N V L A Y D

541 CGACCGGGCT TTCGTCATCG GTGATCGCCG CGTTCGTCAA TGTGTTCCGGC ATCCTGACGA
541 CGACCGGTCT GAGCTCTTCT GTTATCGCTG CTTTCGTAAA CGTTTTCCGGT ATCCTGACCT
      P T G L S S S V I A A F V N V F G I L T

601 GCAGCAGCCA CAACACGAAC CAGGACGCGC TCGCCGCGCT GCAGACGCTG ACCACCGCCC
601 CTTCTTCTCA CAACACCAAC CAGGACGCTC TGGCTGCTCT GCAGACCCTG ACCACCGCTC
      S S S H N T N Q D A L A A L Q T L T T A

661 GGGCTGCCAC GTACAACCAG AACTATCCGA GCGCGGGCCT GGGTGCGCCG GGCAGTTGCC
661 GTGCTGCTAC CTACAACCAG AACTACCCGT CTGCTGGTCT GGGTGCTCCG GGTCTTTGCC
      R A A T Y N Q N Y P S A G L G A P G S C

721 AGACCGGCGC GCCGACCGAA ACCGTCGGCG GCAACACGCA CCTGCTGTAT TCGTGGGCCG
721 AGACCGGTGC TCCGACCGAA ACCGTTGGTG GTAACACCCA CCTGCTGTAC TCTTGGGCCG
      Q T G A P T E T V G G N T H L L Y S W A

```

781	GCACGGCGAT	CCAGCCGACG	CTTTCGGTGT	TCGGCATCAC	GGGCGCGACC	GACACGAGCA
781	GTACGGCTAT	CCAGCCGACC	CTGTCTGTTT	TCGGTATCAC	CGGTGCTACC	GACACCTCTA
	G T A	I Q P T	L S V	F G I	T G A T	D T S
841	CCGTTCCGCT	CGTTGATCTG	GCGAACGTGC	TCGACCCGTC	GACGCTCGCG	CTGTTCCGGCA
841	CCGTTCCGCT	GGTAGATCTG	GCTAACGTTT	TGGATCCGTC	CACCCTGGCT	CTGTTCCGGTA
	T V P	L V D L	A N V	L D P	S T L A	L F G
901	CCGGCACGGT	GATGATCAAC	CGCGGCTCCG	GGCAGAACGA	CGGGCTCGTG	TCGAAGTGCA
901	CCGGTACCGT	TATGATCAAC	CGTGGTTCTG	GTCAGAACGA	CGGTCTGGTT	TCTAAATGCT
	T G T	V M I N	R G S	G Q N	D G L V	S K C
961	GTGCGCTGTA	CGGCAAGGTG	CTGAGTACGA	GCTACAAGTG	GAACCACCTC	GACGAGATCA
961	CTGCTCTGTA	CGGTAAAGTT	CTGTCTACCT	CTTACAAATG	GAACCACCTG	GACGAAATCA
	S A L	Y G K V	L S T	S Y K	W N H L	D E I
1021	ACCAGCTGCT	CGGCGTGCGC	GGCGCGTATG	CGGAAGATCC	GGTCGCGGTG	ATCCGCACGC
1021	ACCAGCTGCT	GGGTGTTTCGT	GGTGCTTACG	CTGAAGACCC	GGTTGCTGTT	ATCCGTACCC
	N Q L	L G V R	G A Y	A E D	P V A V	I R T
1081	ATGCGAACCG	GCTGAAGCTG	GCGGGCGTGT	AATCGATGAC	GTCACGTGAA	GGACGCGCGC
1081	ACGCTAACCG	TCTGAAACTG	<u>G</u> CAGGAGTTT	AAACTATGAC	CTCCCGGGAA	GGTCGTGCTC
	H A N	R L K L	A G V	- Act M	T S R E	G R A
1141	CGCTGGCGCG	GCGCGCCGTG	GTCTATGGTG	TCGTGGGGCT	GGCGGCGATT	GCCGGCGTGG
1141	CGCTGGCTCG	TCGTGCTGTT	GTTTACGGTG	TTGTTGGTCT	GGCTGCTATC	GCTGGTGTG
	P L A	R R A V	V Y G	V V G	L A A I	A G V
1201	CGATGTGGAG	CGGCGCGGGC	TGGCATCGCG	CAACGGGCGC	TTCCGGCGAG	TCGCCGGAGG
1201	CTATGTGGTC	TGGTGCTGGT	TGGCACCGTG	CTACCGGTGC	TTCTGGTGAA	TCTCCGGAAG
	A M W	S G A G	W H R	A T G	A S G E	S P E
	Δ34Act					
1261	CGTCGGTGGC	AGGGGGATCG	GTTACCGCAC	CGCCGAGGC	AGCCGTGCCG	GCAAGCACGG
1261	CATCTGTTGC	TGGTGGTTCT	GTTACCGCTC	CGCCGAGGC	TGCTGTTCCG	GCTTCTACCG
	A S V	A G G S	V T A	P P Q	A A V P	A S T
1321	GCTTGCCGCC	GTCACTCGCC	GGCTCCAGCG	CGCCGCGGTT	GCCGCTCGAT	GCCGGCGGGC
1321	GTCTGCCGCC	GTCTCTGGCT	GGTTCTTCTG	CTCCGCGTCT	GCCGCTGGAC	GCTGGTGGTC
	G L P	P S L A	G S S	A P R	L P L D	A G G
	Δ70Act					
1381	ATCTCGCGAA	GTCGCGCGCA	GTGCGGGATT	TCTTCGACTA	CTGCCTCACC	GCGCAGAGCG
1381	ACCTGGCTAA	ATCTCGTGCT	GTTCTGTGACT	TCTTCGACTA	CTGCCTGACC	GCTCAGTCTG
	H L A	K S R A	V R D	F F D	Y C L T	A Q S
1441	ACCTGAGCGC	GGCCGGTCTC	GACGCGTTCG	TCATGCGCGA	GATTGCCGCA	CAGCTCGACG
1441	ACCTGTCCGC	GGCTGGTCTG	GACGCTTTCG	TTATGCGTGA	AATCGCTGCT	CAGCTGGACG
	D L S	A A G L	D A F	V M R	E I A A	Q L D
1501	GTACCGTTGC	GCAAGCCGAG	GCGCTCGACG	TGTGGCACCG	GTATCGCGCG	TATCTCGACG
1501	GTACCGTTGC	TCAGGCTGAA	GCTCTGGACG	TTTGGCACCG	TTACCGTGCT	TACCTGGACG
	G T V	A Q A E	A L D	V W H	R Y R A	Y L D
1561	CACTCGCGAA	ATTGCGCGAT	GCCGGCGCGG	CCGACAAGTC	CGACCTGGGC	GCGTTGCAAC
1561	CTCTGGCTAA	GCTTCGTGAC	GCTGGTGCTG	CTGACAAATC	TGACCTGGGT	GCTCTGCAAC
	A L A	K L R D	A G A	A D K	S D L G	A L Q
1621	TCGCGCTCGA	CCAGCGCGCG	TCGATCGCGT	ACCGCACGCT	CGGCGACTGG	AGCCAGCCGT
1621	TGGCTCTGGA	CCAGCGTGCT	TCTATCGCTT	ACCGTACCCT	GGGTGACTGG	TCTCAGCCGT
	L A L	D Q R A	S I A	Y R T	L G D W	S Q P

```

1681 TCTTCGGTGC GGAGCAGTGG CGGCAGCGCT ACGACCTGGC GCGACTGAAG ATCGCGCAGG
1681 TCTTCGGGCG GGAACAGTGG CGTCAGCGTT ACGACCTGGC TCGTCTGAAA ATCGCTCAGG
      F F G A E Q W R Q R Y D L A R L K I A Q

1741 ATCCCACGCT GACGGATGCG CAGAAGGCCG AACGGCTCGC GGCGCTCGAA CAGCAGATGC
1741 ACCCGACCCT GACCGACGCT CAGAAAGCTG AACGTCTGGC TGCTCTCGAG CAGCAGATGC
      D P T L T D A Q K A E R L A A L E Q Q M
1801 CGGCCGACGA ACGCGCCGCG CAGCAGCACA TCGACCAGCA GCGTGC GGCG ATCGACCAGA
1801 CGGCTGACGA ACGTGCTGCT CAGCAGCACA TCGACCAGCA GCGTGCTGCT ATCGACCAGA
      P A D E R A A Q Q H I D Q Q R A A I D Q

1861 TCGCGCAATT GCAGAAGAGC GGGGCGACAC CCGATGCGAT GCGCGCACAA CTGACGCAGA
1861 TCGCTCAGCT GCAAAAATCT GGTGCTACCC CGGACGCTAT GCGTGCTCAG CTGACCCAGA
      I A Q L Q K S G A T P D A M R A Q L T Q

1921 CGCTCGGCCC CGAAGCGGCC GCGCGCGTCG CGCAGATGCA GCAGGACGAC GCATCGTGCC
1921 CCCTGGGTCC GGAAGCGGCC GCTCGTGTTG CTCAGATGCA GCAGGACGAC GCTTCTTGCC
      T L G P E A A A R V A Q M Q Q D D A S W

1981 AGAGCCGCTA CGCGGACTAT GCGGCGCAGC GCACGCAGAT CGAATCGGCC GGCCTGTTCGC
1981 AGTCTCGTTA CGCTGACTAC GCTGCTCAGC GTACCCAGAT CGAATCTGCT GGTCTGTCTC
      Q S R Y A D Y A A Q R T Q I E S A G L S

2041 CGCAGGATCG CGACGCGCAG ATCGCCGCGC TCGGGCAGCG CGTGTTTCACG CGGCCCGGCG
2041 CGCAGGACCG TGACGCTCAG ATCGCTGCTC TCGGTCAGCG TGTTTTACCC CGTCCGGGTG
      P Q D R D A Q I A A L R Q R V F T R P G

2101 AAGCCGTGCG TGCGGCATCG CTCGATCGCG GGGCGGGCAG CGCGCGGTAA CGCGGGCGGC
2101 AAGCTGTTTCG TGCTGCTTCT CTCGATCGTG GTGCTGGTTC TGCTCGTTAA GAATTCGGG
      E A V R A A S L D R G A G S A R -

```

Abbildung 3.1.2: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Lipase und Helfer aus *Pseudomonas species* KWI 56. Die obere Zeile zeigt die DNA-Sequenzen der Wildtypgene *lip* und *act*, darunter ist die DNA-Sequenz der synthetischen Gene gegenübergestellt. In der dritten Zeile befindet sich die abgeleitete Aminosäuresequenz der Lipase und ihres Helferproteins. Die Signalsequenz der Lipase sowie die verkürzten Helferproteine (vergl. Kapitel 3.1.2) sind gekennzeichnet, die SD-Sequenz (AGGA) unterstrichen.

Tabelle 3.1.1: GC-Gehalt der Wildtyp-Gene *lip* und *act* aus *Pseudomonas species* KWI 56 und den synthetischen Genen *lip* und *act*.

	<i>lip</i>	<i>act</i>	<i>lip</i> und <i>act</i>
Wildtyp-Gen	67,0%	71,4%	69,1%
Synthetisches Gen:	55,0%	59,8%	57,3%

Tabelle 3.1.2: Codon Usage und Aminosäure-Zusammensetzung der Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56. Angegeben ist jeweils die Anzahl der verwendeten Codons und ihr prozentualer Anteil.

Aminosäure	Anzahl in Lip	Codon-Usage in <i>lip</i> Wildtyp		Codon-Usage im synthetischen <i>lip</i>	
Ala	53 (14,6%)	GCG (37; 10,1%) GCC (10; 2,7%)	GCA (4; 1,1%) GCT (2; 0,5)	GCT (50; 13,7%) GCA (1; 0,3%)	GCG (1; 0,3%) GCC (1; 0,3%)
Arg	12 (3,3%)	CGC (6; 1,6%) CGG (2; 0,5%) CGT (2; 0,5%)	AGG (1; 0,3%) AGA (1; 0,3%) CGA (0)	CGT (12; 3,3%) CGC (0) CGA (0)	CGG (0) AGG (0) AGA (0)
Asn	17 (4,7%)	AAC (15; 4,1%)	AAT (2; 0,5%)	AAC (17; 4,7%)	AAT (0)
Asp	15 (4,1%)	GAC (10; 2,7%)	GAT (5; 1,4%)	GAC (13; 3,6%)	GAT (2; 0,6%)
Cys	3 (0,8%)	TGC (3; 0,8%)	TGT (0)	TGC (2; 0,5%)	TGT (1; 0,3%)
Gln	14 (3,8%)	CAG (14; 3,8%)	CAA (0)	CAG (13; 3,6%)	CAA (1; 0,3%)
Glu	7 (1,9%)	GAA (4; 1,1%)	GAG (3; 0,8%)	GAA (7; 1,9%)	GAG (0)
Gly	38 (10,4%)	GGC (27; 7,4%) GGG (7; 1,9%)	GGT (3; 0,8%) GGA (1; 0,3%)	GGT (37; 10,1%) GGC (0)	GGA (1; 0,3%) GGG (0)
His	8 (2,2%)	CAC (6; 1,6%)	CAT (2; 0,5%)	CAC (8; 2,2%)	CAT (0)
Ile	12 (3,3%)	ATC (12; 3,3%) ATA (0)	ATT (0)	ATC (12; 3,3%) ATT (0)	ATA (0)
Leu	34 (9,3%)	CTG (16; 4,4%) CTC (15; 4,1%) CTT (2; 0,5%)	TTG (1; 0,3%) TTA (0) CTA (0)	CTG (34; 9,3%) CTT (0) CTA (0)	TTA (0) CTC (0) TTG (0)
Lys	7 (1,9%)	AAG (7; 1,9%)	AAA (0)	AAA (7; 1,9%)	AAG (0)
Met	6 (1,6%)	ATG (6; 1,6%)		ATG (6; 1,6%)	
Phe	8 (2,2%)	TTC (7; 1,9%)	TTT (1; 0,3%)	TTC(7; 1,9%)	TTT (1; 0,3%)
Pro	13 (3,6%)	CCG (11; 3,0%) CCC (2; 0,5%)	CCT (0) CCA (0)	CCG (13; 3,6%) CCT (0)	CCC (0) CCA (0)
Ser	26 (7,1%)	TCG (10; 2,7%) AGC (9; 2,5%) TCC (3; 0,8%)	AGT (3; 0,8%) TCA (1; 0,3%) TCT (0)	TCT (24; 6,6%) TCC (1; 0,3%) AGC (1; 0,3)	TCA (0) TCG (0) AGT (0)
Thr	39 (10,7%)	ACG (25; 6,8%) ACC (14; 3,8%)	ACT (0) ACA (0)	ACC (37; 10,1%) ACG (2; 0,5%)	ACA (0) ACT (0)
Trp	3 (0,8%)	TGG (3; 0,8%)		TGG (3; 0,8%)	
Tyr	15 (4,1%)	TAC (8; 2,2%)	TAT (7; 1,9%)	TAC (15; 4,1%)	TAT (0)
Val	34 (9,3%)	GTG (22; 6,0%) GTC (10; 2,7%)	GTT (2; 0,5%) GTA (0)	GTT (31; 8,5%) GTA (2; 0,5%)	GTC (1; 0,3) GTG (0)
Gesamt	364 (100%)	NNN (364; 100%)		NNN (364; 100%)	

Tabelle 3.1.3: Codon Usage und Aminosäure-Zusammensetzung des Helferproteins *act* für die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56. Angegeben ist jeweils die Anzahl der verwendeten Codons und ihr prozentualer Anteil.

Aminosäure	Anzahl in Act	Codon-Usage in <i>act</i> Wildtyp		Codon-Usage im synthetischen <i>act</i>	
Ala	73 (21,2%)	GCG (44; 12,8%) GCC (17; 4,9%)	GCA (11; 3,2%) GCT (1; 0,3)	GCT (68; 19,7%) GCG (3; 0,9%)	GCA (1; 0,3%) GCC (1; 0,3%)
Arg	31 (9,0%)	CGC (18; 5,2%) CGG (9; 2,6%) CGT (3; 0,9%)	CGA (1; 0,3%) AGG (0) AGA (0)	CGT (30; 8,7%) CGC (0) CGA (0)	CGG (1; 0,3%) AGG (0) AGA (0)
Asn	0 (0%)	AAC (0)	AAT (0)	AAC (0)	AAT (0)
Asp	26 (7,6%)	GAC (18; 5,2%)	GAT (8; 2,3%)	GAC (25; 7,2%)	GAT (1; 0,3%)
Cys	1 (0,3%)	TGC (1; 0,3%)	TGT (0)	TGC (1; 0,3%)	TGT (0)
Gln	31 (9,0%)	CAG (27; 7,8%)	CAA (4; 1,2%)	CAG (29; 8,4%)	CAA (2; 0,6%)
Glu	12 (3,5%)	GAA (7; 2,0%)	GAG (5; 1,4%)	GAA (11; 3,2%)	GAG (1; 0,3%)
Gly	26 (7,6%)	GGC (15; 4,3%) GGG (5; 1,4%)	GGT (4; 1,2%) GGA (2; 0,6%)	GGT (25; 7,2%) GGC (1; 0,3%)	GGA (0) GGG (0)
His	4 (1,2%)	CAC (2; 0,6%)	CAT (2; 0,6%)	CAC (4; 1,2%)	CAT (0)
Ile	9 (2,6%)	ATC (7; 2,0%) ATT (2; 0,6%)	ATA (0)	ATC (9; 2,6%) ATT (0)	ATA (0)
Leu	31 (9,0%)	CTC (16; 4,6%) CTG (10; 2,9%) TTG (5; 1,4%)	CTT (0) TTA (0) CTA (0)	CTG (28; 8,1%) CTC (2; 0,6%) CTT (1; 0,3%)	TTA (0) CTA (0) TTG (0)
Lys	6 (1,7%)	AAG (5; 1,4%)	AAA (1; 0,3%)	AAA (5; 1,4%)	AAG (1; 0,3%)
Met	6 (1,7%)	ATG (6; 1,7%)		ATG (6; 1,7%)	
Phe	6 (1,7%)	TTC (6; 1,7%)	TTT (0)	TTC (6; 1,7%)	TTT (0)
Pro	16 (4,7%)	CCG (12; 3,5%) CCC (4; 1,2%)	CCT (0) CCA (0)	CCG (16; 4,6%) CCT (0)	CCC (0) CCA (0)
Ser	23 (6,7%)	TCG (9; 2,6%) AGC (9; 2,6%) TCC (3; 0,9%)	TCA (2; 0,6%) AGT (0) TCT (0)	TCT (21; 6,1%) TCC (2; 0,6%) AGT (0)	AGC (0) TCA (0) TCG (0)
Thr	14 (4,1%)	ACG (10; 2,9%) ACC (3; 0,9%)	ACA (1; 0,3%) ACT (0)	ACC (14; 4,1%) ACT (0)	ACA (0) ACG (0)
Trp	6 (1,7%)	TGG (6; 1,7%)		TGG (6; 1,7%)	
Tyr	8 (2,3%)	TAC (4; 1,2%)	TAT (4; 1,2%)	TAC (8; 2,3%)	TAT (0)
Val	15 (4,4%)	GTG (9; 2,6%) GTC (4; 1,2%)	GTT (2; 0,6%) GTA (0)	GTT (15; 4,3%) GTA (0)	GTC (0) GTG (0)
Gesamt	344 (100%)	NNN (344; 100%)		NNN (344; 100%)	

unerwünschten Sekundärstrukturen einzelsträngiger DNA oder RNA führen. Neben der Translation wird dabei auch das molekularbiologische Arbeiten erschwert. Daher wurde einhergehend mit der Optimierung der Codon-Usage beim Design der synthetischen Gene auch der GC-Gehalt soweit wie möglich gesenkt (Tab. 3.1.1). Abbildung 3.1.2 zeigt die Aminosäuresequenz von Lipase und Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 und die dazugehörigen DNA-Sequenzen der Wildtyp-Gene und der synthetischen Gene. Die DNA-Sequenzen von Wildtyp-Genen und synthetischen Genen sind zu 77 % identisch.

3.1.1.2 Synthese der Gen-Boxen

Die Gene für die Lipase und deren Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 wurden in 6 Gen-Boxen von je ca. 400 bp unterteilt. Jede Gen-Box wurde einzeln aus 4 langen, sich überlappenden Oligonukleotiden in zwei PCR-Schritten synthetisiert (Kapitel 2.6.7). Zuerst wurden über PCR Oligodimere gebildet, die dann im zweiten PCR-Schritt zu einer Gen-Box zusammengefügt wurden. Die Gen-Boxen überlappen sich jeweils um etwa 20 bp. In diesen überlappenden Bereichen der Kassetten befindet sich jeweils eine singuläre Restriktionsschnittstelle, die das Aneinandersetzen der Kassetten ermöglicht. Zur Vereinfachung der nachfolgenden Klonierarbeiten wurde an jedes Kassettenende bei der Synthese-PCR eine *EcoRI* Restriktionsschnittstelle angefügt. Die für die Gensynthese verwendeten langen Oligonukleotide sind in Abb. 3.1.3 gekennzeichnet.

Da die Gen-Boxen mit der Deep-Vent-Polymerase, einer DNA-Polymerase, die stumpfe Enden („blunt-ends“) bei der PCR generiert, synthetisiert wurden, konnten die einzelnen Gen-Boxen direkt blunt-end in den mit *SmaI* bzw. *HincII* linearisierten Vektor pUC19 kloniert werden. Nach der Transformation in *E. coli* DH5 α konnten Klone mit Insert mittels Blauweiß-Screening auf LB_{AmpX-Gal}-Agarplatten selektiert und die DNA-Sequenz durch DNA-Sequenzierung überprüft werden. Die Sequenzierung von jeweils 3 bis 20 Klonen jeder Gen-Box offenbarte eine Fehlerrate von 0 bis über 10 Sequenzfehlern pro Box (400 bp) (Tab. 3.1.4). Von Box 1 lag bereits nach der ersten Klonierung und Sequenzierung ein fehlerfreier Klon vor, der im folgenden mit pkwibox1 bezeichnet wurde. Bei Box 2 wiesen alle synthetisierten Boxen über 10 Sequenzfehler auf. Da Box 1 jedoch bereits erfolgreich unter den gewählten Synthese-Bedingungen generiert wurde, lag der Schluß nahe, daß die Oligos nicht homogen waren. Daher wurden neue lange Oligos bestellt. Nach erneuter Synthese und Sequenzierung 12 weiterer Klone wurde ein fehlerfreier Klon (pkwibox2) gefunden.

1 5' GGGGGATATC AATACATATG GCTCGTACCA TCGTTCCTCG TGTGTTGCT GGTGCTGTTG
 3' CCCCTATAG TTATGTATAC CGAGCATGGT ACGCAAGAGC ACAACAACGA CCACGACAAC
 Box 1

61 CTTGTGCTAT GTCTATCGCT CCGTTCGCTG GTACCACCGC TGTATGACC CTGGCTACCA
 GAACACGATA CAGATAGCGA GGCAAGCGAC CATGGTGGCG ACAATACTGG GACCCGATGGT
 Oligo KWI 2

121 CCCACGCTGC TATGGCTGCT ACCGCTCCGG CTGACGGTTA CGCTGCTACG CGTTACCCGA
GGGTGCGACG ATACCGACGA TGGCGAGGCC GACTGCCAAT GCGACGATGC GCAATGGGCT
 ><MluI

181 TCATCCTGGT TCACGGTCTG TCTGGTACCG ACAAATACGC TGGTGTGTT GAATACTGGT
AGTAGGACCA AGTGCCAGAC AGACCATGGC TGTTTATGCG ACCACAACAA CTTATGACCA
 Oligo KWI 3

241 ACGGTATCCA GGAAGACCTG CAACAGAACG GTGCTACCGT TTACGTGCGC AACCTGTCTG
 TGCCATAGGT CTTTCTGGAC GTTGTCTTGC CACGATGGCA AATGAGCGC TTGGACAGAC
 ><NruI
 Oligo KWI 4

301 GTTTCAGTC TGACGACGGT GCTAACGGTC GTGGTGAACA GCTGCTGGCT TACGTTAAAA
CAAAGGTCAG ACTGCTGCCA CGATTGCCAG CACCACTTGT CGACGACCGA ATGCAATTTT

361 CCGTTCTGGC TGCTACCGGT GCTACCAAAG TTAACCTGGT TGGTCACTCT CAGGGTGGT
GGCAAGACCG ACGATGGCCA CGATGGTTTC AATTGGACCA ACCAGTGAGA GTCCACCAG
 Oligo KWI 5 ><HindIII
 Box 2

421 TGACCTCTCG TTACGTTGCT GCTGTTGCTC CGGACCTGGT TGCTTCTGTT ACCACCATCG
 ACTGGAGAGC AATGCAACGA CGACAACGAG GCCTGGACCA ACGAAGACAA TGGTGGTAGC

481 GTACCCCGCA CCGTGGTTCT GAATTTGCTG ACTTCGTTCA GAACGTTCTG GCTTACGACC
 CATGGGGCGT GGCACCAAGA CTTAAACGAC TGAAGCAAGT CTTGCAAGAC CGAATGCTGG
 Oligo KWI 6

541 CGACCGGTCT GAGCTCTTCT GTTATCGCTG CTTTCGTAAA CGTTTTGCGT ATCCTGACCT
GCTGGCCAGA CTCGAGAAGA CAATAGCGAC GAAAGCATT GCAAAAGCCA TAGGACTGGA
 ><SacI

601 CTTCTTCTCA CAACACCAAC CAGGACGCTC TGGCTGCTCT GCAGACCCTG ACCACCGCTC
GAAGAAGAGT GTTGTGGTTG GTCCTGCGAG ACCGACGAGA CGTCTGGGAC TGGTGGCGAG
 Oligo KWI 7 ><PstI

661 GTGCTGCTAC CTACAACCAG AACTACCCGT CTGCTGGTCT GGGTGCTCCG GGTTCCTTGCC
 CACGACGATG GATGTTGGTC TTGATGGGCA GACGACCAGA CCCACGAGGC CCAAGAACGG

721 AGACCGGTGC TCCGACCGAA ACCGTTGGTG GTAACACCCA CDTGCTGTAC TCTTGGGCCG
 TCTGGCCACG AGGCTGGCTT TdGCAACCAC CATTGTGGGT GGACGACATG AGAACCCGGC
 Oligo KWI 8

781 GTACGGCTAT CCAGCCGACC CTGTCTGTTT TCGGTATCAC CGGTGCTACC GACACCTCTA
CATGCCGATA GGTCGGCTGG GACAGACAAA AGCCATAGTG GCCACGATGG CTGTGGAGAT
 ><BglI

```

                ><BglIII   Oligo KWI 9   ><BamHI
841  CCGTTCCGCT GGTAGATCTG GCTAACGTTTC TGGATCCGTC CACCCTGGCT CTGTTCGGTA
    GGCAAGGCGA CCATCTAGAC CGATTGCAAG ACCTAGGCAG GTGGGACCGA GACAAGCCAT
                                                Box 3
                ><BclI
901  CCGGTACCGT TATGATCAAC CGTGGTTCTG GTCAGAACGA CCGTC TGGTT TCTAAATGCT
    GGCCATGGCA ATACTAGTTG GCACCAAGAC CAGTCTTGCT GCCAGACCAA AGATTTACGA
                Oligo KWI 10
                ><AccI   Oligo KWI 11
961  CTGCTCTGTA CGGTAAAGTT CTGTCTACT CTTACAAATG GAACCACCTG GACGAAATCA
    GACGAGACAT GCCATTTCAA GACAGATGGA GAATGTTTAC CTTGGTGDAC CTGCTTTAGT

1021  ACCAGCTGCT GGGTGTTCGT GGTGCTTACG CTGAAGACCC GGTGCTGTT A TCCGTACCC
    TGGTCGACGA CCCACAAGCA CCACGAATGC GACTTCTGGG CCAACGACAA TAGGCATGGG
                Oligo KWI 12
                SD   > <DraI   ><XmaI   act
1081  ACGCTAACCG TCTGAAACTG GCAGGAGTTT AAATCTATGAC CTCCCGGGAA GTCGTGCTC
    TGCGATTGGC AGACTTTGAC CGTCTCAA TTTGATACTG GAGGGCCCTT CCA GCACGAG
                                                Box 4
                Oligo KWI 13
1141  CGCTGGCTCG TCGTGTGTT GTTACGGTG TTGTGGTCT GGCTGCTATC GCTGGTGTG
    GCGACCGAGC AGCACGACAA CAAATGCCAC AACAACCAGA CCGACGATAG CGACCACAAC

1201  CTATGTGGTC TGGTGTGTT TGGCACCGTG CTACCGGTGC TTCTG GTGAA TCTCCGGAAG
    GATACACCAG ACCACGACCA ACCGTGGCAC GATGGCCACG AAGACCACTT AGAGGCCCTC
                Oligo KWI 14
1261  CATCTGTTGC TGGTGGTTCT GTTACCGCTC CGCCGAGGC TGCTGTCCG GCTTCTACCG
    GTAGACAACG ACCACCAAGA CAATGGCGAG GCGGCGTCCG ACGACAAGGC CGAAGATGGC

                Oligo KWI 15
1321  GTCTGCCGCC GTCTCTGGCT GTTTCTTCTG CTCCCGGTCT GCCGCTGGAC GCTGGTGGTC
    CAGACGGCGG CAGAGACCGA CCAAGAAGAC GAGGCG CAGA CGGCGACCTG CGACCACCAG

1381  ACCTGGCTAA ATCTCGTGCT GTTCGTGACT TCTTCGACTA CTGCCTGACC GCTCAGTCTG
    TGGACCGATT TAGAGCACGA CAAGCACTGA AGAAGCTGAT GACGGACTGG CGAGTCAGAC

                > <SacII
1441  ACCTGTCCCG GGCTGGTCTG GACGCTT TCG TTATGCGTGA AATCGCTGCT CAGCTGGACG
    TGGACAG GCG CCGACCAGAC CTGCGAAAAGC AATACGCACT TTAGCGACGA GTCGACCTGC
                Oligo KWI 16
1501  GTACCGTTGC TCAGGCTGAA GCTCTGGACG TTTGGCACCG TTACCGTGCT TACCTGGAGG
    CATGGCAACG AGTCCGACTT CGAGACCTGC AAACCGTGGC AATGGCACGA ATGGACCTGC

                ><HindIII   Oligo KWI 17
1561  CTCTGGCTAA GCTTCGTGAC GCTGGTGCTG CTGACAAAATC TGACCTGGGT GCTCTGCAAC
    GAGACCGATT CGAAGCACTG CGACCACGAC GACTGTTTAG ACTGGACCCA CGAGACGTTG
                                                Box 5
1621  TGGCTCTGGA CCAGCGTGCT TCTATCGCTT ACCGTACCCT GGGTGACTGG TCTCAGCCGT
    ACCGAGACCT GGTGCACGA AGATAGCGAA TGGCATGGGA CCCACTGACC AGAGTCGGCA
                Oligo KWI 18

```

```

                ><HhaI
1681  TCTTCGGCGC GGAACAGTGG CGTCAGCGTT ACGACCTGGC TCGTCTGAAA ATCGCTCAGG
      AGAAGCCGCG CTTTGTCAAC GCAGTCGCAA TGCTGGACCG AGCAGACTTT TAGCGAGTCC

      Oligo KWI 19                                ><XhoI
1741  ACCCGACCCT GACCGACGCT CAGAAAGCTG AACGTCTGGC TGCTCTCGAG CAGCAGATGC
      TGGGCTGGGA CTGGCTGCCA GTCCTTCGAC TTGCAGACCG ACGAGAGCTC GTCGTCTACG

1801  CCGCTGACGA ACGTGCTGCT CAGCAGCACA TCGACCAGCA GCGTGCTGCT ATCGACCAGA
      GCCGACTGCT TGCACGACGA GTCGTCTGTG AGCTGGTCGT CGCACGACGA TAGCTGGTCT
                Oligo KWI 20

1861  TCGCTCAGCT GCAAAAATCT GGTGCTACCC CGGACGCTAT GCGTGCTCAG CTGACCCAGA
      AGCGAGTCGA CGTTTTTAGA CCACGATGGG GCCTGCGATA CGCACGAGTC GACTGGGTCT

                ><NotI      Oligo KWI 21
1921  CCCTGGGTCC GGAAGCGGCC GCTCGTGTTG CTCAGATGCA GCAGGACGAC GCTTCTTGGC
      GGGACCCAGG CCTTCGCCCG CGAGCACAAC GAGTCTACGT CGTCCTGCTG CGAAGAACCG

                BOX 6

1981  AGTCTCGTTA CGCTGACTAC GCTGCTCAGC GTACCCAGAT CGAATCTGCT GGTCTGTCTC
      TCAGAGCAAT GCGACTGATG CGACGAGTCG CATGGGTCTA GCTTAGACGA CCAGACAGAG

2041  CGCAGGACCG TGACGCTCAG ATCGCTGCTC TCGTCAGCG TGTTTTACCC CGTCCGGGTG
      GCGTCCTGGC ACTGCGAGTC TAGCGACGAG ACGCAGTCGC ACAAAGTGG GCAGGCCAC
      Oligo KWI 22

                ><PvuI                                ><EcoRI
2101  AAGCTGTTTCG TGCTGCTTCT CTCGATCGTG GTGCTGGTTC TGCTCGTTAA GAATTCGGG
      TTGACAAGC ACGACGAAGA GAGCTAGCAC CACGACCAAG ACGAGCAATT CTTAAGGCC

```

Abbildung 3.1.3: Nukleotidsequenz von *lip* und *act* aus *Pseudomonas species* KWI 56. Die für die Gensynthese verwendeten Oligonukleotide sind in grauen und weißen Kästen dargestellt, Restriktionsschnittstellen sind über der Sequenz gekennzeichnet. Die Shine-Dalgarno-Sequenz ist fettgedruckt, Start- und Stop-Codons sind dick schwarz umrandet.

Die Boxen 5 und 6 konnten wohl aufgrund ihrer etwas geringeren Größe in einem dritten PCR-Schritt bei der Synthese bereits zusammengefügt werden und bildeten daher Box 5/6. Eine Fusion der restlichen Gen-Boxen mittels PCR war ebenfalls versucht worden, jedoch ohne Erfolg. Es schien daher einfacher und komfortabler, die Boxen getrennt zu klonieren und sequenzieren und erst anschließend zu fusionieren.

Nach mehreren Versuchsrunden mit Synthese, Klonierung und Sequenzierung wurde schließlich von den Boxen 3, 4 und 5/6 jeweils ein Klon mit nur einer Deletion oder Insertion

eines Basenpaars erhalten. Diese Sequenzfehler konnten mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese entfernt werden. Die Klone mit korrekter Sequenz der Boxen 3, 4 bzw. 5/6 wurden pkwibox3, pkwibox4 bzw. pkwibox 5/6 genannt.

Tabelle 3.1.4: Ergebnis der Sequenzierungen der Gen-Boxen 1-6 von *Pseudomonas species* KWI 56.

Box	Fehler	Box	Fehler
Box 1: 1.2 1.3 1.7	4 Del.: 211, 231, 242, 375 ok! 1 Aust., 3 Del.: 45, 96, 179, 195	Box 4: 4.2 4.4 4.12 4.13 4.15 4.2n 4.3 4.5 4.54 4.45 4.60 4.58	1 Del., 1 Ins.: 1238, 1308 4 Del.: 1236, 1258 (7bp), 1297, 1550 > 10 Fehler > 10 Fehler > 10 Fehler > 10 Fehler > 10 Fehler > 10 Fehler 2 Del: 1411, 1418 > 10 Fehler 1 Del: 1130 1 Del, 1 AT: 1325, 1500
Box2: 2.3 2.5 2.7 2.9 2.10 2.42 neue Oligos: 2N.2 2N.5 2N.7 2N.9 2N.10 2N.11 2N.13 2N.17 2N.18 2N.24 2N.28 2N.30	>10 Fehler > 10 Fehler > 10 Fehler > 10 Fehler > 10 Fehler > 10 Fehler 1 Del: 850-851 1 Del: 821-825 1 Del: 615 2 Del 1 Del: 609-610 3 Del 1 Del: 573-576 1 Del; 1 AT 1 Del: 468 1 Del: 452-460 ok! 3 Del	Box 5: 5.3 5.5 17	1 Del.: 1769 1 Del.: 1582 1 Del.: 1603
Box 3: 3.1 3.2 15 3.18	3 Aust.: 1013 (silent), 1082, 1110 1 Del.: 990 1 Del.: 887 (4 bp) 1 Del: 953; 1 Ins: 1102	Box 6: 6.4 6.11	> 10 Fehler > 10 Fehler
		Box 5+6: 22.3 22.4 22.5 22.6	1 Ins.: 2138 2 Del.: 1895, 2120 1 Del.: 1944 (>20bp) 1 Del., 1 Aust.: 2039, 2070

3.1.1.3 Gene-Assembly

Nächster Schritt auf dem Weg zum synthetischen Gen war das Zusammenfügen der einzelnen Gen-Boxen zum gesamten Gen. Jede Gen-Box enthielt an ihren beiden Enden jeweils eine singuläre Restriktionsschnittstelle, die sie mit ihren Nachbar-Boxen teilt. Zusätzlich war am 3' Ende der Fragmente jeweils eine zusätzliche *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt worden, die neben der Schnittstelle am 5' Ende jeweils zum Klonieren verwendet wurde. Die Abbildungen 3.1.4 A und 3.1.4 B illustrieren die einzelnen Klonierungsschritte beim Zusammenbau der Gene für die Lipase und ihr Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 in pUC19.

Zunächst wurde Box 1 aus *pkwibox1* so in den Vektor pUC19 kloniert, daß die multiple cloning site (MCS) des Vektors dabei deletiert wurde und somit alle zur Vervollständigung der synthetischen Gene benötigten Restriktionsschnittstellen nicht mehr auf dem Vektor-Backbone vorhanden waren. Hierzu wurde pUC19 mit *HindIII* geschnitten, die überhängenden Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und mit *EcoRI* erneut verdaut. Die mit *EcoRV* und *EcoRI* aus *pkwibox1* herausgeschnittene Box 1 wurde dann in den so präparierten pUC19-Vektor ligiert. In dem so entstandenen Plasmid *pkwi1* wurde anschließend Box 2 aus *pkwibox 2* über die Restriktionsschnittstellen *HincII* und *EcoRI* downstream von Box 1 kloniert (*pkwi12*). Die Klonierung von Box 3 hinter Box 2 in *pkwi12* erfolgte über die Schnittstellen *BamHI/EcoRI* und resultierte im Plasmid *pkwi1-3*. Plasmid *pkwi1-4* wurde durch Einfügen von Box 4 mittels der *SmaI* und *EcoRI* Schnittstellen in *pkwi1-3* erhalten. Das komplette Gen in Plasmid *pkwi1-6* wurde durch Klonierung der Box5/6 aus *pkwibox5/6* über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *EcoRI* fertiggestellt. Anschließend wurde die Richtigkeit der Sequenz der Gene für die Lipase und das Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 nochmals durch DNA-Sequenzierung überprüft.

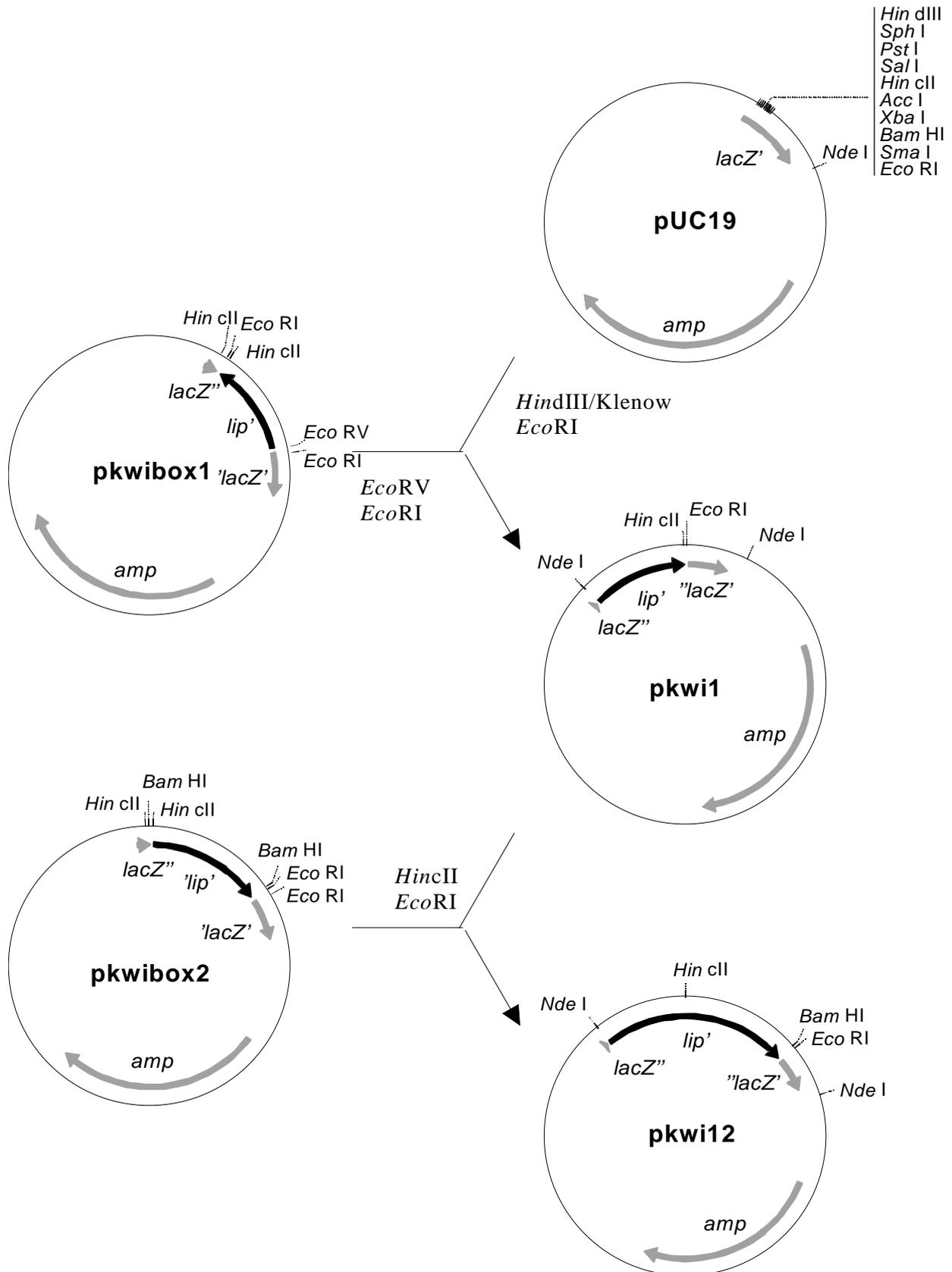


Abbildung 3.1.4 A: Zusammensetzen der Genboxen für die Lipase aus *Pseudomonas* species KWI 56 und ihr Helferprotein.

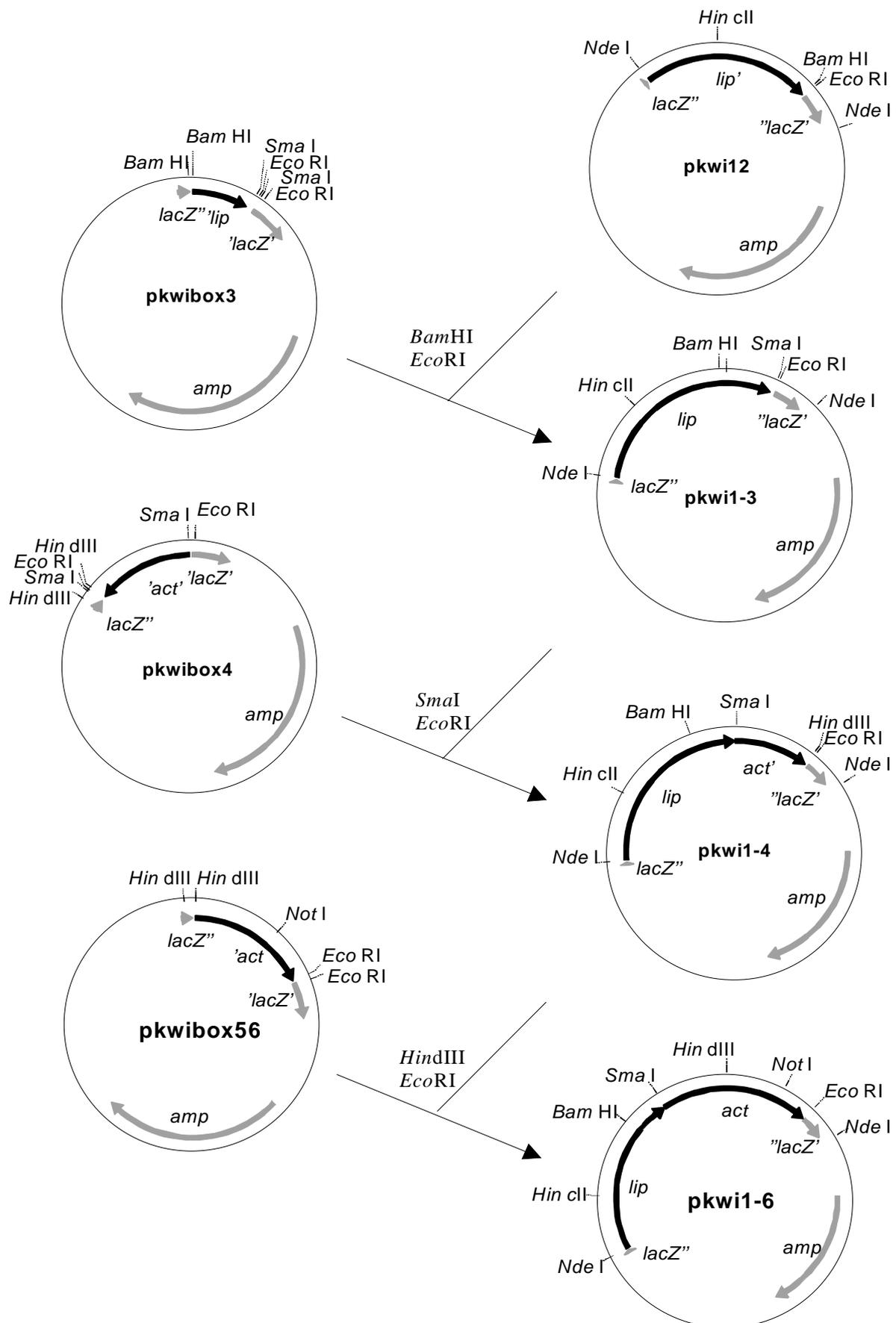


Abbildung 3.1.4 B: Zusammensetzen der Genboxen für die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 und ihr Helferprotein.

3.1.2 Expression der Lipase und des Helferproteins aus *Pseudomonas species* KWI 56 in *E. coli*

3.1.2.1 Klonierung des Gens für die Lipase

Für die Expression des synthetischen Gens für die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 in *E. coli* wurden verschiedene Expressionskonstrukte untersucht. Zwei verschiedene *E. coli*-Expressionssysteme fanden hierbei Verwendung: (1) Das λ -Expressionssystem, das auf dem hitzeinduzierbaren P_{RPL} -Promotor auf dem Plasmid pCYTEXP1 basiert und (2) das T₇-Expressionssystem. Im T₇-Expressionssystem wird die Expression, die unter der Kontrolle des T₇-Promotors auf dem Plasmid pET20b(+) erfolgt, durch die Induktion (durch IPTG) der Expression der im Genom des *E. coli* Stammes BL21(DE3) codierten T₇-Polymerase vermittelt.

3.1.2.1.1 Klonierung in pCYTEXP1

Alle Konstrukte für die Expression der Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 in *E. coli*, denen der Expressionsvektor pCYTEXP1 zugrunde liegt, sind in Abb. 3.1.5 schematisch dargestellt. Zunächst wurde die komplette synthetisierte Genkassette, die das Gen für die Lipase mit ihrer natürlichen Signalsequenz (*lip*) und das Gen für ihr Helferprotein (*act*) enthält, über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Eco*RI direkt unter die Kontrolle des P_L -Promotors im Plasmid pCYTEXP1 kloniert (pKWILipAct).

Da in *Pseudomonas species* bei der Prozessierung der Lipase zum reifen Protein die Signalsequenz (natural leader), die aus den ersten 44 Aminosäuren besteht, abgespalten wird, wurden zur Konstruktion des Plasmids pKWIrLipAct die Gene für die reife Lipase (*rlip*) und das Helferprotein (*act*) mit PCR amplifiziert. Hierbei wurde am Start des Gens für die reife Lipase eine *Nde*I-Schnittstelle eingefügt, über die, zusammen mit der *Eco*RI-Schnittstelle am Ende von *act*, das Fragment in pCYTEXP1 kloniert werden konnte.

Um die Expressionsrate zu steigern und den Transport der Lipase ins Periplasma von *E. coli* zu ermöglichen, wurde in einem weiteren Konstrukt (pKWImpArLipAct) die natürliche Signalsequenz der Lipase durch die *ompA*-Signalsequenz (Inouye *et al.*, 1980; Movva *et al.*, 1980) ersetzt. Mit Hilfe rekombinanter PCR wurde das Gen für die *ompA*-Signalsequenz in Frame vor *rlip* plaziert. Das fusionierte Gen wurde dann über die bei der PCR eingefügten Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Eco*RI in pCYTEXP1 kloniert.

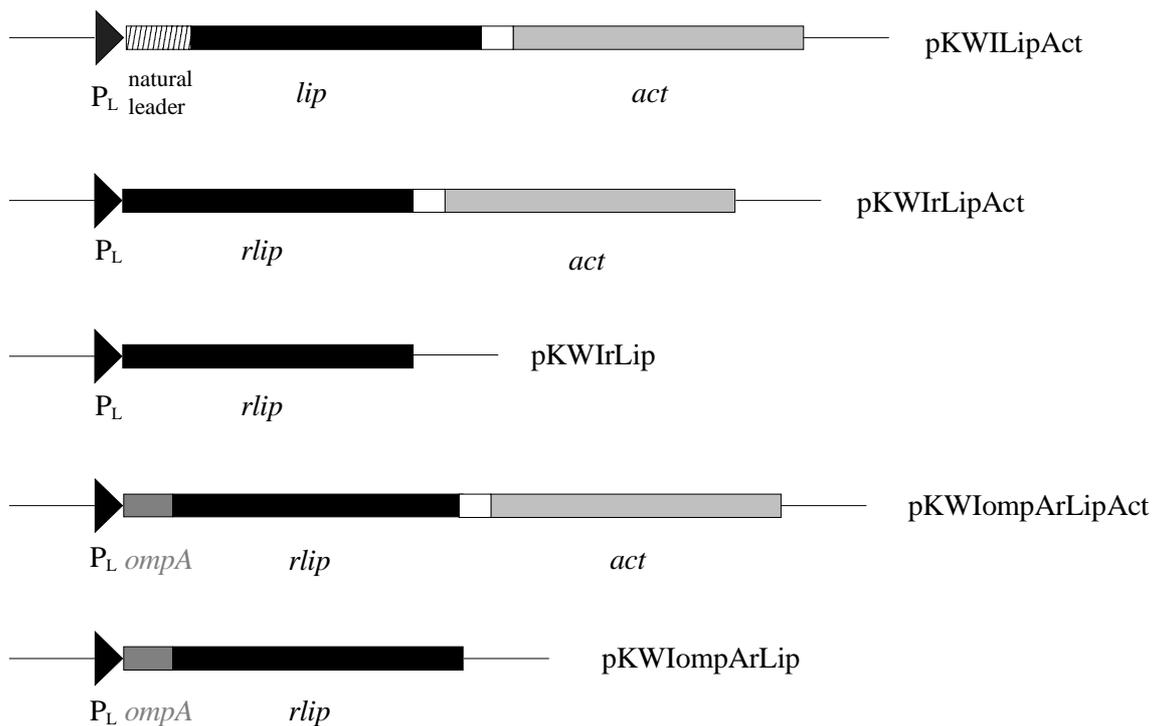


Abbildung 3.1.5: Expressionskonstrukte für die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 in pCYTEXP1.

Da sich bei den im folgenden Kapitel beschriebenen Expressionsexperimenten zeigte, daß trotz der eingeführten Shine-Dalgarno-Sequenz vor dem Stop-Codon von *lip* im optimalen Abstand zum Start von *act* keine in der SDS-PAGE detektierbare Expression des Helferproteins erfolgte, wurden zwei weitere Plasmide, pKWIrLip und pKWImpALip konstruiert. pKWIrLip enthält nur das Gen für die reife Lipase unter der Kontrolle des P_L -Promotors von pCYTEXP1, pKWImpALip trägt das Gen für die reife Lipase mit *ompA* fusioniert. Für die Konstruktion der beiden Plasmide wurden die Gene *rlip* bzw. *ompArlip* mit PCR aus den Plasmiden pKWIrLip bzw. pKWImpALipAct amplifiziert und hierbei an das 3' Ende des Lipase-Gens eine *EcoRI*-Site eingeführt. Die beiden so erhaltenen PCR-Fragmente konnten anschließend über die Schnittstellen *NdeI* und *EcoRI* in pCYTEXP1 eingeführt werden.

3.1.2.1.2 Klonierung in pET20b(+)

Um höhere Expressionsraten der reifen Lipase ohne Signalsequenz zu erhalten, wurde das Gen für die reife Lipase aus dem Plasmid pKWIrLip mit *NdeI* und *EcoRI* herausgeschnitten

und über dieselben Schnittstellen in den Vektor pET20b(+) unter die Kontrolle des T₇-Promotors kloniert. Das so erhaltene Plasmid wurde mit pETKWIrLip bezeichnet (Abb. 3.1.6).



Abbildung 3.1.6: Expressionskonstrukt für die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 in pET20b(+).

Alle für die rekombinante Expression der Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 verwendeten Plasmide wurden mittels DNA-Sequenzierung auf die Richtigkeit ihrer DNA-Sequenz überprüft.

3.1.2.2 Klonierung des Gens für das Helferprotein

Die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 benötigt zur korrekten Faltung ein spezifisches Helferprotein (Act). Da dieses mit den im vorigen Kapitel beschriebenen Expressionskonstrukten, in denen das Gen für das Helferprotein ohne eigenen Promotor downstream des Lipase-Gens lokalisiert war, in *E. coli* nicht überexprimiert werden konnte (s. folgendes Kapitel 3.1.2.3), wurden verschiedene Konstrukte zur Überexpression des Helferproteins selbst untersucht. Auch hier wurden sowohl das λ -Expressionssystem als auch das T₇-Expressionssystem verwendet.

3.1.2.2.1 Klonierung in pCYTEXP1

Für die Expression des Helferproteins aus *Pseudomonas species* KWI 56 in *E. coli* wurden verschiedene Konstrukte im Vektor pCYTEXP1 untersucht (Abb. 3.1.7.). Zur Konstruktion von Plasmid pKWIAct wurde das Gen für das Helferprotein (*act*) mit PCR aus Plasmid pkwi1-6 amplifiziert. Mit Hilfe der hierbei vor dem Startcodon von *act* eingeführten *Nde*I-Restriktionsschnittstelle und der *Eco*RI-Schnittstelle am 5' Ende von *act* wurde das PCR-Fragment in den Vektor pCYTEXP1 kloniert.

Hydrophobizitätsplots nach der Methode von Eisenberg *et al.* (1984) offenbarten 2 sehr hydrophobe Bereiche innerhalb der ersten 70 Aminosäuren der Sequenz des Helferproteins.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden der Strukturanalyse anderer Helferproteine aus *Pseudomonas* überein (Frenken *et al.*, 1993a; Ihara *et al.*, 1995; Quyen *et al.*, 1999; Shibata *et al.*, 1998b). Vermutlich stellen diese Sequenzen einen Membrananker dar, der für die Funktion des Helferproteins nicht erforderlich ist, in *Pseudomonas* jedoch verhindert, daß das Helferprotein zusammen mit der Lipase ins Medium sekretiert wird (El Khattabi *et al.*, 1999). Daher wurden zur Konstruktion des Expressionsplasmids pKWId70Act die ersten 210 bp des Gens für das Helferprotein (*act*) mittels PCR deletiert und das Fragment *d70act* über die bei der PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI* in pCYTEXP1 inseriert. Zur Erhöhung der Expressionsrate und zur Translokation des Helferproteins in das Periplasma von *E. coli*, wurden sowohl *act* als auch *d70act* über rekombinante PCR mit dem Gen für die Signalsequenz *ompA* fusioniert. Beide Gene wurden über die bei der PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI* in pCYTEXP1 kloniert. Die so entstanden Plasmide wurden pKWIompAAct bzw. pKWIompAd70Act genannt.

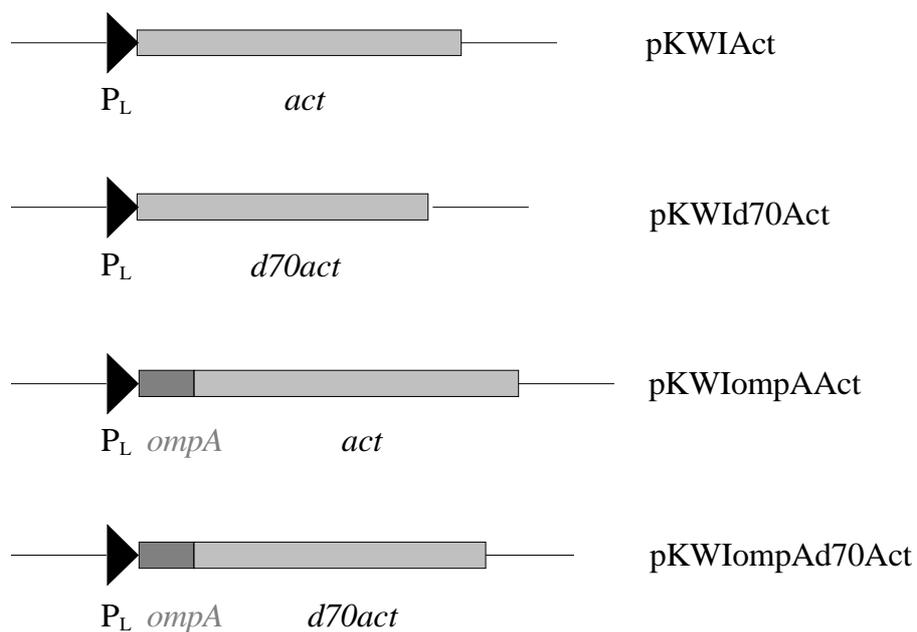


Abbildung 3.1.7: Expressionskonstrukte für das Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 in pCYTEXP1.

3.1.2.2.2 Klonierung in pET20b(+)

Zur Erhöhung der Expressionsraten wurden die Gene für das komplette (*act*) und das verkürzte Helferprotein (*d70act*) aus *Pseudomonas species* KWI 56 unter die Kontrolle des starken, IPTG-induzierbaren T7-Promotors auf dem Plasmid pET20b(+) gestellt (Abb. 3.1.8).

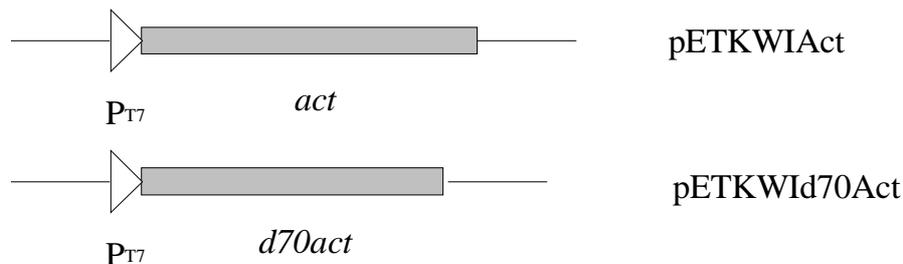


Abbildung 3.1.8: Expressionskonstrukte für das Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 in pET20b(+).

Hierzu wurden die beiden Gene jeweils mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Eco*RI aus den Plasmiden pKWIAct bzw. pKWId70Act herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Nde*I und *Eco*RI verdauten Vektor pET20b(+) ligiert. Die so erhaltenen Expressionskonstrukte wurden als pETKWIAct bzw. pETKWId70Act bezeichnet.

Alle für die rekombinante Expression des Helferproteins aus *Pseudomonas species* KWI 56 verwendeten Plasmide wurden mittels DNA-Sequenzierung auf die Richtigkeit ihrer DNA-Sequenz überprüft.

3.1.2.3 Expression

Die Expression der Lipase und des Helferproteins aus *Pseudomonas species* KWI 56 erfolgte mit den in den vorigen Kapiteln beschriebenen Plasmiden. Bei Expressionskonstrukten, die auf dem Vektor pCYTEXP1 basieren, wurde *E. coli* DH5 α als Wirtstamm verwendet, wenn die Expressionskonstrukte auf dem Vektor pET20b(+) basierten, mußte *E. coli* BL21(DE3) als Wirtstamm verwendet werden (vergl. Kapitel 2.5.3). Die Induktion der rekombinanten Expression in *E. coli* erfolgte jeweils über 4 h. Die Expression wurde mittels SDS-PAGE der Gesamtzellproteine untersucht.

3.1.2.3.1 Expression der Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56

Für die Expression der Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 in *E. coli* wurden zunächst die Klone, in denen das Gen für die Lipase unter der Kontrolle des hitzeinduzierbaren P_L -Promotors steht, untersucht (Abb. 3.1.9). Als Kontrolle diente der Wirtstamm DH5 α mit dem verwendeten Vektor pCYTEXP1 ohne Insert (Spur 2), sowie eine nicht induzierte Kultur (Spur 1). Bei den Versuchen, die Lipase mit ihrer natürlichen Signalsequenz (pKWILipAct, Spur 3) oder ohne Signalsequenz (pKWIrLipAct, Spur 4 und pKWIrLip, Spur 5) zu exprimieren, konnte 4 h nach Induktion keine zusätzliche Bande auf dem SDS-Gel detektiert werden. Nach der Fusion des Gens für die reife Lipase mit der ompA-Signalsequenz in den Vektoren pKWIompArLipAct und pKWIompArLip konnten Expressionsraten der reifen Lipase von bis zu 60 % Gesamtzellprotein erreicht werden (Abb. 3.1.9, Spuren 6 und 7). Das für die reife Lipase erwartete Molekulargewicht liegt bei 33,2 kDa, die im SDS-Gel detektierte Bande scheint jedoch größer zu sein. Dies deutet darauf hin, daß die Signalsequenz OmpA vermutlich nicht abgespalten wurde, die Lipase also nicht ins Periplasma von *E. coli* transportiert und dabei prozessiert wurde.

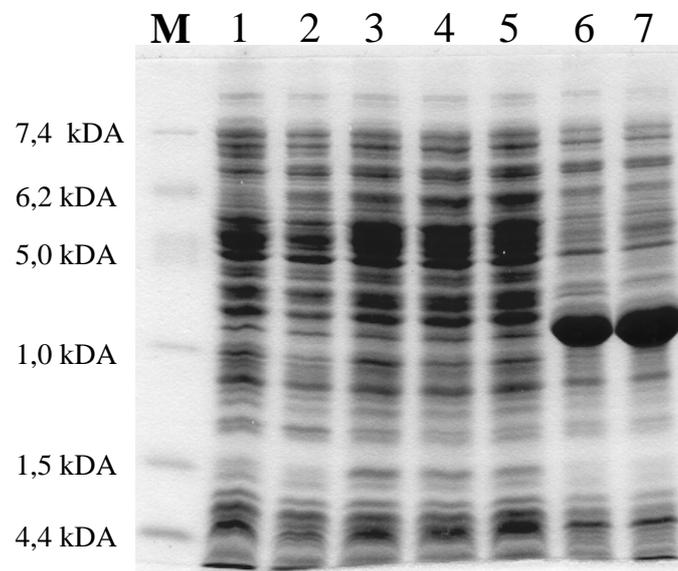


Abbildung 3.1.9: SDS-PAGE der Expression der rekombinanten *Pseudomonas species* KWI 56 Lipase in *E. coli* DH5 α unter der Kontrolle des P_L -Promotors. Die Proteine wurden mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt. Spuren: (M) LMW-Standard, Zellysat von *E. coli* DH5 α mit (1) pKWIompArLip nicht induziert, (2) pCYTEXP1, (3) pKWILipAct, (4) pKWIrLipAct, (5) pKWIrLip, (6) pKWIompArLipAct, (7) pKWIompArLip.

Mit dem Expressionskonstrukt pETKWIrLip konnten unter der Kontrolle des starken T₇-Promotors für die reife Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 ohne Signalsequenz Expressionsraten von 50 % in *E. coli* BL21(DE3) erreicht werden (Abbildung 3.1.10, Spur 2).

Die in *E. coli* überexprimierten Lipasen OmpArLip und rLip lagen beide nahezu inaktiv in *E. coli* vor und bildeten unter dem Mikroskop deutlich sichtbare Inclusion-Bodies. Im Überstand des Zellaufschlusses konnten Aktivitäten von lediglich 0,23 U/ml bzw. 0,21 U/ml gemessen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erwartungen überein. In der Literatur wurde mehrfach gezeigt, daß die Lipasen der Klassen I und II aus *Pseudomonas* für die korrekte Faltung in ihre aktive Form ein spezifisches Helferprotein benötigen (Frenken *et al.*, 1993a; Frenken *et al.*, 1993b; Hobson *et al.*, 1993; Ihara *et al.*, 1992; Iizumi & Fukase, 1994a).

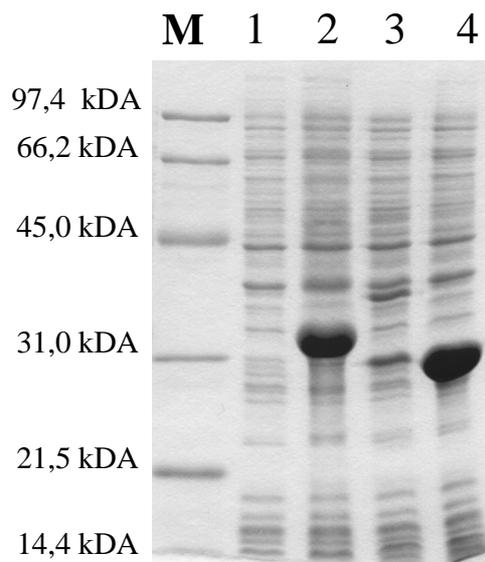


Abbildung 3.1.10: SDS-PAGE-Analyse der Expression der rekombinanten *Pseudomonas species* KWI 56 Lipase und ihres Helferproteins in *E. coli* BL21(DE3). Die Proteine wurden mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt. Spuren: (M) LMW-Standard, Zellysate von *E. coli* BL21(DE3) mit (1) pET20b(+) (2) pETKWIrLip, (3) pETKWIAct, (4) pETKWId70Act.

3.1.2.3.2 Expression des Helferproteins aus *Pseudomonas species* KWI 56

Da mit keinem der beiden Expressionskonstrukte (pKWIrLipAct und pKWIoMpArLipAct), in denen das Gen für das Helferprotein direkt downstream von *lip* lokalisiert war, nach SDS-PAGE die Expression des 36,5 kDa großen Helferproteins detektiert werden konnte, wurden Plasmide zur getrennten Expression des Helferproteins konstruiert. Das komplette Helferprotein konnte in pCYTEXP1 weder mit (Abb. 3.1.11, Spur 5) noch ohne die OmpA

Signalsequenz (Abb. 3.1.11, Spur 3) in *E. coli* überexprimiert werden. Auch unter der Kontrolle des T₇-Promotors in pETKWIAct waren für das komplette Helferprotein nur Expressionraten bis max. 5 % des Gesamtzellproteins zu erreichen (Abb. 3.1.10, Spur 3). Bei der Expression des gekürzten Helferproteins (d70Act) konnten mit dem Plasmid pKWId70Act Ausbeuten von 5-10 % des Gesamtzellproteins in *E. coli* erreicht werden (Abb. 3.1.11, Spur 4). Das Expressionsplasmid pKWIompAd70Act, das eine Fusion des gekürzten Helferproteins mit *ompA* im Plasmid pCYTEXP1 trägt, und pETd70Act, ein pET20b(+)-Derivat mit dem verkürzten Gen für das Helferprotein, führten zu Expressionraten von jeweils über 50 % des Gesamtzellproteins (Abb. 3.1.11, Spur 6 und Abb. 3.1.10, Spur 4). Die im SDS-Gel detektierte Bande von OmpAd70Act ist größer als die Bande von d70Act, die Signalsequenz *OmpA* wurde von OmpAd70Act also nicht abgespalten.

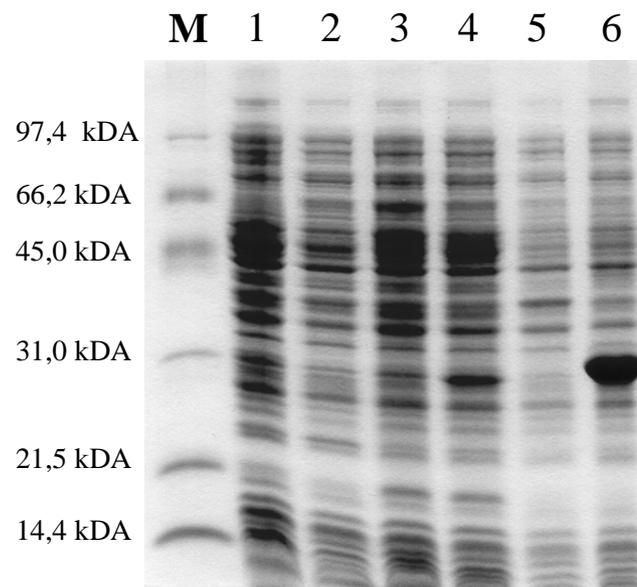


Abbildung 3.1.11: SDS-PAGE-Analyse der Expression des rekombinanten *Pseudomonas species* KWI 56 Helferproteins in *E. coli* DH5 α . Die Proteine wurden mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt. Spuren: (M) LMW-Marker, Zellysate von *E. coli* DH5 α mit (1) pKWIompAd70Act nicht induziert, (2) pCYTEXP1, (3) pKWIAct, (4) pKWId70Act, (5) pKWIompAAct, (6) pKWIompAd70Act.

3.1.3 N-terminale Aminosäuresequenzen von OmpArLip und rLip

Die ersten 31 bzw. 14 N-terminalen Aminosäuren der rekombinant in *E. coli* exprimierten reifen Lipase fusioniert mit ompA (OmpArLip) bzw. reifen Lipase (rLip) wurden mit der N-terminalen Aminosäure-Sequenzierung nach Edman (1950) bestimmt (Abb. 3.1.12 und 3.1.13).

Die bei der Sequenzierung von OmpArLip erhaltene Aminosäuresequenz (Abb. 3.1.12) ist identisch mit der Sequenz des Signalpeptids OmpA gefolgt von der N-terminalen Aminosäuresequenz der reifen Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56. Die N-terminale Sequenz des exprimierten Fusionsproteins hat also die korrekte Sequenz, das Signalpeptid OmpA wird jedoch nicht abgespalten. Dies läßt den Schluß zu, daß die in Inclusion-Bodies akkumulierte Lipase nicht ins Periplasma von *E. coli* transportiert und dabei prozessiert wird, sondern im Cytoplasma von *E. coli* verbleibt.

Mit der N-terminalen Aminosäure-Sequenzierung der reifen Lipase ohne Signalpeptid (rLip) konnte die Richtigkeit der erwarteten N-terminalen Sequenz bestätigt werden (Abb. 3.1.13).

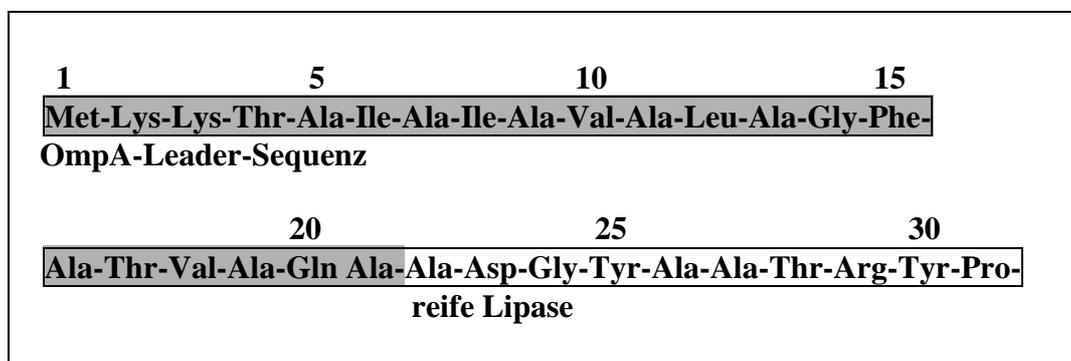


Abbildung 3.1.12: N-terminale Sequenzierung von OmpArLip.

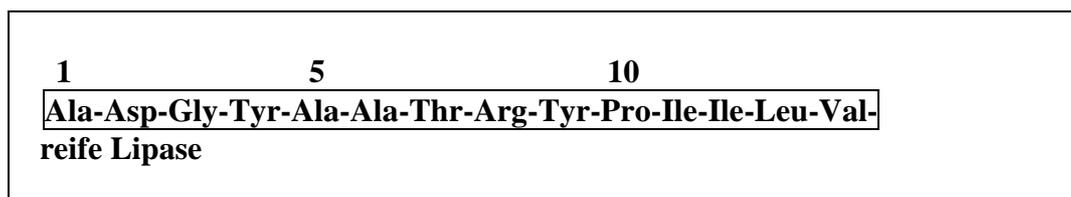


Abbildung 3.1.13: N-terminale Sequenzierung von rLip.

3.1.4 *In-vitro*-Refolding der Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56

3.1.4.1 Schnell-Refolding

Um die inaktiv in *E. coli* exprimierte Lipase mit Hilfe ihres spezifischen rekombinanten Helferproteins in ihre aktive Form falten zu können, wurde ein schnelles und effektives *In-vitro*-Refolding entwickelt (Abb. 3.1.14). *E. coli* Zellen, die rekombinant überexprimierte Lipase enthalten, und *E. coli* Zellen, die rekombinant überexprimiertes Helferprotein enthalten, wurden jeweils mit 8 M Harnstoff aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Die im Überstand befindliche denaturierte Lipase konnte direkt zum Refolding mit dem ebenfalls im Überstand denaturierten Helferprotein eingesetzt werden. Das

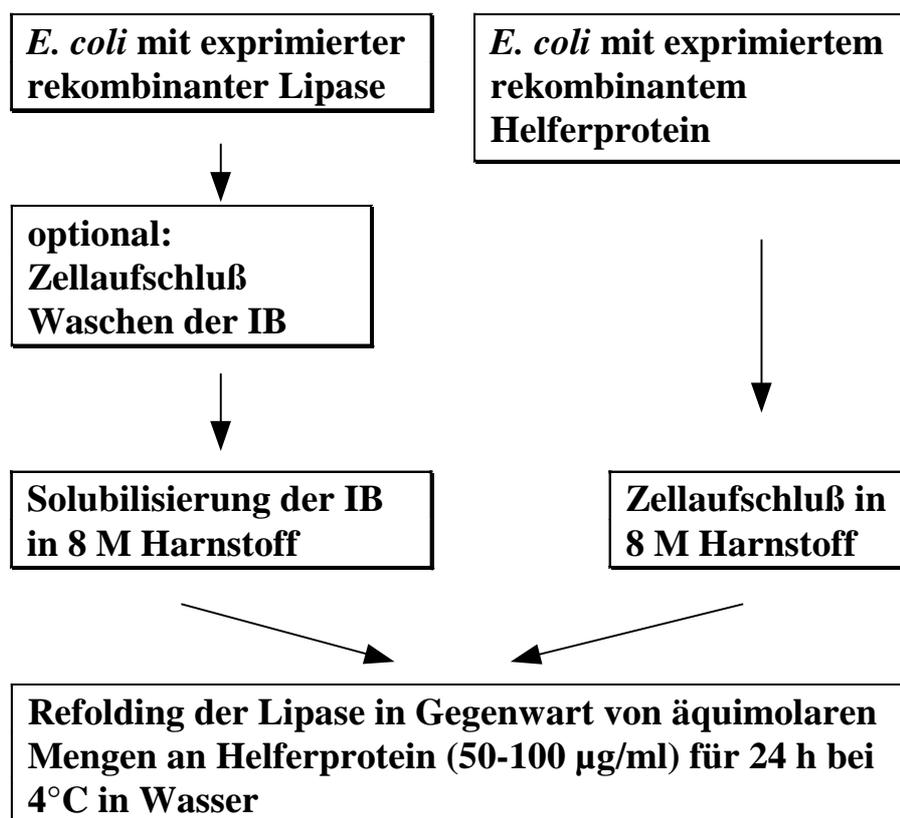


Abbildung 3.1.14: Schnelles und effektives *In-vitro*-Refolding der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56. „Inclusion Bodies“ wurde mit „IB“ abgekürzt.

Refolding erfolgte für 24 h bei 4°C in Wasser, wobei jeweils äquimolare Mengen an Lipase und Helfer in einer Endkonzentration von ca. 50 bis 100 µg/ml eingesetzt wurden (vergl. Kapitel 2.8.5). Die Mengen an Lipase und Helferprotein wurden aus Coomassie-gefärbten SDS-Gelen abgeschätzt. Für die rekombinant in *E. coli* exprimierte Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 konnten mit diesem schnellen und sehr effizienten *In-vitro*-Refolding Ausbeuten von 310 000 U/g Zellen (Substrat: Triolein) erreicht werden (Tab. 3.1.4).

Tabelle 3.1.4: Ausbeute der rekombinant in *E. coli* exprimierten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 nach *In-vitro*-Refolding. Die Aktivität der Lipase wurde im pH-Stat-Assay mit verschiedenen Substraten bestimmt.

Substrat	Ausbeute in [U/g Zellnaßgewicht]
Tributyryn (C4)	200 000 U/g
Tricaprylin (C8)	370 000 U/g
Trimyristin (C14)	420 000 U/g
Triolein (C18)	310 000 U/g

3.1.4.2 Aufschlußmethoden

Um zu überprüfen, ob verschiedene Zellaufschluß-Methoden einen Einfluß auf die Effektivität des Refoldings haben, wurden *E. coli* Zellen, die die reife Lipase (pETKWIrLip) bzw. gekürztes Helferprotein fusioniert mit ompA (pKWIOMpAd70Act) exprimierten sowohl mit Harnstoff als auch mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach dem Harnstoff-Aufschluß lagen sowohl Lipase als auch Helferprotein denaturiert in Lösung vor (Lip H bzw. OmpAd70Act H). Nach Ultraschall-Aufschluß lag das Helferprotein in Lösung nativ im Überstand vor (OmpAd70Act U), während die Lipase, die in *E. coli* in Form von Inclusion-Bodies aggregiert, unlöslich im Pellet vorlag. Die Inclusion-Bodies konnten durch mehrmaliges Waschen gereinigt werden und in einem weiteren Schritt mit 8 M Harnstoff solubilisiert werden, die Lipase lag dann gereinigt und denaturiert in Lösung vor (Lip UH).

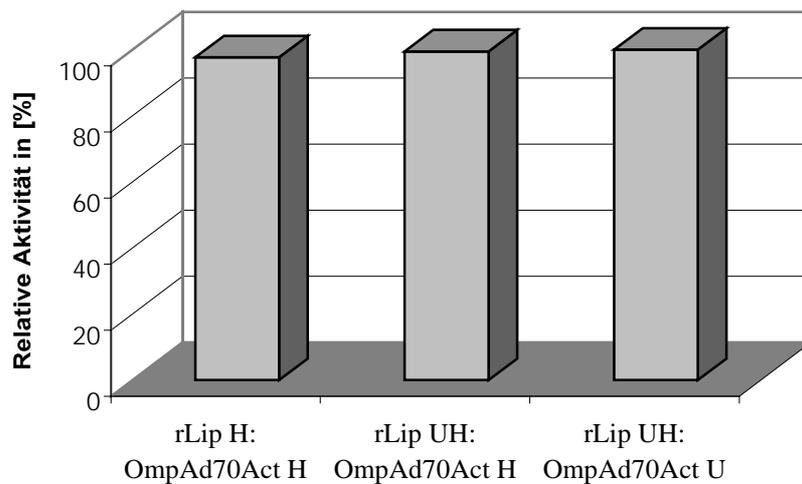


Abbildung 3.1.15: Einfluß der Aufschlußmethode auf die Aktivität der rekombinanten *Pseudomonas species* KWI 56 Lipase nach dem *In-vitro*-Refolding. Denaturierte Lipase (rLip H oder rLip UH) wurde unter Einsatz des denaturierten Helferproteins (OmpAd70Act H) und des nativen Helferproteins (OmpAd70Act U) *in vitro* rekonstituiert. Die nach dem Refolding gewonnene Aktivität wurde mit dem pNPP-Assay bestimmt und ist in [%] angegeben. Die nach dem Refolding von rLip H mit OmpAd70Act H gewonnene Aktivität wurde als 100 % gewählt.

Sowohl natives, als auch denaturiertes Helferprotein wurde zum Refolding der denaturierten gereinigten oder ungereinigten Lipase eingesetzt (Abb. 3.1.15). Auf die nach dem Refolding erreichte Aktivität hat der Reinigungsgrad der Lipase keinen Einfluß, Refolding der denaturierten ungereinigten Lipase (Lip H) führte zu gleicher Aktivität wie das Refolding der gereinigten und denaturierten Lipase (Lip UH). Das Helferprotein kann sowohl im nativen (OmpAd70Act U) als auch im denaturierten (OmpAd70Act H) Zustand zum effektiven Refolding der Lipase eingesetzt werden.

3.1.4.3 Reinigung der Inclusion-Bodies und Bestimmung der spezifischen Aktivität

Da die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 in *E. coli* in Inclusion-Bodies aggregiert, kann die Lipase relativ einfach gereinigt werden. Die nach dem Zellaufschluß gewonnenen Inclusion-Bodies konnten mit Hilfe verschiedener Waschschriffe gereinigt und anschließend durch Einsatz von 8 M Harnstoffpuffer solubilisiert werden (vgl. Kapitel 2.8.2.2). Mittels

SDS-PAGE wurde der Aufschluß analysiert (Abb. 3.1.21). Die Lipase liegt nahezu rein im Harnstoffüberstand vor, auf dem SDS-Gel sind kaum andere Proteine detektierbar.

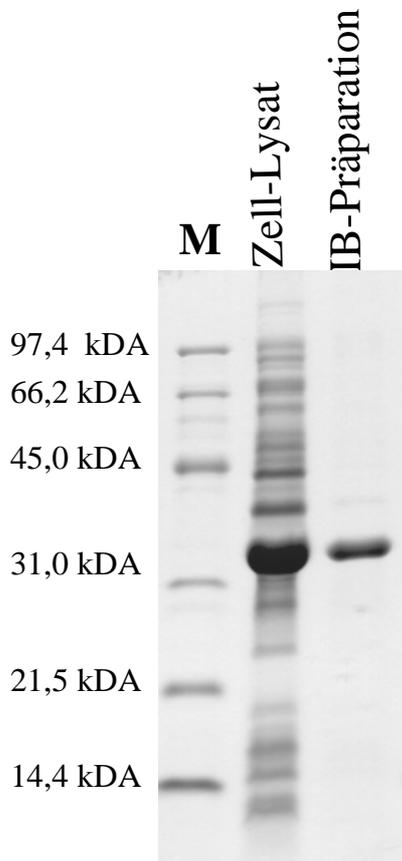


Abbildung 3.1.21: SDS-PAGE nach Reinigung und Solubilisierung von Inclusion-Bodies der rekombinanten *Pseudomonas species* KWI Lipase. Die Proteine wurden mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt.

Die so gereinigte Lipase wurde ebenfalls dem *In-vitro*-Refolding mit ihrem spezifischen Helferprotein unterzogen. Es konnte eine spezifische Aktivität der gereinigten Lipase von 3900 U/mg im Refolding eingesetzter Lipase (Substrat: Triolein) erreicht werden. Die Ausbeute bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Zellmasse beträgt 310 000 U/g Zellen. Dieser Wert ist gleich der Ausbeute beim Refolding der Lipase aus dem Gesamtzellextrakt (310 000 U/g Zellen), bei der Aufreinigung traten also keine Verluste auf.

3.1.4.4 Verschiedene Expressionskonstrukte im Refolding

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Expressionskonstrukte für die Lipase und deren Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56, die erfolgreich in *E. coli* überexprimiert

werden konnten, Einfluß auf die Effektivität des Refoldings und die Aktivität der Lipase haben, wurden verschiedene Expressionskonstrukte im Refolding verwendet. Für die Lipase kamen Zellen mit den Plasmiden pKWIOmpArLip, pKWIOmpArLipAct und pETKWIrLip zum Einsatz, für das Helferprotein wurden Zellen mit den Expressionsplasmiden pKWIOmpAd70Act und pETKWId70Act verwendet. Vor dem Refolding wurden alle Zellen mit Harnstoff aufgeschlossen. In Abb. 3.1.16 sind die nach dem Refolding erreichten Aktivitäten in [%] angegeben. Es konnte gezeigt werden, daß die mit ompA fusionierte Lipase (OmpArLip) nach Rückfaltung nur zu etwa 10 % der Aktivität der reifen Lipase ohne Signalsequenz (rLip) führt. Offensichtlich verhindert die ompA-Signalsequenz, die nicht abgespalten wird, effektives Refolding. Dabei spielt es keine Rolle, ob während der Expression der Lipase schon geringe Mengen an Helferprotein in der Zelle vorhanden (OmpArLipAct) sind oder nicht (OmpArLip). Auch ein Refolding der Lipase ohne Helferprotein führt nur zu etwa 5 bis 10 % der Aktivität, die mit Helferprotein erreicht wird.

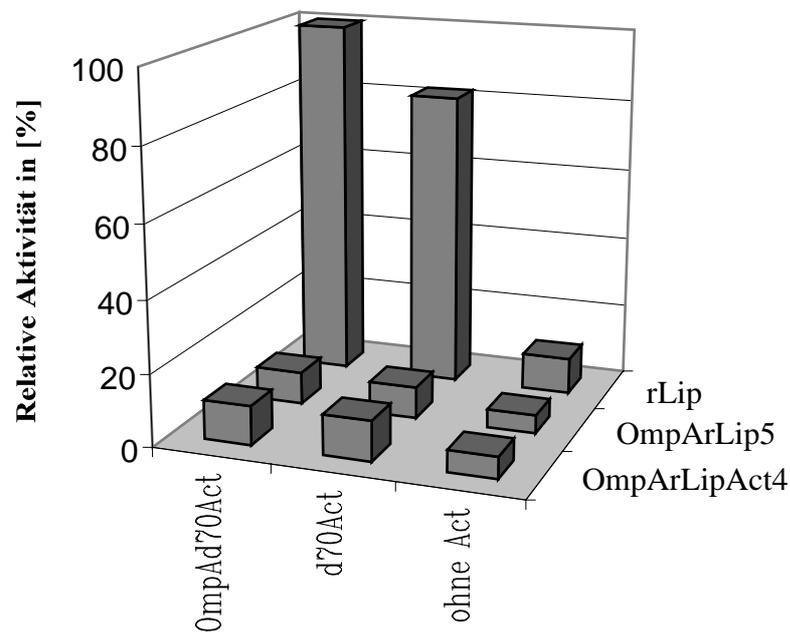


Abbildung 3.1.16: Verschiedene Expressionskonstrukte der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 im *in-vitro*-Refolding. Die Abbildung zeigt die im pNPP-Assay bestimmte Aktivität in [%] der verschiedenen Lipase-Konstrukte nach dem Refolding mit Helferprotein mit und ohne die Signalsequenz OmpA und ohne Helferprotein. Die Aktivität, die nach dem Refolding von rLip mit OmpAd70Act erreicht wurde, ist mit 100 % angegeben.

Die in der Literatur beschriebene Erfordernis des Helferproteins für die korrekte Faltung der Lipase in ihre aktive Form konnte also bestätigt werden.

Refolding von rLip mit dem gekürzten Helferprotein mit ompA-Signalsequenz (ompAd70Act) führte zu etwa 20 % höherer Aktivität als Refolding mit gekürztem Helferprotein (d70Act). Während die ompA Signalsequenz an der Lipase effektives *In-vitro*-Refolding der Lipase verhindert, stört die ompA Signalsequenz am gekürzten Helferprotein den Refoldingprozeß nicht.

3.1.4.5 Einfluß verschiedener Puffer auf das *In-vitro*-Refolding

Das *In-vitro* Refolding der Lipase wurde bisher in H₂O durchgeführt. Durch Einsatz verschiedener Puffer und Salze im Refolding wurde untersucht, ob eine Zunahme der Lipase-Aktivität erreicht werden kann. Die Durchführung erfolgte mit rLip H und OmpAd70Act H (Abb. 3.1.17). Nach 20 h und 11 Tagen *In-vitro*-Refolding bei 4°C wurde jeweils die Aktivität im Refoldingansatz bestimmt. Es konnte festgestellt werden, daß der Einsatz von Puffer gegenüber purem H₂O keinen Vorteil bietet. Auch der pH-Wert des Puffers scheint keinen Einfluß auf die Effektivität des Refoldings zu haben. Die Zugabe von Salzen, wie NaCl und CaCl₂, verschlechtert die Ausbeute an Aktivität. Während die Zugabe von EDTA das Refolding nicht beeinflusst, scheint die Zugabe von Glycerin einen positiven Effekt auf die Aktivität der Lipase zu haben. Dieser Effekt ist jedoch eher gering und wiegt die mit dem Einsatz von Glycerin verbundenen Probleme bei der Konzentration oder Gefriertrocknung der Lipase nicht auf. Daher wurde in allen weiteren Experimenten nach wie vor H₂O als Refoldinglösung verwendet.

Aus den Messungen nach 20 h und 11 Tagen Refolding wird ersichtlich, daß die erreichte Aktivität mit der Dauer des Refoldings generell eher steigt. Daher wurde im folgenden der Verlauf der Rückfaltung der Lipase untersucht.

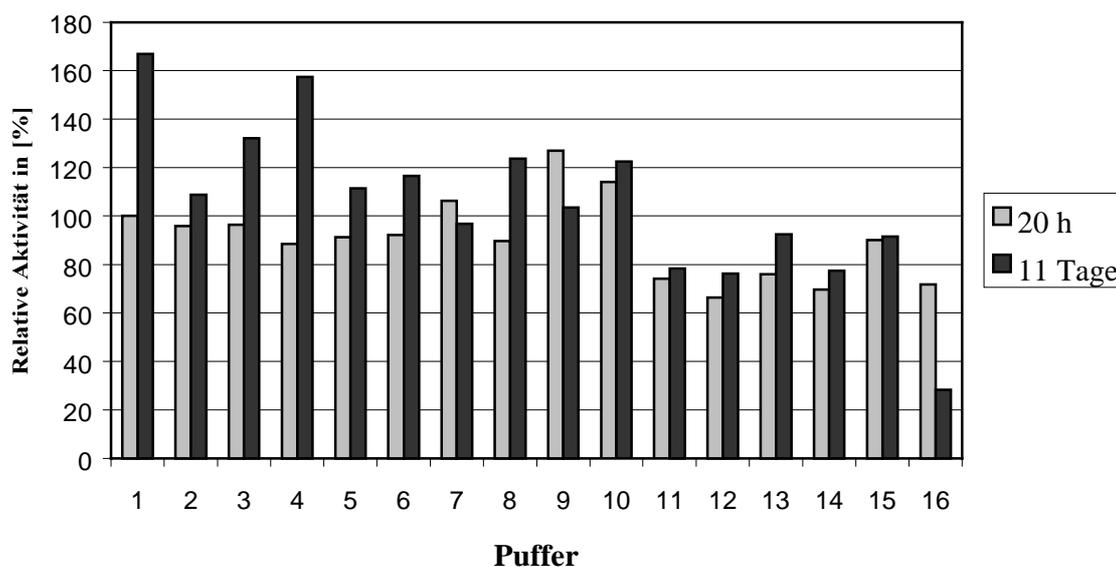


Abbildung 3.1.17: Einfluß der Puffer auf das *In-vitro*-Refolding der rekombinanten *Pseudomonas species* KWI 56 Lipase. Die nach dem Refolding im pNPP-Assay bestimmte Aktivität ist in [%] angegeben, die Aktivität nach 20 h Refolding in H₂O wurde als 100 % angenommen. Zusammensetzung der Puffer: Puffer 1: H₂O; Puffer 2: 50 mM Tris/HCl, pH 6; Puffer 3: 50 mM Tris/HCl, pH 7; Puffer 4: 50 mM Tris/HCl, pH 8; Puffer 5: 50 mM Tris/HCl, pH 9; Puffer 6: 50 mM Tris/HCl, pH 7, 1 mM EDTA; Puffer 7: 50 mM Tris/HCl, pH 7, 5% Glycerin; Puffer 8: 50 mM Tris/HCl, pH 7, pH 8, 5% Glycerin; Puffer 9: 50 mM Tris/HCl, pH 7, pH 7, 10% Glycerin; Puffer 10: 50 mM Tris/HCl, pH 7, pH 8, 10% Glycerin; Puffer 11: 50 mM Tris/HCl, pH 7, pH 8, 5% Glycerin, 10 mM NaCl₂; Puffer 12: 50 mM Tris/HCl, pH 7, pH 8, 10% Glycerin, 10 mM NaCl₂, 1 mM EDTA; Puffer 13: 50 mM Tris/HCl, pH 7, pH 8, 50 mM NaCl₂; Puffer 14: 50 mM Tris/HCl, pH 7, pH 8, 100 mM NaCl₂; Puffer 15: 50 mM Tris/HCl, pH 7, pH 7, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl₂; Puffer 16: 50 mM Tris/HCl, pH 7, pH 7, 10mM CaCl₂.

3.1.4.6 Kinetik des *In-vitro*-Refoldings

Um den Einfluß der Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur auf die Effektivität der Rückfaltung der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 zu untersuchen, wurde eine Refoldingkinetik bei 4°C und RT über einen Zeitraum von 5 Tagen aufgenommen (Abb. 3.1.18). Das Refolding erfolgte in H₂O unter den in Kapitel 2.8.4 angegebenen Standardbedingungen.

Die Rekonstitution der rekombinant in *E. coli* exprimierten Lipase in ihre aktive Form in Anwesenheit ihres Helferproteins folgt einer Sättigungskinetik. Die Lipaseaktivität steigt mit der Dauer des *In-vitro*-Refoldings stark an und erreicht nach etwa 24 h ein Plateau. Generell kann beim *In-vitro*-Refolding bei RT nur etwa 50 % der Aktivität der bei 4°C rückgefalteten Lipase erreicht werden.

Während die Lipase bei 4°C über mindestens 5 Tage in der Refolding-Lösung stabil bleibt, scheint die Aktivität der Lipase bei RT nach dem Erreichen Ihres Maximums wieder leicht zu sinken.

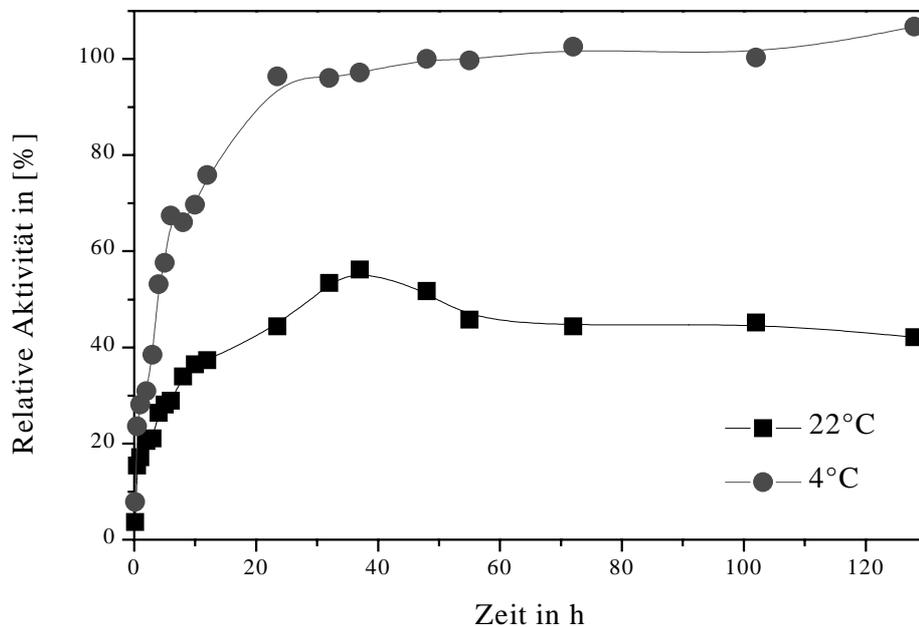


Abbildung 3.1.18: Kinetik des *In-vitro*-Refoldings der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 bei 4°C und bei RT. Die Aktivität der Lipase wurde im pNPP-Assay bestimmt und ist in [%] angegeben. Die nach 48 h *In-vitro*-Refolding bei 4°C erreichte Lipase-Aktivität wurde als 100 % angenommen.

3.1.4.7 Einfluß der Verdünnung im Refolding

Um zu überprüfen, ob die Konzentration der Lipase im Refolding-Ansatz einen Einfluß auf die Effizienz der Rückfaltung der rekombinant in *E. coli* exprimierten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 hat, wurde das *In-vitro*-Refolding mit verschiedenen Lipase-Konzentrationen durchgeführt. Die Konzentration des eingesetzten Helferproteins entsprach jeweils der Lipasekonzentration, so daß Lipase und Helferprotein immer im Verhältnis 1:1 im Refoldingansatz vorlagen. Einhergehend mit der Änderung der Lipasekonzentration ändert sich auch der Anteil an Harnstoff im Refoldingpuffer, da Lipase und Helferprotein in Harnstoff denaturiert vorliegen. Daher wurde in Abb. 3.1.19 die Menge an eingesetzter Lipase als Verdünnung der Lipase aus dem Überstand des Harnstoffaufschlusses angegeben. Die Konzentration der aus Inclusion-Bodies gereinigten Lipase im Harnstoffüberstand betrug 7,5 mg/ml. Bei der Standard-Verdünnung 1:100 im Refolding entspricht dies einer Lipase-Konzentration von 75 µg/ml im Refolding-Ansatz. Die beste Rückfaltungseffizienz der Lipase beim *In-vitro*-Refolding wurde mit Verdünnungen des Harnstoffaufschlusses von 1:100 und 1:250, also einer Lipase-Konzentration zwischen 30 und 75 µg/mg, erreicht. Bei

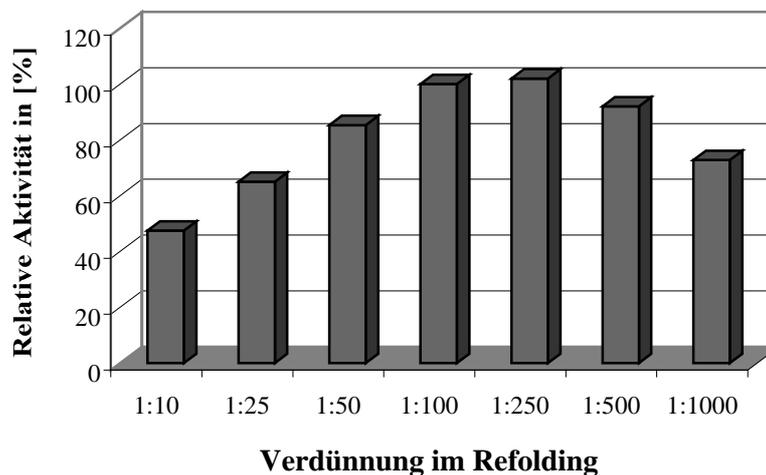


Abbildung 3.1.19: Einfluß der Konzentration der rekombinant in *E. coli* exprimierten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 im *In-vitro*-Refolding. Die Menge an eingesetzter Lipase im Refolding ist als Verdünnung der Lipase aus dem Überstand des Harnstoff-Aufschlusses angegeben. Die Menge des eingesetzten Helfers entspricht immer der Menge an eingesetzter Lipase. Die nach dem Refolding erreichte Aktivität der Lipase wurde mit dem pNPP-Assay bestimmt und ist in [%] angegeben. 100 % entsprechen der Aktivität, die bei einer 1:100 Verdünnung erreicht wurden.

höheren Konzentrationen sinkt die Ausbeute an aktiver Lipase. Bei geringeren Lipase-Konzentrationen, also größerer Verdünnung im Refolding, sinkt die Effizienz der Rückfaltung ebenfalls. Da kleinere Volumina für die Rekonstitution der Lipase erwünscht sind, wurde das *In-vitro*-Refolding der Lipase standardmäßig mit Lipase-Konzentrationen von 50 bis 75 µg/mg durchgeführt.

3.1.4.8 Verhältnis von Lipase und Helferprotein im *In-vitro*-Refolding

Zur Untersuchung des optimalen Mengenverhältnisses zwischen Lipase und Helferprotein im Refolding wurde unter Standardbedingungen die Konzentration des im Refolding-Ansatz eingesetzten Helferproteins variiert. Die Menge an eingesetzter Lipase war in allen Ansätzen dieselbe (75 µg/ml). Die Konzentration des Helferproteins im Harnstoffüberstand wurde aus dem Gesamtproteingehalt des Harnstoffüberstandes und dem Anteil rekombinanten Helferproteins aus dem Gesamtprotein über das SDS-Gel abgeschätzt. Das *In-vitro*-Refolding der in *E. coli* exprimierten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 ist beim Einsatz äquimolarer Mengen von Lipase und Helferprotein am effizientesten (Abb. 3.1.20). Eine Verdopplung oder Halbierung der Konzentration des Helferproteins führt zu etwa 20 % geringerer Ausbeute an Aktivität der Lipase.

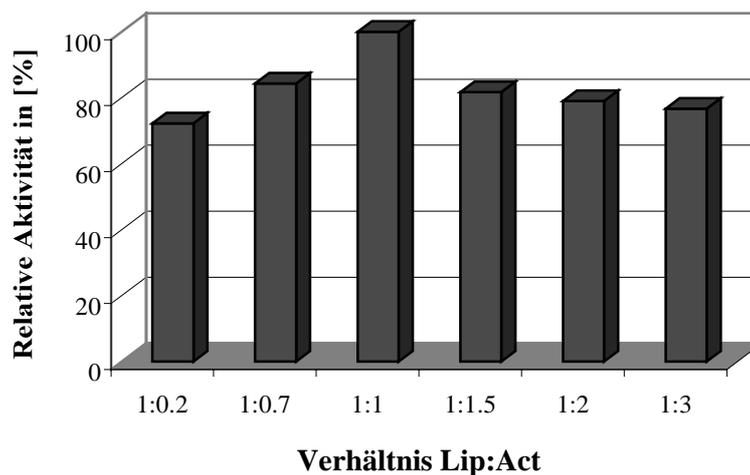
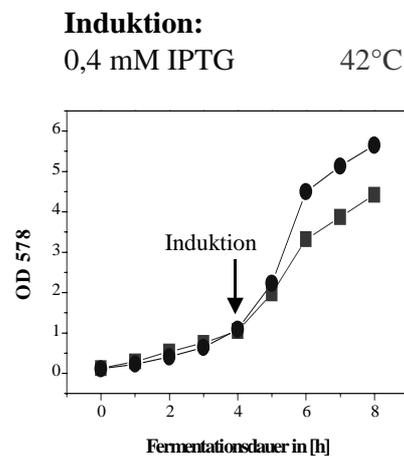
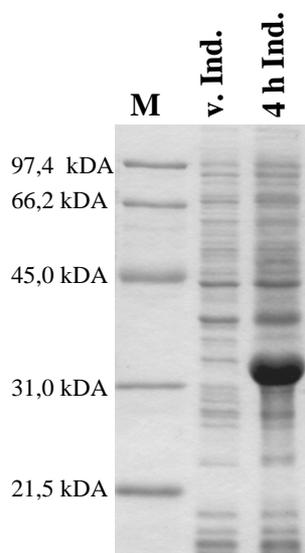


Abbildung 3.1.20: Einfluß des Verhältnisses von Lipase und Helferprotein im *In-vitro*-Refolding auf die Aktivität der rekombinanten *Pseudomonas species* KWI 56 Lipase. Die relative Aktivität der Lipase nach *In-Vitro*-Refolding wurde mit dem pNPP-Assay bestimmt und ist in [%] angegeben. 100 % entspricht der Aktivität, die nach dem Refolding mit Lipase und Helferprotein im Verhältnis 1:1 erreicht wurde.

3.1.5 Batch-Fermentation

Zur Herstellung größerer Mengen an Lipase und Helferprotein wurden *E. coli* BL21(DE3) pETKWIrLip und *E. coli* DH5 α pKWlompAd70Act im 5 l und 30 l-Maßstab fermentiert (Abb. 3.1.22). Bei der Durchführung der Batch-Fermentationen konnten bei der Expression der Lipase in *E. coli* BL21(DE3) Ausbeuten von 4 bis 5 g Zellnaßgewicht/l Medium erreicht werden. Bei der Expression des Helferproteins in *E. coli* DH5 α war die Ausbeute an Zellen etwas geringer (3,8 bis 4,5 g/l), da die Induktion der Expression durch einen Temperaturshift

Expression der Lipase:



Ausbeute: 4-6 g Zellen/l

Expression des Helfers:

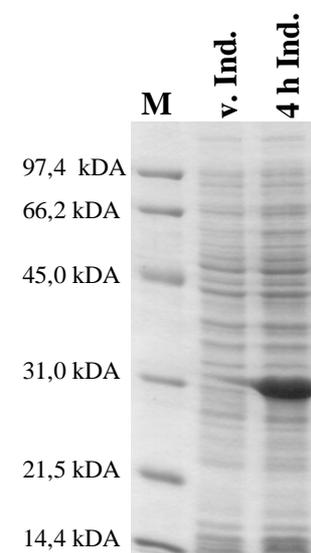


Abbildung 3.1.22: Fermentation: Produktion von Lipase und Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56. Die Expression von Lipase und Helferprotein erfolgte im 5 l und 30 l Maßstab. Für die Expression der Lipase wurden *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pETKWIrLip bei einer OD₅₇₈ von ca. 1 mit 0,4 mM IPTG induziert. Die Wachstumskurve ist mit Punkten markiert. Auf dem SDS-Gel links wurde das Gesamtzellprotein vor und 4 h nach der Lipase-Induktion aufgetragen. Die Expression des Helferproteins erfolgte in DH5 α mit dem Plasmid pKWlompAd70Act, die Induktion erfolgte ebenfalls bei OD₅₇₈ von ca. 1, jedoch durch einen Temperaturshift auf 42°C. Die Wachstumskurve ist mit Kästchen gekennzeichnet. Das SDS-Gel rechts zeigt das Gesamtzellprotein vor und 4 h nach der Induktion der Expression des Helferproteins.

von 37°C auf 42°C erfolgte und *E. coli* bei höheren Temperaturen eine geringere Wachstumsrate hat. Die Ausbeuten entsprechen auch der Zellausbeute bei der Expression im Schüttelkolben mit Schikanen.

Auch die Expressionsraten von rekombinanter Lipase und deren Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 lagen bei der Fermentation entsprechend den Ergebnissen aus dem Schüttelkolben ebenfalls bei etwa 50 % (Abb. 3.1.22).

3.1.6 Charakterisierung der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56

Für die Charakterisierung der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 wurde die aus Inclusion-Bodies gereinigte Lipase dem *In-vitro*-Refolding mit ihrem spezifischen Helferprotein unter den oben beschriebenen Standardbedingungen unterzogen. Wenn nicht anders vermerkt, wurde die Lipase für die Charakterisierung direkt aus dem Refolding-Ansatz verwendet.

3.1.6.1 Einfluß der Temperatur auf die Lipaseaktivität

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Aktivität der in *E. coli* exprimierten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 wurde die Aktivität mit dem pNPP-Assay bei verschiedenen Temperaturen gemessen (s. Kapitel 2.7.4.1). Die maximale Aktivität der Lipase wurde bei Temperaturen zwischen 60°C und 80°C erreicht (Abb. 3.1.23). Selbst bei 90°C sinkt die Aktivität nur um etwa 20 %. Bei Temperaturen zwischen 20°C und 40°C konnten hingegen lediglich 10 bis 35 % der maximalen Aktivität gemessen werden. Die Lipase ist also thermophil.

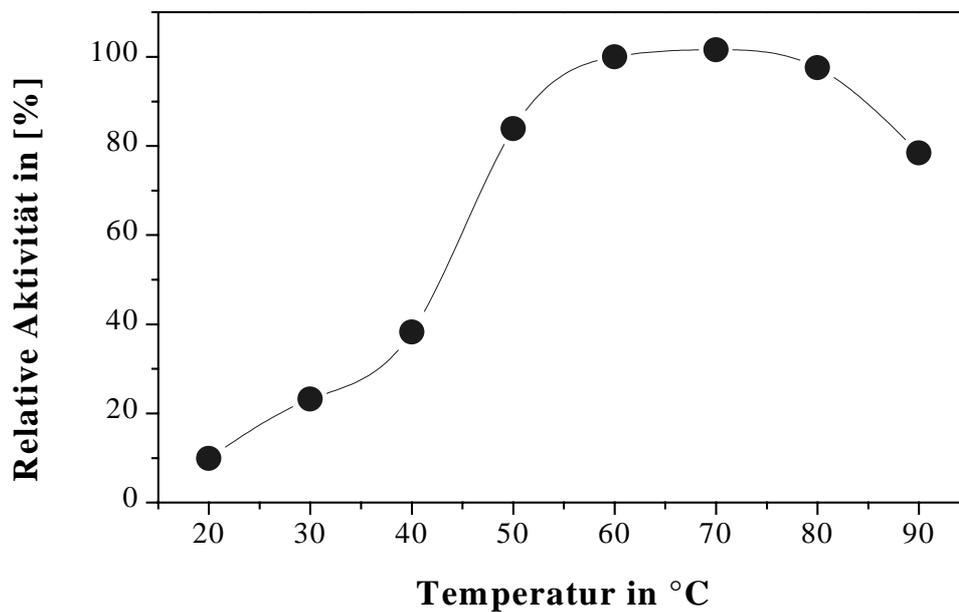


Abbildung 3.1.23: Einfluß der Temperatur auf die Aktivität der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56. Die relative Aktivität wurde mit dem pNPP-Assay bei verschiedenen Temperaturen bestimmt und ist in [%] angegeben. 100 % entsprechen der Aktivität der Lipase bei 60°C.

3.1.6.2 Temperaturstabilität

Zur Untersuchung der Stabilität der rekombinant in *E. coli* exprimierten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 wurden jeweils Aliquots der Lipaselösung bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und die verbliebene Restaktivität nach unterschiedlicher Inkubationsdauer mit dem pNPP-Assay bestimmt (s. Kapitel 2.7.4.1). Die rekombinante Lipase ist bis 37°C über mindestens 20 h stabil (Abb. 3.1.24). Nach halbstündiger Inkubation der Lipase bei 60°C oder noch höheren Temperaturen sinkt die Restaktivität auf ca. 20 % der ursprünglichen Aktivität. Bei 50°C kann die langsame Deaktivierung der Lipase beobachtet werden. Die Halbwertszeit liegt hier bei etwa 5 h.

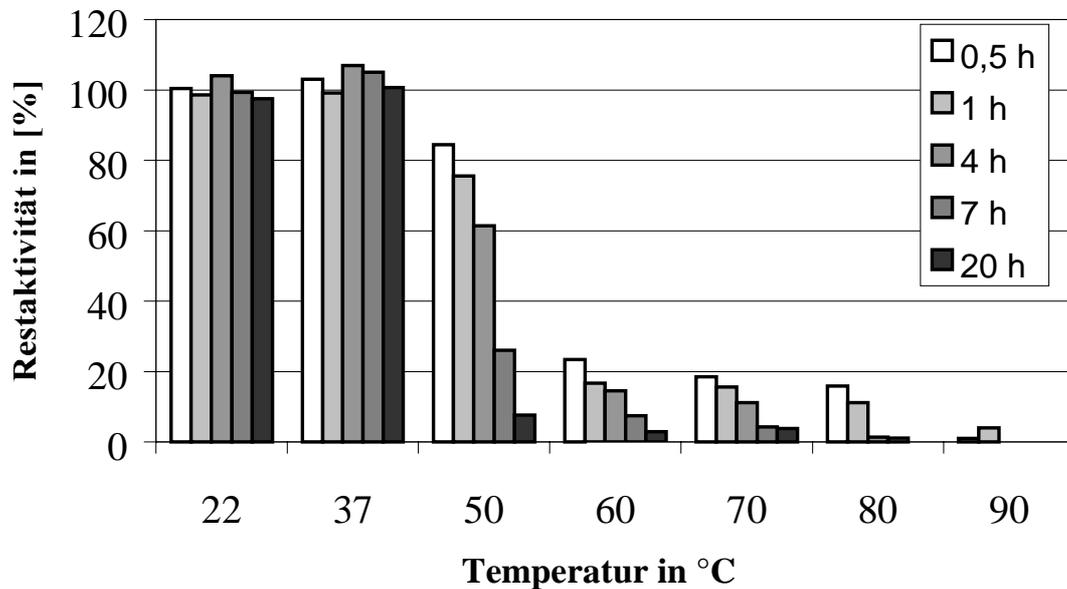


Abbildung 3.1.24: Temperaturstabilität der rekombinanten *Pseudomonas species* KWI 56 Lipase. Die Restaktivität wurde jeweils mit dem pNPP-Assay bestimmt und ist in [%] angegeben. Die eingesetzte Aktivität bei 0 h wurde als 100 % gesetzt.

3.1.6.3 pH-Einfluß auf die Lipaseaktivität

Zur Bestimmung des pH-Optimums der rekombinant in *E. coli* exprimierten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 wurde die Lipaseaktivität im pH-Stat bei verschiedenen pH-Werten mit Tributyrin als Substrat gemessen (vergl. Kapitel 2.7.4.2 und 2.7.3.2). Die Aktivität der Lipase steigt im Bereich von pH 6 bis pH 9 leicht an (Abb. 3.1.25). Bei pH 10 ist die Lipaseaktivität nur um etwa 15 bis 20 % geringer, während die gemessene Aktivität bei pH 5 auf 60 % und bei pH 4 sogar auf 13 % sinkt.

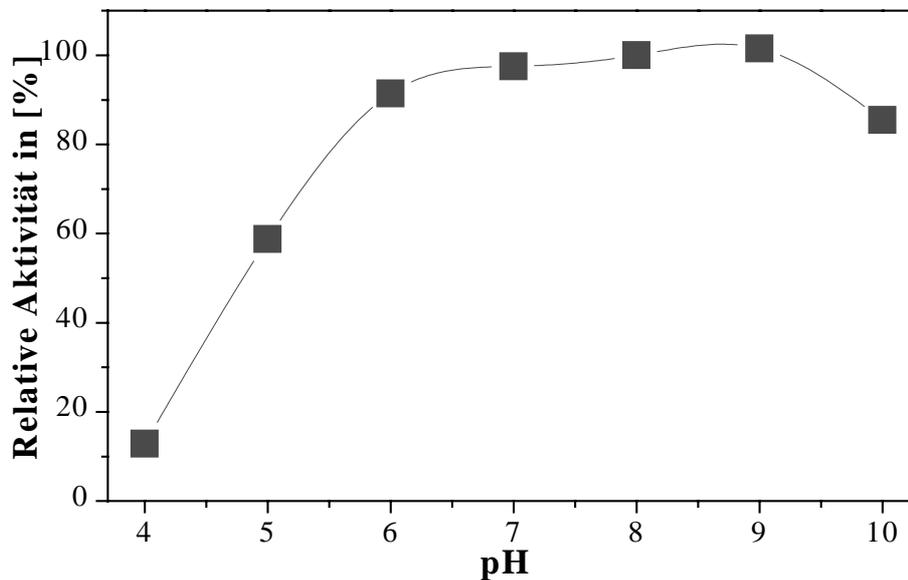


Abbildung 3.1.25: Einfluß der pH-Wertes auf die Aktivität der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56. Die relative Aktivität wurde im pH-Stat bei verschiedenen pH-Werten mit Tributyrin als Substrat bestimmt und ist in [%] angegeben. 100 % entsprechen der Aktivität bei pH 8.

3.1.6.4 pH-Stabilität

Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Stabilität der rekombinant in *E. coli* exprimierten *Pseudomonas species* KWI 56 Lipase wurde die Restaktivität der Lipase nach 16-stündiger Inkubation in Puffern unterschiedlicher pH-Werte mit dem pNPP-Assay bestimmt (s. Kapitel 2.7.4.2). Im pH-Bereich von pH 7 bis 9 bleibt die Lipase stabil, nach Inkubation bei pH 9 scheint die Aktivität sogar leicht zu steigen. Nach Inkubation bei pH 6 und pH 10 sind noch 60 bis 70 % Restaktivität vorhanden, bei pH-Werten kleiner 6 und größer 10 sinkt die gemessene Restaktivität signifikant (Abb. 3.1.26).

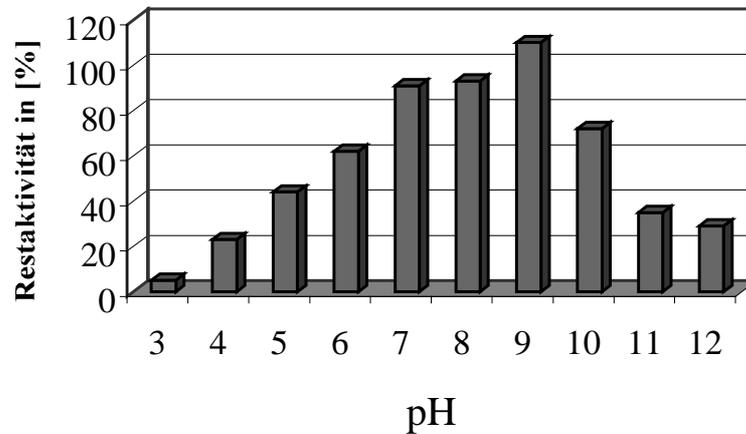


Abbildung 3.1.26: Stabilität der Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 nach 16stündiger Inkubation bei verschiedenen pH-Werten. Die Restaktivität wurde mit dem pNPP-Test bestimmt und ist in [%] angegeben. Die eingesetzte Aktivität wurde als 100 % gesetzt.

3.1.6.5 Einfluß von CaCl_2 auf die Lipaseaktivität

Der Zusatz von 10 mM CaCl_2 zur Triolein-Substratlösung bei der Messung der Lipase-Aktivität im pH-Stat-Assay hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der rekombinanten *Pseudomonas species* KWI 56 Lipase. Die spezifische Aktivität der Lipase wurde mit und ohne Zusatz von CaCl_2 mit 3900 U/mg bestimmt.

3.1.6.6 Substratspezifität der Lipase

Die Substrat- bzw. Kettenlängenspezifität der rekombinant in *E. coli* exprimierten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 gegenüber Triacylglyceriden mit unterschiedlichen Acylkettenlängen wurde zunächst im pH-Stat-Assay untersucht. Als Substrat bei der Messung der Aktivität der Lipase diente jeweils ein Triacylglycerid mit definierter Acylkettenlänge (Tributyryn (C4), Tricaproin (C6), Tricaprylin (C8), Tricaprin (C10), Trilaurin (C12), Trimyristin (C14), Tripalmitin (C16), Triolein (C18:1)).

Die Lipase hat ein breites Substratspektrum (Abb. 3.1.27). Alle untersuchten Substrate wurden umgesetzt. Maximale Aktivität zeigte die Lipase mit Trimyristin (C14), dicht gefolgt von Tricaprylin (C8) und Tricaprin (C10). Bevorzugte Substrate sind generell mittelkettige Triacylglyceride.

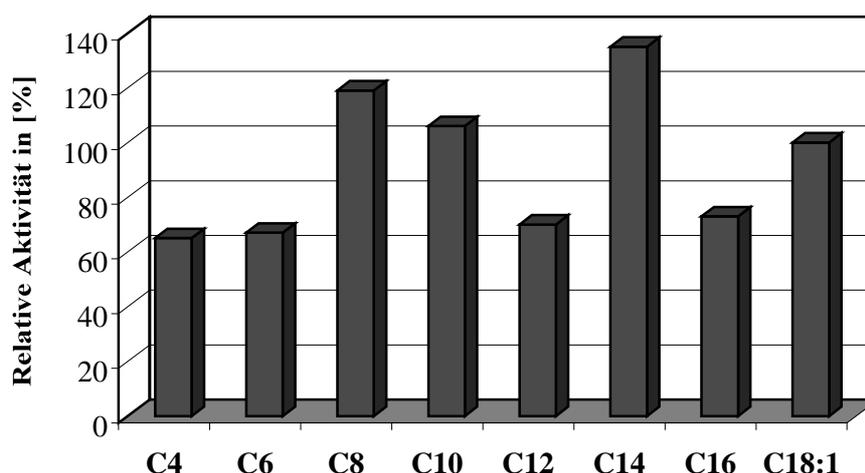


Abbildung 3.1.27: Substratspektrum der rekombinanten *Pseudomonas species* KWI 56 Lipase.

Die Lipaseaktivität wurde im pH-Stat-Assay gegenüber Triacylglyceriden unterschiedlicher Acylkettenlängen gemessen. Die Aktivität mit Triolein als Substrat wurde als 100 % angenommen, die Aktivitäten mit anderen Substraten sind als relative Aktivität in [%] angegeben.

Da insbesondere die mittelkettigen Triacylglyceride oft sehr schlecht lösliche Substrate sind, wodurch exakte Messungen im pH-Stat-Assay erschwert werden, wurde ein weiteres Experiment zur Untersuchung der Substratspezifität durchgeführt (Abb. 3.1.28). In einem kompetitiven Assay mit einem „random oil“ und anschließender gaschromatographischer Detektion konnte die Kettenlängenspezifität untersucht werden. „Random oil“ ist ein

synthetisiertes Öl, das ein Fettsäurespektrum von C8 bis C18 mit einer Gleichverteilung der Fettsäurereste auf alle 3 Positionen aufweist.

Die Untersuchungen der Kettenlängenspezifität der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 mit „random oli“ zeigen deutlich das breite Substratspektrum. Alle 8 im Ölgemisch vorhandenen Fettsäurereste wurden zu Anteilen von 10 bis 15 % von der Lipase abgespalten. Während zu Beginn des Umsatzes Myristinsäure (C14) und Palmitinsäure (C16) die favorisierten Substrate sind, verschiebt sich das Spektrum mit Fortschreiten der Umsetzung zugunsten von Caprylsäure (C8) und Caprinsäure (C10). Die Unterschiede sind jedoch sehr marginal.

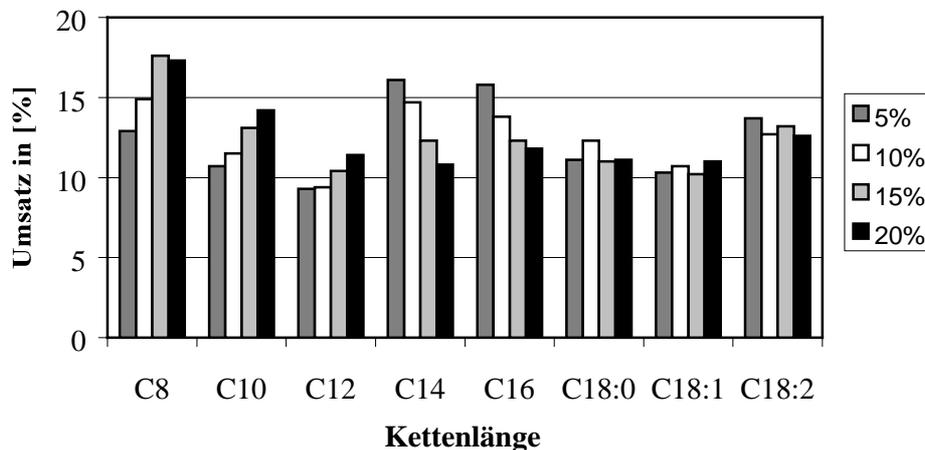


Abbildung 3.1.28: Kettenlängenspezifität der rekombinanten *Pseudomonas species* KWI 56 Lipase. Zur Bestimmung der Kettenlängenspezifität wurde ein Gemisch aus verschiedenen Triglyceriden mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen an allen 3 Positionen („Random oil“, Unilever) hydrolysiert. Die freigesetzten Fettsäuren wurden nach einem Gesamtumsatz von 5, 10, 15 bzw. 20 % im GC analysiert. Der Anteil der abgespaltenen Fettsäuren jeder Kettenlänge ist in [%] angegeben.

3.2 Lipase aus *Chromobacterium viscosum*

Für die rekombinante Expression der Lipase aus *Chromobacterium viscosum* in *E. coli* wurden die Gene für die Lipase (*lipA*) und deren Helferprotein (*lipB*) ebenfalls synthetisch hergestellt. Vorteile der Gensynthese gegenüber der herkömmlichen Klonierung aus dem Wildtyp-Stamm sind insbesondere die Möglichkeit, die Codon-Usage der Gene für die rekombinante Expression im Wirtsstamm zu optimieren und die Gene strategisch in Fragmente zu unterteilen, die weiterführende Arbeiten wie Protein-Engineering oder Untersuchung einzelner Domänen erleichtern (vergl. Kapitel 3.1).

3.2.1 Synthese der Gene für die Lipase und das Helferprotein aus *Chromobacterium viscosum*

3.2.1.1 Gen-Design

Das Design der Gene erfolgte entsprechend der bereits für die synthetischen Gene für die Lipase und deren Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 beschriebenen Vorgehensweise (Kapitel 3.1). Die synthetischen Gene für die Lipase (*lipA*) und deren Helferprotein (*lipB*) aus *Chromobacterium viscosum* wurden für die rekombinante Expression in *E. coli* optimiert (Abb. 3.2.1). Während in der genomischen Organisation in *Chromobacterium* das Startcodon ATG von *lipB* mit dem Stopcodon von *lipA* GTA um das A überlappt (Sequenz GTATG), und damit die ORFs von *lipA* und *lipB* nicht dasselbe Leseraster besitzen, wurde im synthetischen Gencluster entsprechend der Organisation der Gene aus *Pseudomonas species* KWI 56 das Startcodon von *lipB* 3 Basenpaare downstream des Stop-Codons von *lipA* plaziert. Das 2,2 kb große Gencluster wurde in 6 Boxen unterteilt, die jeweils durch eine singuläre Restriktionsschnittstelle voneinander getrennt sind. Zusätzlich wurde ein Reihe weiterer singulärer Restriktionsschnittstellen eingeführt, um spätere Klonierarbeiten zu erleichtern. Die Codon-Usage der synthetischen Gene wurde der Codon-Usage von *E. coli* angepaßt, selten in *E. coli* verwendete Codons wurden durch häufig verwendete ersetzt (Tab. 3.2.2 und 3.1.3). Gleichzeitig konnte der GC-Gehalt der beiden Gene von 73 % auf 69 % verringert werden (Tab. 2.2.1). Die synthetisch hergestellte DNA-Sequenz ist zu 77 % identisch mit der DNA-Sequenz der Wildtyp-Gene. Abbildung 3.2.2 zeigt die

Aminosäuresequenzen von Lipase und Helferprotein aus *Chromobacterium viscosum*, die dazugehörigen Wildtyp-Gene und die von der Aminosäuresequenz abgeleitete DNA-Sequenz der synthetischen Gene *lipA* und *lipB*.

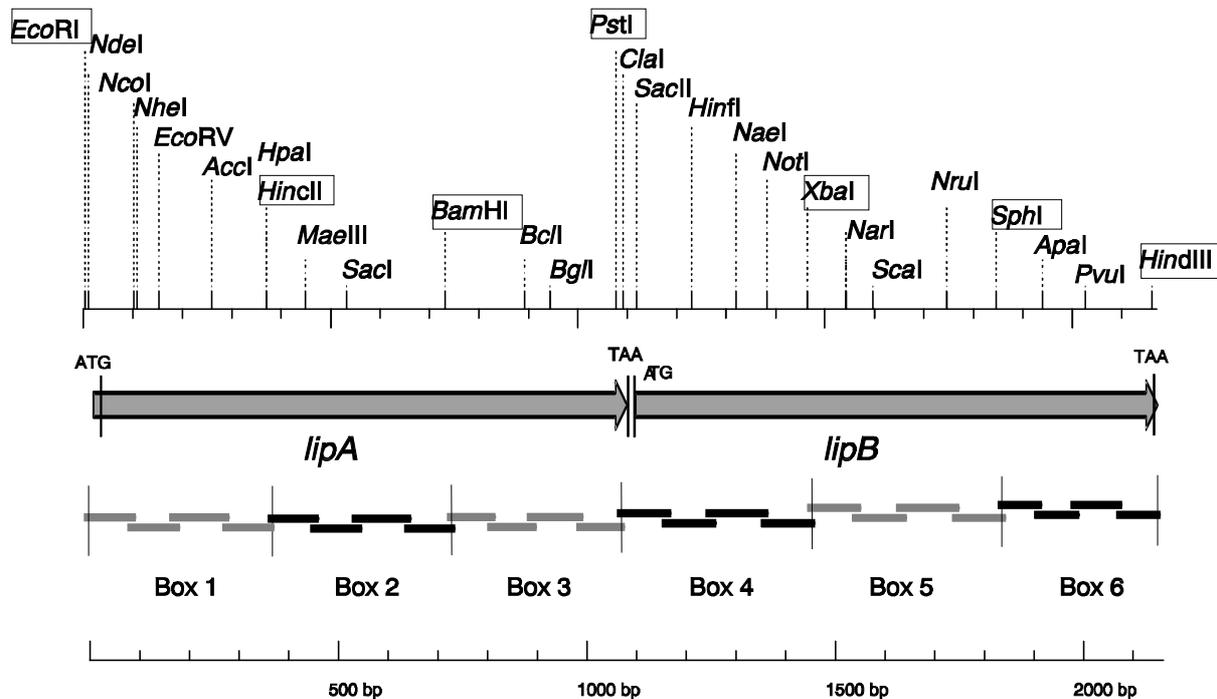


Abbildung 3.2.1: Aufbau der synthetischen Gene *lipA* und *lipB* aus *Chromobacterium viscosum*. Die synthetischen Gene *lipA* und *lipB* sind mit grauen Pfeilen dargestellt. Die Startcodons von *lipA* und *lipB* (ATG), sowie die Stopcodons (TAA) sind in den Genen markiert. Die eingeführten singulären Restriktionsschnittstellen sind über dem Gen angezeichnet. Die schwarz umrandeten Restriktionsschnittstellen begrenzen die jeweiligen Boxen. Die einzelnen Boxen wurden aus den unten durch schwarze und graue Linien angezeichneten Oligonukleotiden synthetisiert.

Tabelle 3.2.1: GC-Gehalt der Wildtyp-Gene *lipA* und *lipB* aus *Chromobacterium viscosum* und den synthetischen Genen *lipA* und *lipB*.

	<i>lipA</i>	<i>lipB</i>	<i>lipA</i> und <i>lipB</i>
Wildtyp-Gen	69,6%	77,2%	73,3%
Synthetisches Gen:	56,1%	64,5%	60,3%

Tabelle 3.2.2: Codon Usage und Aminosäure-Zusammensetzung der Lipase aus *Chromobacterium viscosum*. Angegeben ist jeweils die Anzahl der verwendeten Codons und ihr prozentualer Anteil.

Aminosäure	Anzahl in CVL	Codon-Usage in <i>lipA</i> Wildtyp		Codon-Usage im synthetischen <i>lipA</i>	
Ala	51 (14,2%)	GCG (34; 9,5%) GCC (16; 4,5%)	GCA (1; 0,3%) GCT (0)	GCT (24; 6,7%) GCA (23; 6,4%)	GCG (4; 1,1%) GCC (0)
Arg	15 (4,2%)	CGC (9; 2,5%) CGG (2; 0,6%) AGG (2; 0,6%)	AGA (1; 0,3%) CGT (1; 0,3%) CGA (0)	CGT (13; 3,6%) CGC (1; 0,3%) CGA (1; 0,3%)	CGG (0) AGG (0) AGA (0)
Asn	15 (4,2%)	AAC (13; 3,6%)	AAT (2; 0,6%)	AAC (15; 4,2%)	AAT (0)
Asp	17 (4,7%)	GAC (14; 3,9%)	GAT (3; 0,8%)	GAC (14; 3,9%)	GAT (3; 0,8%)
Cys	2 (0,6%)	TGC (2; 0,6%)	TGT (0)	TGC (2; 0,6%)	TGT (0)
Gln	17 (4,7%)	CAA (2; 0,6%)	CAG (15; 4,2%)	CAG (16; 4,5%)	CAA (1; 0,3%)
Glu	5 (1,4%)	GAG (3; 0,8%)	GAA (2; 0,6%)	GAA (4; 1,1%)	GAG (1; 0,3%)
Gly	36 (10,0%)	GGC (27; 7,5%) GGG (6; 1,7%)	GGA (2; 0,6%) GGT (1; 0,3%)	GGT (25; 7,0%) GGC (9; 2,5%)	GGA (2; 0,6%) GGG (0)
His	9 (2,5%)	CAC (6; 1,7%)	CAT (3; 0,8%)	CAC (8; 2,2%)	CAT (1; 0,3%)
Ile	10 (2,8%)	ATC (10; 2,8%) ATA (0)	ATT (0)	ATC (10; 2,8%) ATT (0)	ATA (0)
Leu	34 (9,5%)	CTC (18; 5,0%) CTG (14; 3,9%) TTG (2; 0,6%)	TTA (0) CTT (0) CTA (0)	CTG (34; 9,5%) CTT (0) TTG (0)	TTA (0) CTC (0) CTA (0)
Lys	6 (1,7%)	AAG (6; 1,7%)	AAA (0)	AAG (6; 1,7%)	AAA (0)
Met	5 (1,4%)	ATG (5; 1,4%)		ATG (5; 1,4%)	
Phe	8 (2,2%)	TTC (8; 2,2%)	TTT (0)	TTC (8; 2,2%)	TTT (0)
Pro	12 (3,3%)	CCG (9; 2,5%) CCC (3; 0,8%)	CCT (0) CCA (0)	CCG (12; 3,3%) CCT (0)	CCC (0) CCA (0)
Ser	29 (8,1%)	TCG (14; 3,9%) AGC (11; 3,1%) TCC (4; 1,1%)	TCT (0) TCA (0) AGT (0)	TCT (16; 4,5%) TCC (9; 2,5%) AGC (4; 1,1%)	AGT (0) TCA (0) TCG (0)
Thr	36 (10,0%)	ACC (24; 6,7%) ACG (12; 3,3%)	ACT (0) ACA (0)	ACC (23; 6,4%) ACT (13; 3,6%)	ACA (0) ACG (0)
Trp	4 (1,4%)	TGG (4; 1,1%)		TGG (4; 1,1%)	
Tyr	10 (2,8%)	TAC (7; 1,9%)	TAT (3; 0,8%)	TAC (9; 2,5%)	TAT (1; 0,3%)
Val	37 (10,3%)	GTG (25; 7,0%) GTC (12; 3,3%)	GTT (0) GTA (0)	GTT (28; 7,8%) GTA (9; 2,5%)	GTC (0) GTG (0)
Gesamt	358 (100%)	NNN (358; 100%)		NNN (358; 100%)	

Tabelle 3.2.3: Codon Usage und Aminosäure-Zusammensetzung des Helferproteins für die Lipase aus *Chromobacterium viscosum*. Angegeben ist jeweils die Anzahl der verwendeten Codons und ihr prozentualer Anteil.

Aminosäure	Anzahl in CVL	Codon-Usage in <i>lipB</i> Wildtyp		Codon-Usage im synthetischen <i>lipB</i>	
Ala	92 (26,1%)	GCG (58; 16,4%) GCC (32; 9,0%)	GCA (1; 0,3%) GCT (1; 0,3)	GCT (42; 11,9%) GCA (40; 11,3%)	GCG (9; 2,5%) GCC (1; 0,3%)
Arg	34 (9,6%)	CGC (22; 6,2%) CGG (9; 2,5%) AGG (2; 0,6%)	CGT (1; 0,3%) AGA (0) CGA (0)	CGT (23; 6,5%) CGC (11; 3,1%) CGA (0)	CGG (0) AGG (0) AGA (0)
Asn	1 (0,3%)	AAC (1; 0,3%)	AAT (0)	AAC (1; 0,3%)	AAT (0)
Asp	24 (6,8%)	GAC (17; 4,8%)	GAT (7; 2,0%)	GAC (20; 5,6%)	GAT (4; 1,1%)
Cys	3 (0,8%)	TGT (2; 0,6%)	TGC (1; 0,3%)	TGC (3; 0,8%)	TGT (0)
Gln	29 (8,2%)	CAG (26; 7,3%)	CAA (3; 0,8%)	CAG (29; 8,2%)	CAA (0)
Glu	15 (4,2%)	GAG (13; 3,7%)	GAA (2; 0,6%)	GAA (14; 4,0%)	GAG (1, 0,3%)
Gly	28 (7,9%)	GGC (21; 5,9%) GGG (6; 1,7%)	GGT (1; 0,3%) GGA (0)	GGT (18; 5,1%) GGC (10; 2,8%)	GGA (0) GGG (0)
His	3 (0,8%)	CAT (3; 0,8%)	CAC (0)	CAT (2; 0,6%)	CAC (1; 0,3%)
Ile	8 (2,3%)	ATC (8; 2,3%) ATA (0)	ATT (0)	ATC (8; 2,3%) ATT (0)	ATA (0)
Leu	36 (10,2%)	CTC (16; 4,5%) CTG (14; 4,0%) TTG (3; 0,8%)	CTT (3; 0,8%) TTA (0) CTA (0)	CTG (34; 9,6%) CTT (1; 0,3%) CTA (1; 0,3%)	TTA (0) CTC (0) TTG (0)
Lys	4 (1,1%)	AAG (4; 1,1%)	AAA (0)	AAA (4; 1,1%)	AAG (0)
Met	6 (1,7%)	ATG (6; 1,7%)		ATG (6; 1,7%)	
Phe	7 (2,0%)	TTC (7; 2,0%)	TTT (0)	TTC(7; 2,0%)	TTT (0)
Pro	24 (6,8%)	CCG (15; 4,2%) CCC (8; 2,25%)	CCT (1; 0,3%) CCA (0)	CCG (24; 6,8%) CCT (0)	CCC (0) CCA (0)
Ser	7 (2,0%)	TCG (4; 1,1%) AGC (3; 0,8%) TCC (0)	TCT (0) TCA (0) AGT (0)	TCT (3; 0,8%) TCC (3; 0,8%) AGT (1; 0,3%)	AGC (0) TCA (0) TCG (0)
Thr	13 (3,7%)	ACG (10; 2,8%) ACC (2; 0,6%)	ACT (1; 0,3%) ACA (0)	ACC (9; 2,6%) ACT (4; 1,1%)	ACA (0) ACG (0)
Trp	4 (1,1%)	TGG (4; 1,1%)		TGG (4; 1,1%)	
Tyr	5 (1,4%)	TAT (4; 1,1%)	TAC (1; 0,3%)	TAC (5; 1,4%)	TAT (0)
Val	10 (2,8%)	GTG (6; 1,7%) GTC (4; 1,1%)	GTT (0) GTA (0)	GTT (8; 2,3%) GTA (2; 0,6%)	GTC (0) GTG (0)
Gesamt	353 (100%)	NNN (353; 100%)		NNN (353; 100%)	

```

1 GATGGAGATA AACATGGTCA GATCGATGCG TTCCAGGGTG GCGGCGAGGG CGGTGGCATG
1 GGGGAATTCA CATATGGTTC GTTCCATGCG TTCTCGTGTT GCTGCTCGTG CAGTTGCATG
    LipA M V R S M R S R V A A R A V A
        Signalsequenz

61 GGC GTTGGCG GTGATGCCGC TGGCCGGCGC GGCCGGGTTG ACGATGGCCG CGTCGCCCCG
61 GGC ACTGGCT GTTATGCCGC TGGCAGGTGC AGCTGGTCTG ACCATGGCAG CTAGCCCCGG
    W A L A V M P L A G A A G L T M A A S P

121 GGCCGTGCGG GCGGACACCT ACGCGGCGAC GCGCTATCCG GTGATCCTCG TCCACGGCCT
121 AGCAGTTGCA GCTGACACCT ACGCTGCTAC CCGATATCCG GTTATCCTGG TACACGGTCT
    A A V A A D T Y A A T R Y P V I L V H G
        reife Lipase (rlipA)

181 CGCGGGCACC GACAAGTTCG CGAACGTGGT GGA CTATTGG TACGGAATCC AGAGCGATCT
181 GGCTGGTACT GACAAATTTCG CTAACGTTGT AGATTACTGG TACGGTATCC AGTCTGACCT
    L A G T D K F A N V V D Y W Y G I Q S D

241 GCAATCGCAT GCGCGAAGG TGTACGTCGC GAATCTCTCG GGATTCCAGA GCGACGACGG
241 GCAATCTCAC GGTGCAAAAG TATACGTTGC AAACCTGTCT GGTTTCCAGT CCGACGACGG
    L Q S H G A K V Y V A N L S G F Q S D D

301 GCCGAACGGC CGCGGCGAGC AGCTGCTCGC CTACGTGAAG CAGGTGCTCG CGGCCACCGG
301 TCCGAACGGC CGTGGTGAAC AGCTGCTGGC GTACGTTAAA CAGGTTCCTGG CTGCAACCGG
    G P N G R G E Q L L A Y V K Q V L A A T

361 CGCGACCAAG GTGAACCTGA TCGGCCACAG CCAGGGCGGC CTGACCTCGC GCTACGTCGC
361 TGCTACTAAA GTTAACCTGA TCGGTCACTC TCAGGGTGGT CTGACTTCCC GTTACGTTGC
    G A T K V N L I G H S Q G G L T S R Y V

421 GGCCGTGCGG CCGCAACTGG TGGCCTCGGT GACGACGATC GGCACGCCGC ATCGCGGCTC
421 AGCAGTTGCT CCGCAGCTGG TAGCATCTGT TACCACCATC GGTACTCCGC ACCGTGGTAG
    A A V A P Q L V A S V T T I G T P H R G

481 CGAGTTCGCC GACTTCGTGC AGGACGTGCT GAAGACCGAT CCGACCGGGC TCTCGTCGAC
481 CGAGTTCGCT GATTCGTTC AGGACGTTCT GAAAACCGAC CCGACCGGCC TGAGCTCCAC
    S E F A D F V Q D V L K T D P T G L S S

541 GGTGATCGCC GCCTTCGTCA ACGTGTTCCG CACGCTCGTC AGCAGCTCGC ACAACACCGA
541 TGTTATCGCA GCATTTCGTAA ACGTATTCGG TACTCTGGTT TCTTCTTCCC ATAACACCGA
    T V I A A F V N V F G T L V S S S H N T

601 CCAGGACGCG CTCGCGGCGC TGCGCACGCT CACCACCGCG CAGACCGCCA CCTACAACCG
601 CCAGGACGCA CTGGCTGCTC TGCGCACTCT GACCACCGCG CAGACCGCTA CCTACAACCG
    D Q D A L A A L R T L T T A Q T A T Y N

661 GAACTTCCCG AGCGCGGGCC TGGGCGCGCC CGGTTTCGTGC CAGACGGGCG CCGCGACCGA
661 TAACTTCCCG TCTGCTGGCC TGGGCGCGCC GGGTTCTTGC CAGACTGGTG CTGCTACCGA
    R N F P S A G L G A P G S C Q T G A A T

721 AACCGTCGGC GGCAGCCAGC ACCTGCTCTA TTCGTGGGGC GGCACCGCGA TCCAGCCCAC
721 AACCGTTGGT GGATCCCAGC ACCTGCTGTA CTCTTGGGGT GGTACTGCTA TCCAGCCGAC
    E T V G G S Q H L L Y S W G G T A I Q P

781 CTCCACCGTG CTCGGCGTGA CCGGCGCGAC CGACACCAGC ACCGGCACGC TCGACGTCGC
781 TTCTACTGTT CTGGGTGTTA CTGGTGCAAC CGACACCTCT ACCGGCACCC TGGACGTTGC
    T S T V L G V T G A T D T S T G T L D V

841 GAACGTGACC GACCCGTCCA CGCTCGCGCT GCTCGCCACC GCGCGGGTGA TGATCAATCG
841 TAACGTTACT GACCCGTCCA CCCTGGCGCT GCTGGCAACC GCGCAGTTA TGATCAACCG
    A N V T D P S T L A L L A T G A V M I N

```

901	CGCCTCGGGG	CAGAACGACG	GGCTCGTCTC	GCGCTGCAGC	TCGCTGTTCG	GGCAGGTGAT
901	TGCATCTGGT	CAGAACGACG	GTCTGGTATC	TCGTTGCTCC	AGCCTGTTCG	GCCAGGTTAT
	R A S G	Q N D	G L V	S R C S	S L F	G Q V
961	CAGCACCAGC	TACCACTGGA	ACCATCTCGA	CGAGATCAAC	CAGCTGCTCG	GCGTGCGCGG
961	CTCTACCTCC	TACCACTGGA	ACCACCTGGA	CGAAATCAAC	CAGCTGCTGG	GCGTACGTGG
	I S T S	Y H W	N H L	D E I N	Q L L	G V R
1021	CGCCAACGCG	GAAGATCCGG	TCGCGGTGAT	CCGCACGCAC	GTGAACCGGC	TCAAGCTGCA
1021	CGCAAACGCT	GAAGATCCGG	TTGCTGTTAT	CCGTACCCAC	GTAAACCGTC	TGAAACTGCA
	G A N A	E D P	V A V	I R T H	V N R	L K L
1081	GGGCGTGTG-	---ATGGCGC	AGGCCGATCG	TCCGGCGCGC	GGCGGGCTGG	CCGCGCGCCC
1081	GGGAGTTTAA	TCGATGGCAC	AGGCTGACCG	CCCGGCCCGC	GGTGGTCTGG	CAGCACGCCC
	Q G V -	LipB M A	Q A D	R P A R	G G L	A A R
1137	GATGCGCGGC	GCGTCGTTTCG	CGCTGGCCGG	GCTCGTCGCG	TGTGCCGCCT	GTGCCGCGGT
1141	GATGCGTGGT	GCATCTTTTCG	CTCTGGCTGG	CCTGGTTGCT	TGCGCTGCTT	GCGCAGCAGT
	P M R G	A S F	A L A	G L V A	C A A	C A A
1197	CGTGCTGTGG	CTTCGGCCCG	CCGCCCCGTC	GCCCCGCGCCG	GCCGGCGCCG	TCGCGGGCGG
1201	TGTTCTGTGG	CTGCGTCCGG	CTGCTCCGAG	TCCGGCTCCG	GCGGGTGACG	TTGCAGGTGG
	V V L W	L R P	A A P	S P A P	A G A	V A G
1257	GCCGGCGGCC	GGCGTGCCCG	CCGCGGCAAG	CGGCGGGCG	GAGGCCGCA	TGCCGTTGCC
1261	CCCGGCAGCA	GGTGTTCGGG	CAGCAGCTTC	CGGCGCAGCA	GAAGCTGCGA	TGCCGCTGCC
	G P A A	G V P	A A A	S G A A	E A A	M P L
1317	GGCGGCGCTG	CCGGGCGCGC	TGGCTGGCTC	GCATGCGCCG	CGCCTGCCGC	TGGCCGCCGG
1321	GGCTGCTCTG	CCGGGTGCAC	TGGCTGGTTC	TCATGCTCCG	CGTCTGCCGC	TGGCAGCTGG
	P A A L	P G A	L A G	S H A P	R L P	L A A
		Δ 79LipB				
1377	CGGCCGGCTC	GCGAGGACGC	GCGCGGTGCG	CGAGTTCTTC	GA CTATTGCC	TGACCGCGCA
1381	CGGCCGCCTG	GCACGTACCC	GTGCGGTTTCG	TGAGTTCTTC	GA CTACTGCC	TGACTGCGCA
	G G R L	A R T	R A V	R E F F	D Y C	L T A
1437	GGGCGAACTG	ACGCCC GCCG	CGCTCGATGC	GCTGGTGCGG	CGCGAGATCG	CCGCGCAGCT
1441	GGGTGAACTG	ACCCCGGCCG	CTCTAGACGC	ACTGGTTTCGT	CGTGAAATCG	CTGCACAGCT
	Q G E L	T P A	A L D	A L V R	R E I	A A Q
1497	TGACGGCAGC	CCCGCGCAAG	CGGAGGCGCT	CGGCGTCTGG	CGCCGCTATC	GCGCCTACTT
1501	GGACGGCTCT	CCGGCACAGG	CAGAAGCTCT	GGGTGTTTGG	CGCCGCTACC	GTGCTTACTT
	L D G S	P A Q	A E A	L G V W	R R Y	R A Y
1557	CGACGCGCTC	GCGCAATTGC	CCGGCGACGG	CGCGGTGCTC	GGCGACAAGC	TCGATCCGGC
1561	CGACGCACTG	GCTCAGCTGC	CGGGCGATGG	TGCAGTACTG	GGTGACAAAC	TGGACCCGGC
	F D A L	A Q L	P G D	G A V L	G D K	L D P
1617	CGCCATGCAG	CTCGCGCTCG	ATCAGCGCGC	GGCGCTGGCC	GACCGCACGC	TCGGCGAGTG
1621	TGCTATGCAG	CTGGCTCTGG	ACCAGCGTGC	AGCTCTGGCT	GACCGTACCC	TGGGTGAATG
	A A M Q	L A L	D Q R	A A L A	D R T	L G E
1677	GGCCGAGCCG	TTCTTCGGCG	ACGAGCAGCG	CCGGCAGCGC	CATGACCTCG	AACGGATCCG
1681	GGCAGAACCG	TTCTTCGGCG	ACGAACAGCG	CCGTCAGCGT	CACGACCTGG	AACGTATCCG
	W A E P	F F G	D E Q	R R Q R	H D L	E R I
1737	GATCGCCAAC	GACACCACGC	TGAGCCCTGA	GCAGAAAGCC	GCGCGGCTTG	CCGCGCTCGA
1741	TATCGCGAAC	GACACCACTC	TGTCCCCGGA	ACAGAAAAGCT	GCTCGCCTGG	CAGCACTGGA
	R I A N	D T T	L S P	E Q K A	A R L	A A L

```

1797  CGCGCAGCTG  ACGCCGGACG  AGCGCGCGCA  GCAGGCGGCG  CTGCATGCGC  AGCAGGACGC
1801  TGCTCAGCTG  ACCCCGGACG  AACGTGCGCA  GCAGGCGAGCA  CTGCATGCTC  AGCAGGACGC
      D A Q L   T P D   E R A   Q Q A A   L H A   Q Q D

1857  GGTGACGAAG  ATCGCCGACT  TGCAGAAGGC  CGGCGCGACG  CCCGACCAGA  TGC GCGCGCA
1861  TGTAACTAAA  ATCGCTGACC  TTCAGAAAGC  AGGTGCTACC  CCGGACCAGA  TGC GTGCTCA
      A V T K   I A D   L Q K   A G A T   P D Q   M R A

1917  GATCGCGCAG  ACGCTCGGGC  CCGAGGCGGC  CGCGCGCGCC  GCGCAGATGC  AGCAGGACGA
1921  GATCGCTCAG  ACCCTGGGCC  CGGAAGCAGC  AGCTCGTGCA  GCGCAGATGC  AGCAGGACGA
      Q I A Q   T L G   P E A   A A R A   A Q M   Q Q D

1977  CGAGGCGTGG  CAGACGCGCT  ATCAAGCCTA  TGC GGCCGAG  CGCGACC GGA  TCGCGGCGCA
1981  CGAAGCATGG  CAGACCCGTT  ACCAGGCTTA  CGCAGCAGAA  CGCGATCGCA  TCGCTGCGCA
      D E A W   Q T R   Y Q A   Y A A E   R D R   I A A

2037  GGGGCTCGCG  CCGCAGGATC  GCGATGCGCG  GATCGCGCAG  CTCAGGCAGC  AGACTTTCAC
2041  GGGTCTGGCT  CCGCAGGACC  GTGATGCACG  TATCGCTCAG  CTGCGCCAGC  AGACTTTCAC
      Q G L A   P Q D   R D A   R I A Q   L R Q   Q T F

2097  GGCGCCGGGG  GAGGCGATCC  GCGCGGCGTC  GCTCGATCGC  GGCGCGGGCG  GTTAGGGGGC
2101  CGCACCGGGT  GAAGCAATCC  GTGCAGCTTC  CCTGGACCGT  GGCGCTGGTG  GTTAATAAGC
      T A P G   E A I   R A A   S L D R   G A G   G - -

2157  GCCGGC
2161  TTCCCC

```

Abbildung 3.2.2: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Lipase und Helferprotein aus *Chromobacterium viscosum*. Die obere Zeile zeigt die DNA-Sequenzen der Wildtypgene *lipA* und *lipB*, darunter ist die DNA-Sequenz der synthetischen Gene gegenübergestellt. In der dritten Zeile findet sich die abgeleitete Aminosäuresequenz der Lipase und ihres Helferproteins. Die Signalsequenz der Lipase sowie das verkürzte Helferprotein (vergl. Kapitel 3.2.2) sind ebenfalls gekennzeichnet.

3.2.1.2 Synthese der Gen-Boxen

Die Gene für die Lipase und deren Helferprotein aus *Chromobacterium viscosum* wurden in 6 Boxen von je ca. 400 bp Länge unterteilt. Jede dieser Genboxen wurde aus 4 langen, sich um 20 bp überlappenden Oligonukleotiden mittels PCR synthetisiert (vergl. Kapitel 3.1.1.2). Die 6 Gen-Boxen überlappen sich ebenfalls gegenseitig um etwa 20 bp. In den überlappenden Bereichen befindet sich jeweils eine singuläre Restriktionsschnittstelle, die nach der Synthese das Aneinandersetzen der einzelnen Boxen mittels Klonierung ermöglicht. Abbildung 2.2.3 zeigt die synthetische DNA-Sequenz mit den für die Gensynthese verwendeten Oligonukleotiden.

Oligo CV11 ><<BglI

901 TGCATCTGGT CAGAACGACG GTCTGGTATC TCGTTGCTCC AGCCTGTTCG GCCAGGTTAT
ACGTAGACCA GTCTTGCTGC CAGACCATAG AGCAACGAGG TCGGACAAGC CGGTCCAATA

961 CTCTACCTCC TACCACTGGA ACCACCTGGA CGAAATCAAC CAGCTGCTGG GCGTACGTGG
GAGATGGAGG ATGGTGACCT TGGTGGACCT GCTTTAGTTG GTCGACGACC CGCATGCACC
Oligo CV12

1021 CGCAAACGCT GAAGATCCGG TTGCTGTTAT CCGTACCCAC GTAAACCGTC TGAAACTGCA
GCGTTTGCGAA CTTCTAGGCC AACGACAATA GGCATGGGTG CATTTGGCAG ACTTTGACGT

<<PstI >>ClaI lipB Oligo CV13 > <<SacII

1081 GGGAGTTTAA TCCATGGCAC AGGCTGACCG CCCGGCCCCG GGTGGTCTGG CAGCACGCCC
CCCTCAAATT AGCTACCGTG TCCGACTGGC GGGCCGGGCG CCACCAGACC GTCGTGCGGG

Box 4

1141 GATGCGTGGT GCATCTTTCG CTCTGGCTGG CCTGGTTGCT TGCGCTGCTTC GCGCAGCAGT
CTACGCACCA CGTAGAAAGC GAGACCGACC GGACCAACGA ACGCGACGAA CGCGTCGTCA
Oligo CV14

>>HinfI

1201 TGTTCTGTGG CTGCGTCCGG CTGCTCCGAG TCCGGTCCG GCGGGTGCAG TTGCAGGTGG
ACAAGACACC GACGCAGGCC GACGAGGCTC AGGCCGAGGC CGCCACGTC AACGTCCACC

>>NaeI Oligo CV15

1261 CCGGCAGCA GGTGTTCCGG CAGCAGCTTC CGGCGCAGCA GAAGCTGCGA TGCCGCTGCC
GGGCCGTCT CCACAAGGCC GTCGTCGAAG GCCGCGTCTG CTTGACGCT ACGCGACGG

1321 GGCTGCTCTG CCGGGTGCAC TGGCTGGTTC TCATGCTCCG CGTCTGCCGC TGGCAGTGG
CCGACGAGAC GGCCACGTG ACCGACCAAG AGTACGAGGC GCAGACGGCG ACCGTGCACC

>>NotI

1381 CGGCCGCTG GCACGTACCC GTGCGGTTTCG TGAGTTCTTC GACTACTGCC TGACTIONCGA
CGCCGCGGAC CGTGCATGGG CACGCCAAGC ACTCAAGAAG CTGATGACGG ACTGACGCGT
Oligo CV16

>>XbaI Oligo CV17

1441 GGGTGAAGT ACCCCGGCGG CTCTAGACGC ACTGGTTTCGT CGTGAAATCG CTGCACAGCT
CCCCTTGAC TGGGGCCGCC GAGATCTGCG TGACCAAGCA GCACTTTAGC GACGTGTGCA

Box 5

> <<NarI

1501 GGACGGCTCT CCGGCACAGG CAGAAGCTCT GGGTGTGTTGG CGCCGTACC GTGCTTACTT
CCTGCCGAGA GGCCGTGTCC GTCTTCGAGA CCCACAAACC GCGGCGATGG CACGAATGAA

>>ScaI

1561 CGACGCACTG GCTCAGCTGC CGGGCGATGG TGCAGTACTG GGTGACAAAC TGGACCCGGC
GCTGCGTGAC CGAGTCGACG GCCCGTACC ACGTCATGAC CCACTGTTT ACCTGGGCCG
Oligo CV18

Oligo CV19

1621 TGCTATGCAG CTGGCTCTGG ACCAGCGTGC AGCTCTGGCT GACCGTACC TGGGTGAATG
ACGATACGTC GACCGAGACC TGGTGCACG TCGAGACCGA CTGGCATGGG ACCACTTAC

1681 GGCAGAACCG TTCTTCGGCG ACGAACAGCG CCGTCAGCGT CACGACCTGG AACGTATCCG
CCGTCTTGGC AAGAAGCCGC TGCTTGTCGC GGCAGTCGCA GTGCTGGACC TTGCATAGGC

>>NruI

1741 TATCGCGAAC GACACCACTC TGTCCCCGGA ACAGAAAGCT GCTCGCCTGG CAGCACTGGA
ATAGCGCTTG CTGTGGTGAG ACAGGGGCCCT TGCTTTTCGA CGAGCGGACC GTCGTGACCT
Oligo CV20

```

                                ><SphI
1801  TGCTCAGCTG ACCCCGGACG AACGTGCGCA GCAGGCAGCA CTGCATGCTC AGCAGGACGC
ACGAGTCGAC TGGGGCCTGC TTGCACGCGT CGTCCGTCGT GACGTACGAG TCGTCCATGCG
                                BOX 6
                                Oligo CV21
1861  TGTAATAAAA ATCGCTGACC TTCAGAAAGC AGGTGCTACC CCGACCAGA TGCCTGCTCA
ACATTGATTT TAGCGACTGG AAGTCTTTTCG TCCACGATGG GGCCTGGTCT ACGCATCGAGT

                                > <ApaI
1921  GATCGCTCAG ACCCTGGGCC CGGAAGCAGC AGCTCGTGCA GCGCAGATGC AGCAGGACGA
CTAGCGAGTC TGGGACCCGG GCCTTCGTCTG TCGAGCACGT CGCGTCTACG TCGTCCCTGCT
                                Oligo CV22
                                ><PvuI
1981  CGAAGCATGG CAGACCCGTT ACCAGGCTTA CGCAGCAGAA CGCGATCGCA TCGCTGCGCA
GCTTCGTACC GTCTGGGCAA TGGTCCGAAT GCGTCGTCTT GCGCTAGCGT AGCGACGCGT

                                Oligo CV23
2041  GGGTCTGGCT CCGCAGGACC GTGATGCACG TATCGCTCAG CTGCGCCAGC AGACTTTCAC
CCCAGACCGA GGCGTCCTGG CACTACGTGC ATAGCGAGTC GACGCGGTCG TCTGAAAAGT

                                HindIII><
2101  CGCACCGGGT GAAGCAATCC GTGCAGCTTC CCTGGACCGT GCGCTGGTG GTAAATAAGC
GCGTGGCCCA CTTTCGTTAGG CACGTCEAAG GGACCTGGCA CCGCGACCAC CAATTATTCG
                                Oligo CV24

2161  TTCCCC
AAGGGG

```

Abbildung 3.2.3: Nukleotidsequenz von *lipA* und *lipB*. Die für die Gensynthese verwendeten Oligonukleotide sind in grauen und weißen Kästen dargestellt, Restriktionsschnittstellen sind über der Sequenz gekennzeichnet. Die Start- und Stop-Codons sind dick schwarz umrandet.

Die Gen-Boxen, die mit der Deep-Vent-Polymerase, einem Enzym, das bei der PCR stumpfe Enden generiert, synthetisiert wurden, wurden jeweils direkt „blunt end“ in den mit *HincII* oder *SmaI* linearisierten *E. coli*-Vektor pUC19 kloniert. Nach der Transformation in *E. coli* DH5 α wurden Klone mit Insert mit Hilfe des Blau-weiß-Screenings auf LB_{AmpX-Gal}-Agarplatten selektiert und die DNA-Sequenz durch Sequenzierung überprüft. Entsprechend der Erfahrungen, die bei der Gensynthese der Gene für die Lipase und deren Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 gemacht wurden (vergl. Kapitel 3.1.1.2), zeigte sich auch bei der Synthese der Gen-Boxen für Lipase und Helferprotein aus *Chromobacterium viscosum* eine Fehlerrate von im Durchschnitt 5 Sequenzfehlern pro 1000 bp. Nach mehreren Runden Synthese der Boxen, Klonierung in pUC19 und Sequenzierung wurde von den Gen-Boxen 1 bis 3 jeweils ein fehlerfreier Klon (pCVbox1, pCVbox2 und pCVbox3) gefunden. Von den

Boxen 4 bis 6 war jeweils ein Klon mit nur einer 1 bp Insertion bzw. Deletion vorhanden. Entfernung dieser Sequenzfehler durch zielgerichtete Mutagenese führte zu den ebenfalls fehlerfreien Klonen pCVbox4, pCVbox5 und pCVbox6.

3.2.1.3 Gene-Assembly

Nachdem alle 6 Gen-Boxen fehlerfrei in pUC19 kloniert vorlagen, wurde das Gencluster für die Lipase und ihr Helferprotein aus *Chromobacterium viscosum* im Vektor pUC18 zusammengefügt. Alle Gen-Boxen enthielten an ihren Enden jeweils eine singuläre Restriktionsschnittstelle, die sie mit ihren Nachbar-Boxen teilten. Zusätzlich war bei der Box-Synthese am 3'Ende jeder Box eine zusätzliche *HindIII*-Schnittstelle eingefügt worden, die den Zusammenbau der Gene aus den 6 Boxen durch Klonierung ermöglicht. Die Abbildungen 3.2.4 A und B illustrieren das Vorgehen beim „Gene-Assembly“.

Erster Schritt beim Zusammensetzen der Gene für die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* und ihrem Helferprotein war die Klonierung von Box 1 aus Plasmid pCVbox1 in den Vektor pUC18 über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *HindIII*. Hierbei wurde im daraus resultierenden Plasmid pCV1 automatisch die multiple cloning site (MCS) aus pUC18 deletiert, wodurch alle für die folgenden Klonierungen verwendeten Restriktionsschnittstellen nicht mehr auf dem Vektor-Backbone vorhanden waren. Im zweiten Schritt wurde zur Konstruktion von pCV12 Box 2 aus pCVbox2 mit Hilfe der Schnittstellen *SmaI* und *HindIII* in pCV1 direkt hinter Box 1 kloniert. Box 3 wurde aus Plasmid pCVbox3 über die Schnittstellen *BamHI* und *HindIII* hinter Box 2 in pCV12 kloniert. In das hieraus resultierende Plasmid pCV1-3 wurde zur Konstruktion von pCV1-4 daraufhin Box 4 aus pCVbox4 über die Restriktionsschnittstellen *PstI* und *HindIII* eingefügt. Box 5 wurde aus pCVbox5 über die Schnittstellen *XbaI* und *HindIII* hinter Box 4 in pCV1-4 kloniert, wodurch pCV1-5 entstand. Im letzten Schritt des Zusammenbaus der synthetischen Gene wurde Box 6 aus pCVbox6 mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *SphI* und *HindIII* in pCV1-5 eingefügt. Das resultierende Plasmid pCV1-6 enthält das komplette Gencluster für die Gene für die Lipase und deren Helferprotein aus *Chromobacterium viscosum*. Die Richtigkeit der Sequenzen der synthetisierten Gene wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

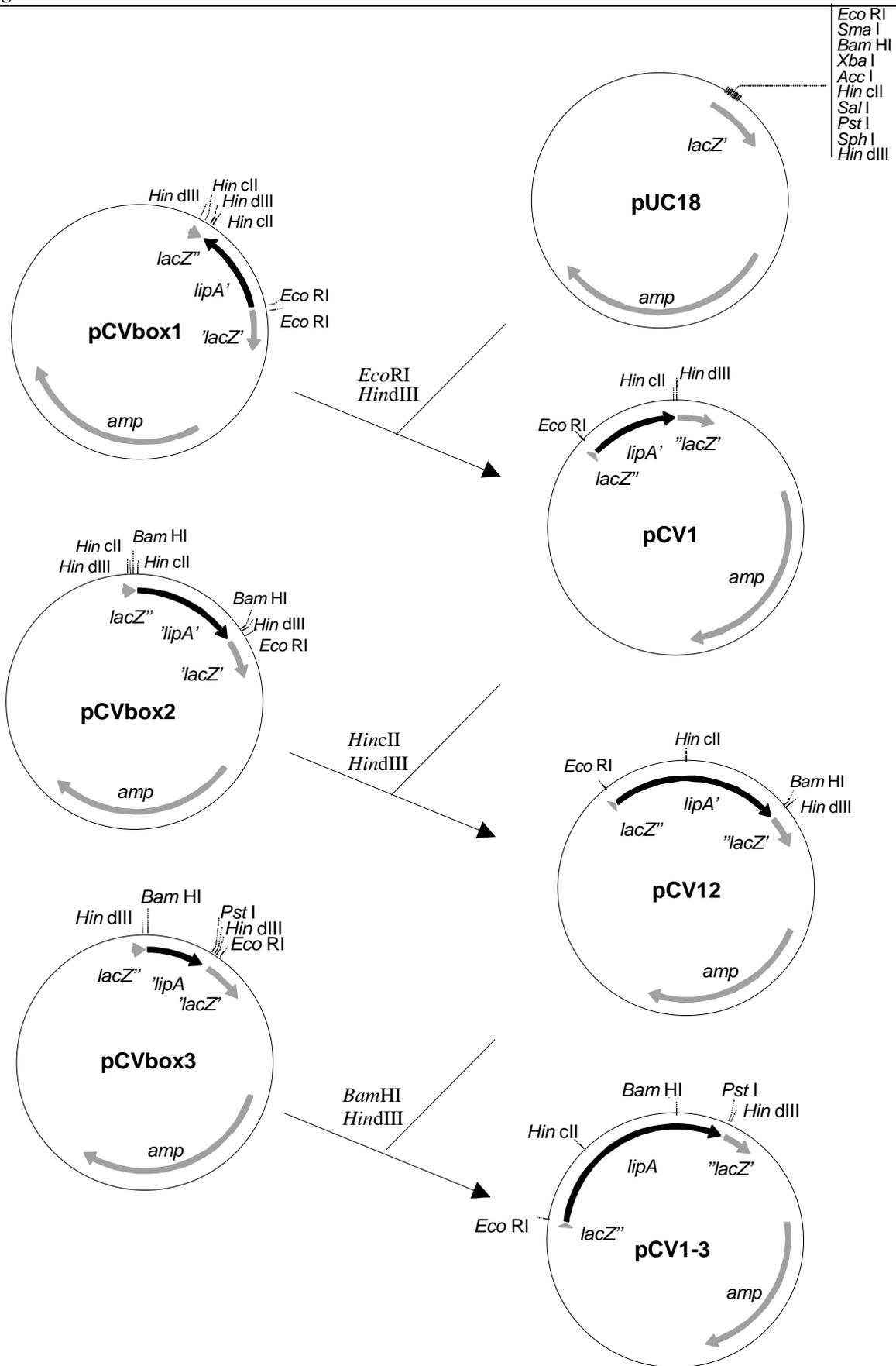


Abbildung 3.2.4 A: Zusammensetzen der synthetischen Gene für die Lipase aus *Chromobacterium viscosum*.

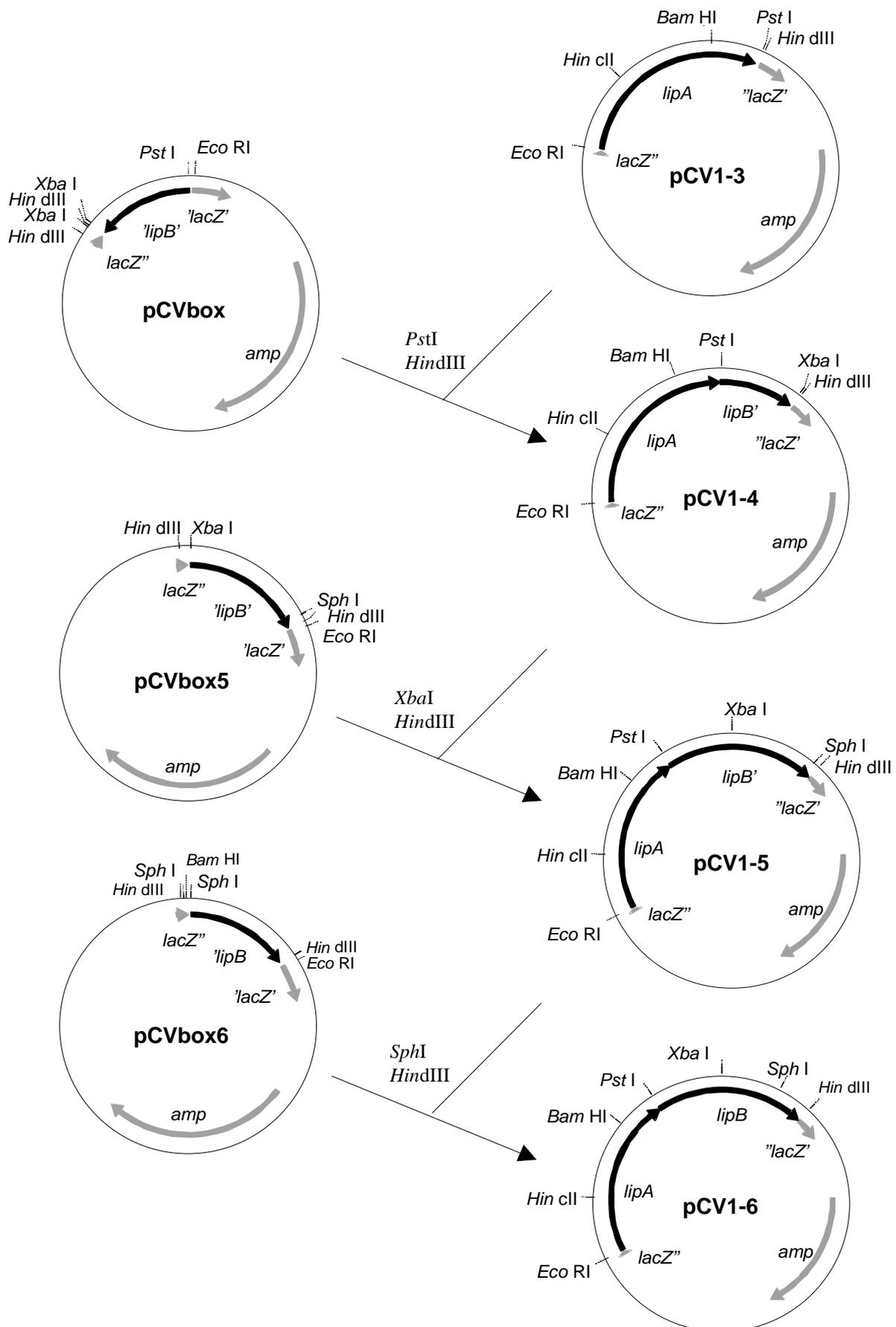


Abbildung 3.2.4 B: Zusammensetzen der synthetischen Gene für die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* und ihr Helferprotein.

3.2.2 Expression der Lipase und des Helferproteins aus *Chromobacterium viscosum* in *E. coli*

Bei der rekombinanten Expression der synthetischen Gene für die Lipase und deren Helferprotein aus *Chromobacterium viscosum* in *E. coli* konnte aufgrund der Homologie zu der Lipase und deren Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 auf die bei deren Expression gesammelten Erfahrungen zurückgegriffen werden (vergl. Kapitel 3.1.2).

3.2.2.1 Klonierung der Gene für die Lipase und deren Helferprotein in pET20b(+)

Da sowohl bei der Expression der Lipase als auch der Expression des Helferproteins aus *Pseudomonas species* KWI 56 mit dem T₇-Expressionssystem höhere Protein-Ausbeuten erzielt werden konnten als mit dem λ-Expressionssystem, wurde das T₇-Expressionssystem für die Expression der Lipase und deren Helferprotein aus *Chromobacterium viscosum* gewählt. Analog der erfolgreichen Konstrukte bei der Expression von *lip* und *act* aus *Pseudomonas species* KWI 56 wurden auch die Plasmide für die rekombinante Expression von *lipA* und *lipB* aus *Chromobacterium viscosum* konstruiert (Abb. 3.2.5). Alle Konstrukte basieren auf dem Vektor pET20b(+), der den starken T₇-Promotor trägt, die Expression erfolgt in *E. coli* BL21(DE3).

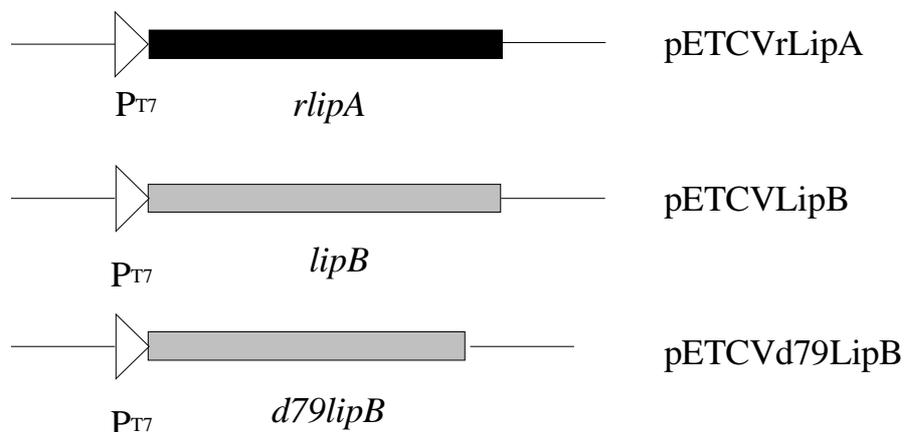


Abbildung 3.2.5: Expressionskonstrukte für die Lipase und das Helferprotein aus *Chromobacterium viscosum* in pET20b(+).

Die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* besitzt eine Signalsequenz, die aus den ersten N-terminalen 39 Aminosäuren besteht. Diese Signalsequenz wird in *Chromobacterium viscosum* bei der Prozessierung zur reifen Lipase abgespalten. Da die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 nur ohne ihre Signalsequenz erfolgreich überexprimiert werden konnte, wurde für die Expression der Lipase aus *Chromobacterium viscosum* das Gen für die reife Lipase (*rlipA*) mittels PCR aus dem Plasmid pCV1-6 amplifiziert und dabei eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle an das 5' Ende und eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle an das 3' Ende von *rlipA* angehängt. Über diese beiden Restriktionsschnittstellen wurde *rlipA* unter die Kontrolle des T₇-Promotors in den Vektor pET20b(+) kloniert. Das hieraus resultierende Expressionsplasmid für die reife Lipase aus *Chromobacterium viscosum* wurde mit pETCVrLipA bezeichnet (Abb. 3.2.5).

Für die rekombinante Expression des Helferproteins aus *Chromobacterium viscosum* in *E. coli* wurden 2 Konstrukte untersucht (Abb. 3.2.5). Zur Konstruktion des ersten Plasmids, pETCVLipB, wurde das komplette Gen für das Helferprotein (*lipB*) durch PCR aus Plasmid pCV1-6 amplifiziert und hierbei eine *NdeI*- bzw. eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle an den Enden eingeführt. Mit Hilfe dieser Restriktionsschnittstellen wurde *lipB* in pET20b(+) eingefügt.

Der Konstruktion des zweiten Plasmides, pETd79LipB, lagen verschiedene Überlegungen zugrunde. Schon Frenken *et al.* postulierten unter den ersten 70 oder 80 N-terminalen Aminosäureresten des Helferproteins von *Pseudomonas glumae* mindestens eine, eher zwei Transmembran-Helices (Frenken *et al.*, 1993a). Auch bei den Helferproteinen einer Reihe weiterer verwandter *Pseudomonas* Lipasen wurden mittels Hydrophobizitätsplots sehr hydrophobe Bereiche am N-Terminus gefunden. Für die Helferproteine der Lipasen aus *Pseudomonas cepacia* ATCC21808 (Quyen *et al.*, 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (Shibata *et al.*, 1998b) und *Pseudomonas species* KWI 56 (diese Arbeit, Kapitel 3.1.4) konnte gezeigt werden, daß die N-terminalen hydrophoben Sequenzen nicht für die Funktion des Helferproteins bei der Vermittlung der Faltung der Lipase in ihre aktive Form erforderlich ist. Da die exakte Position des Membranankers nicht bekannt ist, wurden Sequenz-Alignments der Helferproteine aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* durchgeführt (vergl. Kapitel 4.5). Das Helferprotein aus *Chromobacterium viscosum* wurde daraufhin entsprechend dem gekürzten Helfer aus *Pseudomonas species* KWI 56 um 79 N-terminale Aminosäuren verkürzt. Hierzu wurde das am 5' Ende um 237 bp verkürzte Gen für das Helferprotein (*d79lipB*) mittels PCR aus Plasmid pCV1-6 amplifiziert und hierbei eine

*Nde*I-Restriktionsschnittstelle an das 5' Ende und eine *Eco*RI-Restriktionsschnittstelle an das 3' Ende von *d79lipB* angehängt. Die beiden Restriktionsschnittstellen wurden zur Klonierung von *d79lipB* in den Vektor pET20b(+) verwendet. Der so entstandene Expressionsvektor wurde mit pETCVd79LipB bezeichnet (Abb. 3.2.5).

Alle für die rekombinante Expression der Lipase und des Helferproteins aus *Chromobacterium viscosum* verwendeten Plasmide wurden mittels DNA-Sequenzierung auf die Richtigkeit ihrer DNA-Sequenz überprüft.

3.2.2.2 Expression der Lipase und ihres Helferproteins aus *Chromobacterium viscosum*

Die rekombinante Expression der Lipase und deren spezifischen Helferproteins aus *Chromobacterium viscosum* erfolgte mit den im vorigen Abschnitt beschriebenen Plasmiden im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) im Schüttelkolben (vergl. Kapitel 2.5.4). Die Expressionsraten wurden durch SDS-PAGE des Gesamtzellproteins analysiert (Abb. 3.2.6).

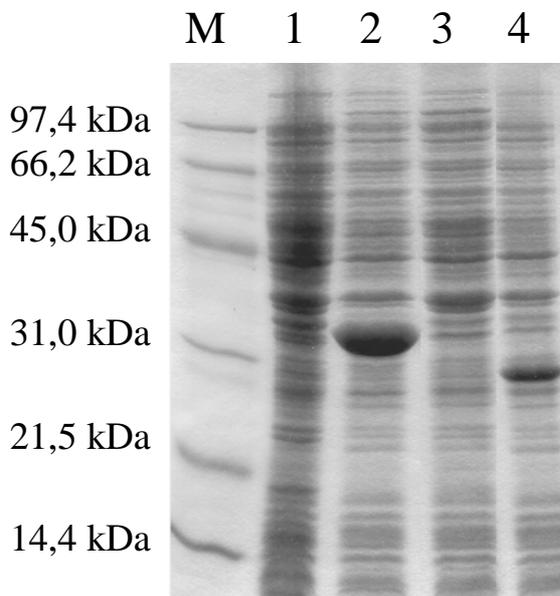


Abbildung 3.2.6: SDS-PAGE-Analyse der Expression der rekombinanten Lipase und deren Helferproteins aus *Chromobacterium viscosum* in *E. coli* BL21(DE3). Die Proteine wurden mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt. Spuren: Zellysat aus BL21(DE3) mit (1) pET20b(+), (2) pETCVrLipA, (3) pETCVLipB, (4) pETCVd79LipB.

Bei der Expression der reifen Lipase aus *Chromobacterium viscosum* (rLipA) wurde eine Ausbeute von 50 % des Gesamtzellproteins erreicht (Abb. 3.2.6, Spur 2). Die 33,1 kDa schwere Lipase lag nahezu inaktiv (0,2 U/ml im Überstand nach Ultraschallaufschluß der Zellen) in Inclusion-Bodies aggregiert in *E. coli* vor. Dieses Ergebnis entspricht den

Erwartungen und steht in Einklang mit den Erfahrungen bei der rekombinanten Expression der Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 und der Literatur (vergl. Kapitel 3.1.2.3). Alle Lipasen aus der Familien I und II der *Pseudomonas*-Lipasen, zu denen auch die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* gehört, benötigen zur korrekten Faltung in ihre aktive Form ihr spezifisches Helferprotein (Frenken *et al.*, 1993a; Frenken *et al.*, 1993b; Hobson *et al.*, 1993; Ihara *et al.*, 1992; Iizumi & Fukase, 1994a; Quyen *et al.*, 1999).

Das 37 kDa schwere Helferprotein der Lipase aus *Chromobacterium viscosum* konnte als ganzes (LipB) nicht in *E. coli* überexprimiert werden. Die Expression von *lipB* auf dem Plasmid pETCVLipB führte zu keiner zusätzlichen Bande nach SDS-PAGE (Abb. 3.2.6, Spur 3). Bei der Expression des um 79 Aminosäuren gekürzten Helferproteins hingegen konnte eine Expression von ca. 25 % des Gesamtzellproteins erreicht werden (Abb. 3.2.6, Spur 4).

3.2.3 *In-vitro*-Refolding der Lipase aus *Chromobacterium viscosum*

3.2.3.1 Schnell-Refolding

Um die rekombinante Lipase aus *Chromobacterium viscosum*, die inaktiv in *E. coli* in Inclusion-Bodies aggregiert vorliegt, mit Hilfe ihres spezifischen Helferproteins in ihre aktive Form zu falten, wurde das bereits für die in *E. coli* exprimierte Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 etablierte, schnelle und effektive *In-vitro*-Refolding angewandt (vergl. Kapitel 3.1.4).

E. coli Zellen, die rekombinant exprimierte Lipase enthalten, sowie *E. coli* Zellen, die rekombinant exprimiertes Helferprotein enthalten, wurden jeweils mit 8 M Harnstoff aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Die im Überstand befindliche, denaturierte Lipase konnte direkt zum Refolding mit dem ebenfalls im Überstand denaturierten Helferprotein eingesetzt werden. Das *In-vitro*-Refolding erfolgte unter den für das Refolding der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 optimierten Bedingungen für 24 h bei 4°C in Wasser, wobei jeweils äquimolare Mengen an Lipase und Helfer in einer Endkonzentration von ca. 50 bis 100 µg/ml eingesetzt wurden (vergl. Kapitel 2.8.5). Die Mengen an Lipase und Helferprotein wurden über SDS-PAGE

abgeschätzt. Für die rekombinant in *E. coli* exprimierte Lipase aus *Chromobacterium viscosum* konnten mit diesem schnellen und sehr effizienten *In-vitro*-Refolding Ausbeuten von 190 000 U/g Zellen (Substrat: Triolein) erreicht werden (Tab. 3.2.4).

Tabelle 3.2.4: Ausbeute der rekombinant in *E. coli* exprimierten Lipase aus *Chromobacterium viscosum* nach *In-vitro*-Refolding. Die Aktivität der Lipase wurde im pH-Stat-Assay mit verschiedenen Substraten bestimmt.

Substrat	Ausbeute in [U/g Zellnaßgewicht]
Tributyryn (C4)	180 000 U/g
Tricaprylin (C8)	350 000 U/g
Trimyristin (C14)	340 000 U/g
Triolein (C18)	190 000 U/g

3.2.3.2 Aufschlußmethoden

Für das Schnell-Refolding der Lipase aus *Chromobacterium viscosum* wurden die Lipase bzw. Helferprotein exprimierenden *E. coli* Zellen mit 8 M Harnstoff aufgeschlossen. Sowohl Lipase als auch Helferprotein lagen so denaturiert im Überstand des Harnstoffaufschlusses vor (rLipA H und d79LipB H). Um zu überprüfen, ob die Zellaufschlußmethode einen Einfluß auf die Ausbeute im Refolding hat, wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Da die Lipase in *E. coli* in Inclusion-Bodies aggregiert, lag sie nach dem Ultraschallaufschluß im Pellet vor und konnte erst unter Einsatz von Harnstoff solubilisiert werden. Sie lag dann ebenfalls denaturiert vor, war jedoch weitgehend von anderen Zellproteinen befreit (rLipA UH). Das Helferprotein befand sich nach dem Ultraschallaufschluß in Lösung im Überstand, war also im nativen Zustand (d79LipB U). rLipA H, rLipA UH, d79LipB H und d79LipB U wurden im *In-vitro*-Refolding unter den oben angegebenen Standardbedingungen

eingesetzt. Zusätzlich wurde die Effizienz des *In-vitro*-Refoldings in Abwesenheit des spezifischen Helferproteins untersucht. Abbildung 3.2.7 zeigt die Ausbeute an aktiver Lipase nach dem Refolding. Der Reinigungsgrad der im *In-vitro*-Refolding eingesetzten Lipase hat keinen Einfluß auf das Refolding. Das Helferprotein kann sowohl im denaturierten als auch im nativen Zustand für das *In-vitro*-Refolding eingesetzt werden, die Effizienz wird dadurch nicht beeinflußt. Das Refolding der Lipase aus *Chromobacterium viscosum* in Abwesenheit ihres spezifischen Helferproteins führt nur zu etwa 10 % der beim Refolding mit Helfer gewonnenen Aktivität.

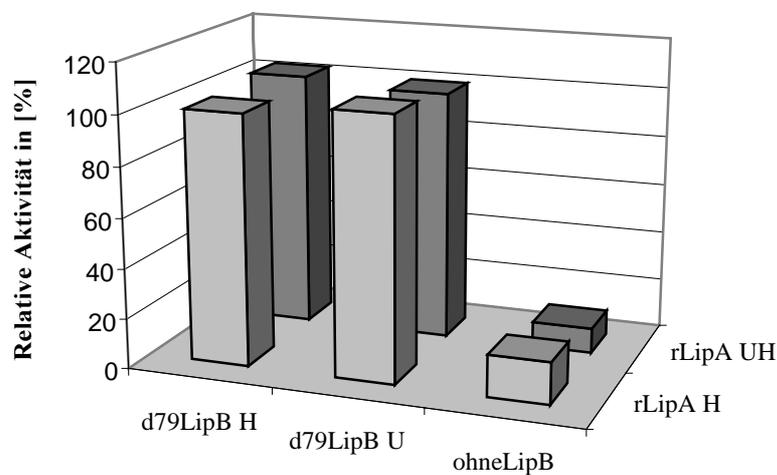


Abbildung 3.2.7: Einfluß der Aufschlußmethode auf die Aktivität der rekombinanten *Chromobacterium viscosum* Lipase nach dem *In-vitro*-Refolding. Denaturierte Lipase (rLipA H oder rLipA UH) wurde unter Einsatz des denaturierten Helferproteins (d79LipB H) und des nativen Helferproteins (d79LipB U) bzw. ohne Helferprotein *in vitro* rekonstituiert. Die nach dem Refolding gewonnene Aktivität wurde mit dem pNPP-Assay bestimmt und ist in [%] angegeben, wobei die nach dem Refolding von rLipA H mit d79LipB H erhaltene Aktivität als 100 % gewählt wurde.

3.2.3.3 Reinigung von Inclusion-Bodies und Bestimmung der spezifischen Aktivität

Da die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* in *E. coli* in Inclusion-Bodies aggregiert vorliegt, kann die Lipase relativ einfach gereinigt werden. Die nach dem Zellaufschluß

gewonnenen Inclusion-Bodies konnten mit Hilfe verschiedener Waschschriffe gereinigt und anschließend in 8 M Harnstoffpuffer solubilisiert werden (vgl. Kapitel 2.8.2.2). Die aus den Inclusion-Bodies gereinigte Lipase wurde im SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.2.9).

Die gereinigte Lipase wurde in Anwesenheit ihres denaturierten Helferproteins *in vitro* rekonstituiert. Die spezifische Aktivität der aus Inclusion-Bodies gereinigten Lipase liegt bei 2800 U/mg im Refolding eingesetzter Lipase (Substrat: Triolein). Bezogen auf die *E. coli* Zellmasse, aus der die Lipase gewonnen wurden, liegt die Aktivität bei 190 000 U/g Zellen, die Ausbeute bei der Reinigung ist also praktisch 100 %.

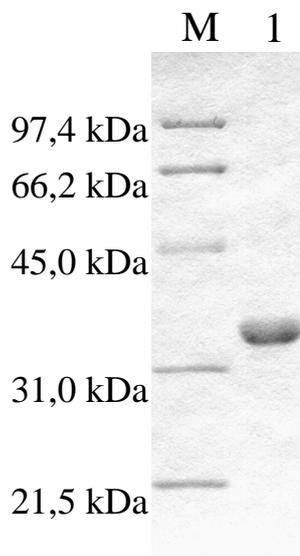


Abbildung 3.2.9: SDS-PAGE der aus Inclusion-Bodies gereinigten rekombinanten Lipase aus *Chromobacterium viscosum*. Die Proteine wurden mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt. Spuren: (M) LMW-Standard, (1) gereinigte rLipB.

3.2.3.4 Refoldingkinetik

Zur Untersuchung des Einflusses von Temperatur und Dauer des *In-vitro*-Refoldings der Lipase aus *Chromobacterium viscosum* wurde die Entwicklung der Lipaseaktivität über einen Zeitraum von 2 Tagen beim Refolding bei 4°C und bei Raumtemperatur verfolgt (Abb. 3.2.8). Die Aktivierung der Lipase folgt einer Sättigungkinetik. Nach etwa 10 h erreicht die Aktivität ihr Maximum, das sie bei 4°C über mehrere Wochen hält (nicht gezeigt). Bei RT fällt die Aktivität nach einem Tag langsam, aber kontinuierlich ab. Generell liegt die beim *In-vitro*-Refolding bei RT erreichte Lipaseaktivität etwa 25 % unter der bei 4°C erreichten Aktivität.

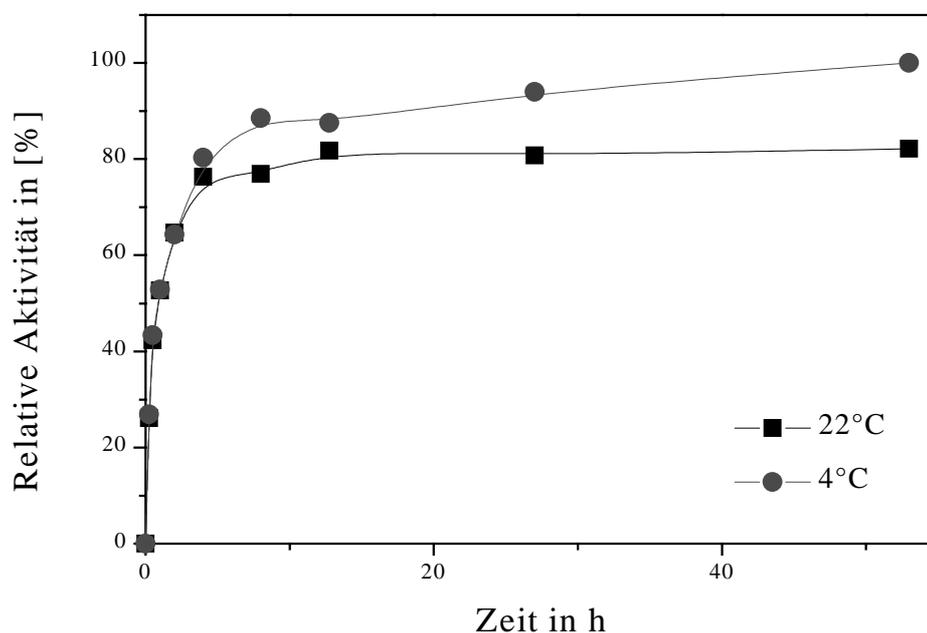


Abbildung 3.2.8: Kinetik des *In-vitro*-Refoldings der rekombinanten Lipase aus *Chromobacterium viscosum* bei 4°C und bei RT. Die Aktivität der Lipase wurde mit dem pNPP-Assay bestimmt und ist in [%] angegeben. Die nach 48 h *In-vitro*-Refolding bei 4°C erreichte Lipase-Aktivität wurde als 100 % angenommen.

3.2.4 Charakterisierung der Lipase aus *Chromobacterium viscosum*

Für die Charakterisierung der rekombinanten Lipase aus *Chromobacterium viscosum* wurde die aus Inclusion-Bodies gereinigte Lipase dem *In-vitro*-Refolding mit ihrem spezifischen Helferprotein unter den oben beschriebenen Standardbedingungen unterzogen. Wenn nicht anders vermerkt, wurde für die Charakterisierung die Lipase direkt aus dem Refolding-Ansatz verwendet.

3.2.4.1 Einfluß der Temperatur auf die Lipaseaktivität

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Aktivität der rekombinant in *E. coli* exprimierten Lipase aus *Chromobacterium viscosum* wurde die Lipaseaktivität mit dem pNPP-Assay bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen (s. Kapitel 2.7.4.1). Die Lipase zeigte ihre maximale Aktivität bei 60°C (Abb. 3.2.10). Bei 50°C konnten lediglich 64 % der maximalen Aktivität gemessen werden. Bei 80°C wurden noch 62 % der maximalen Aktivität gefunden.

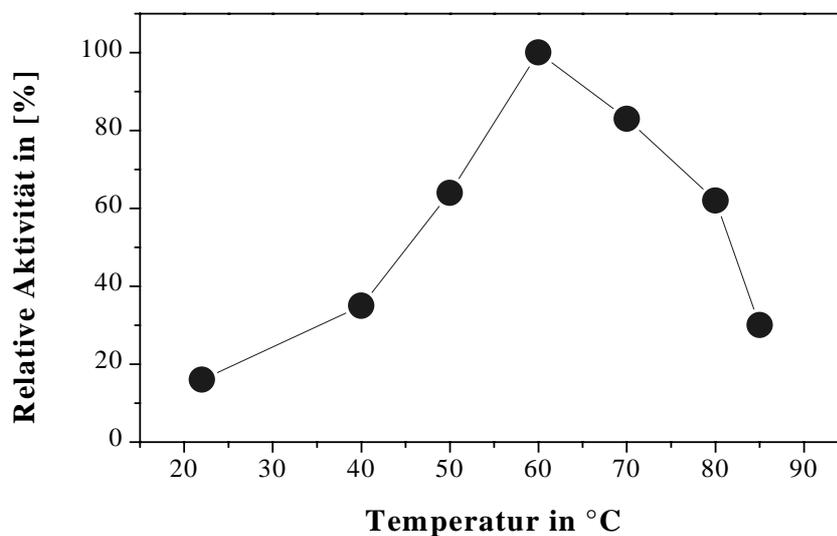


Abbildung 3.2.10: Einfluß der Temperatur auf die Aktivität der rekombinanten Lipase aus *Chromobacterium viscosum*. Die relative Aktivität wurde mit dem pNPP-Assay bei verschiedenen Temperaturen bestimmt und ist in [%] angegeben. 100 % entsprechen der Aktivität der Lipase bei 60°C.

3.2.4.2 Temperaturstabilität

Zur Untersuchung der Stabilität der rekombinanten Lipase aus *Chromobacterium viscosum* wurden Aliquots der Lipaselösung bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und die verbliebene Restaktivität mit dem pNPP-Assay bestimmt (vergl. Kapitel 2.7.4.1). Die Lipase ist bis 50°C über mindestens 16 h stabil, bei 60°C bleibt die Lipase etwa 0,5 h stabil, verliert aber dann rasch ihre Aktivität. Bei 70°C sind bereits nach 30 min nur noch 9 % Restaktivität vorhanden (Abb. 3.2.11).

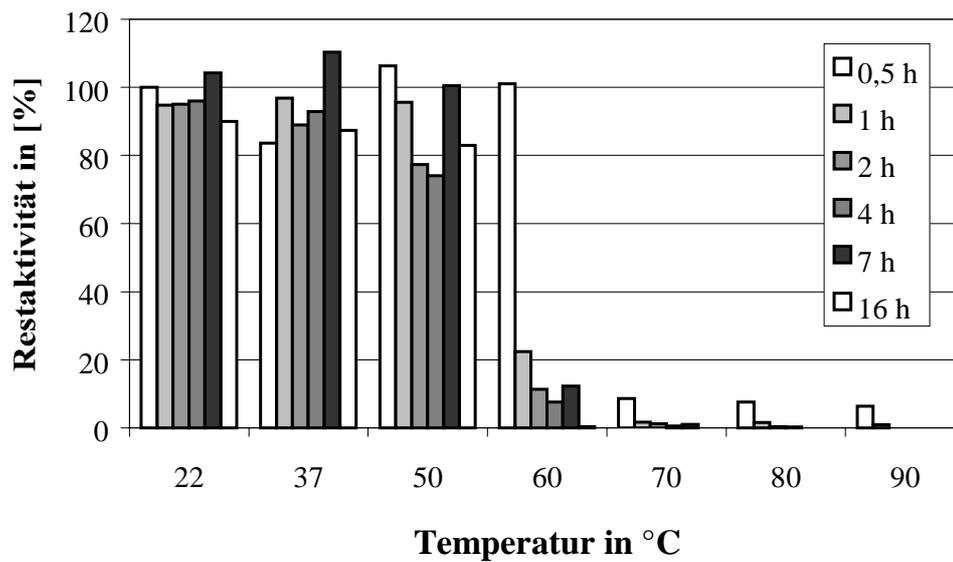


Abbildung 3.2.11: Temperaturstabilität der rekombinanten *Chromobacterium viscosum* Lipase. Die Restaktivität wurde mit dem pNPP-Assay bestimmt und ist in [%] angegeben. Die eingesetzte Aktivität bei 0 h wurde als 100 % angenommen.

3.2.4.3 Einfluß des pH-Wertes auf die Lipaseaktivität

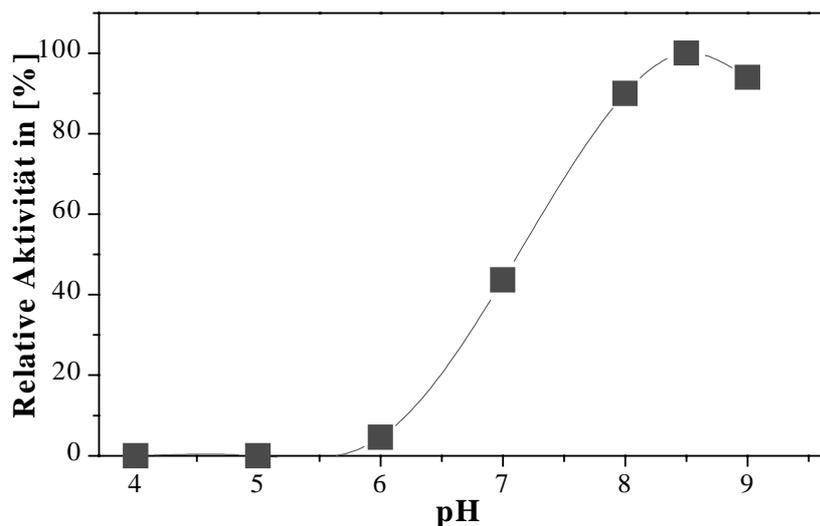


Abbildung 3.2.12: Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der rekombinanten Lipase aus *Chromobacterium viscosum*. Die relative Aktivität wurde im pH-Stat mit Tributyrin als Substrat bestimmt und ist in [%] angegeben. 100 % entsprechen der Aktivität bei pH 8,5.

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der rekombinanten Lipase aus *Chromobacterium viscosum* wurde im pH-Stat bei unterschiedlichen pH-Werten mit Tributyrin als Substrat bei 60°C bestimmt (s. Kapitel 2.7.4.2 und 2.7.3.2). Das pH-Optimum der Lipase liegt bei pH 8,5 (Abb. 3.2.12). Bei pH 8 und pH 9 wurden 90 % bzw. 94 % der maximalen Aktivität gemessen. Bis pH 6 ist die Lipase nahezu inaktiv, bei pH 7 konnten 44 % der Aktivität bei pH 8,5 detektiert werden.

3.2.4.4 pH-Stabilität

Zur Untersuchung der pH-Stabilität der rekombinanten Lipase aus *Chromobacterium viscosum* wurde die Lipase in Puffern unterschiedlicher pH-Werte für 16 h inkubiert und die verbliebene Restaktivität mit dem pNPP-Assay bei pH 8,0 gemessen (s. Kapitel 2.7.4.2). Die Lipase ist im pH-Bereich von pH 7 bis pH 11 sehr stabil (Abb. 3.2.13). Nach 16-stündiger Inkubation bei 30°C in Puffern der pH-Werte pH 7 bis pH 9 konnten 90 % bis 121 % der ursprünglich eingesetzten Lipaseaktivität wiedergefunden werden. Nach Inkubation in Puffern der pH-Werte pH 3, pH 4 und pH 12 waren noch maximal 13 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden, während die Restaktivität bei pH-Werten über 4 wieder stieg.

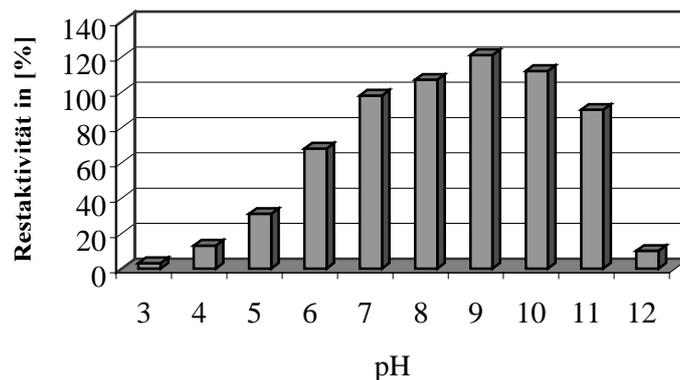


Abbildung 3.2.13: Stabilität der Lipase aus *Chromobacterium viscosum* bei verschiedenen pH-Werten. Die Restaktivität wurde mit dem pNPP-Assay bestimmt und ist in [%] angegeben. Die eingesetzte Aktivität wurde mit 100 % angenommen.

3.2.4.5 Einfluß von CaCl_2 auf die Lipaseaktivität

Der Zusatz von 10 mM CaCl_2 zur Tributyrin- bzw. Triolein-Substratlösung bei der Messung der Lipase-Aktivität im pH-Stat-Assay hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der rekombinanten Lipase aus *Chromobacterium viscosum*. Die spezifische Aktivität der Lipase war mit und ohne Zusatz von CaCl_2 2800 U/mg.

3.2.4.6 Substratspezifität der Lipase

Zur Untersuchung der Spezifität der rekombinanten Lipase aus *Chromobacterium viscosum* gegenüber unterschiedlichen Acylkettenlängen wurde im pH-Stat zunächst die Lipaseaktivität mit verschiedenen Triacylglyceriden als Substrat gemessen (Abb. 3.2.14). Die Lipase zeigte bei 60°C und pH 8,5 mit Tricaprylin (C8) und Trimyristin (C14) die höchste Aktivität. Die Aktivität mit Tributyrin (C4), Tricaprin (C10), Tripalmitin (C16) und Triolein (C18) beträgt nur etwa die Hälfte der maximalen Aktivität. Dennoch setzte die Lipase alle Substrate um, ihr Substratspektrum ist relativ breit.

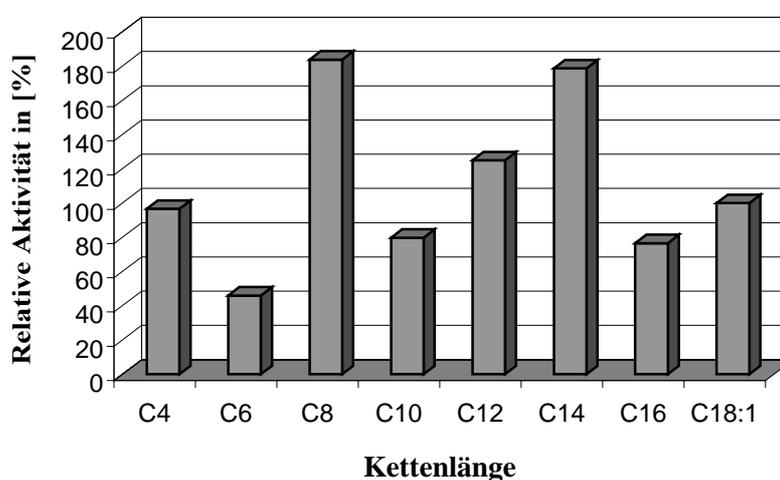


Abbildung 3.2.14: Substratspektrum der rekombinanten *Chromobacterium viscosum* Lipase. Die Lipaseaktivität wurde im pH-Stat-Assay gegenüber Triacylglyceriden unterschiedlicher Acylkettenlängen gemessen. Die Aktivität mit Triolein als Substrat wurde als 100 % angenommen, die Aktivitäten mit anderen Substraten sind als relative Aktivität in [%] angegeben.

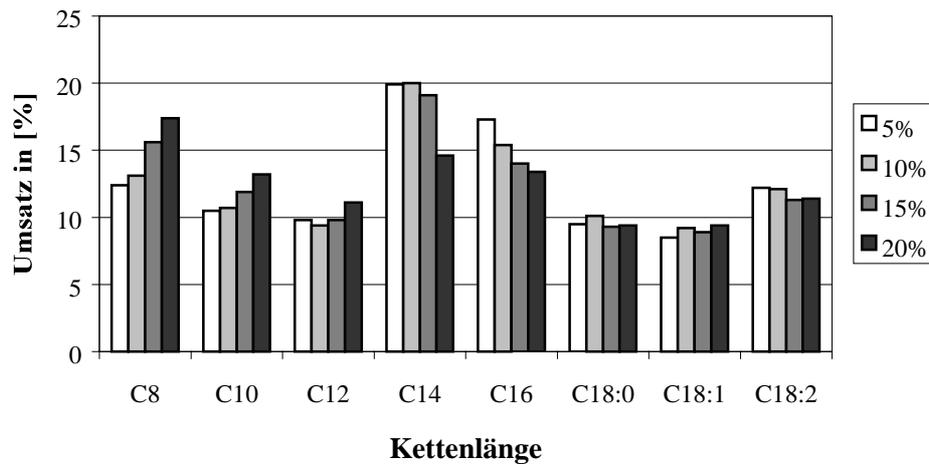


Abbildung 3.2.15: Kettenlängenspezifität der rekombinanten *Chromobacterium viscosum* Lipase. Zur Bestimmung der Kettenlängenspezifität wurde ein Gemisch aus verschiedenen Triglyceriden mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen an allen 3 Positionen („Random oil“, Unilever) hydrolysiert. Die freigesetzten Fettsäuren wurden nach einem Gesamtumsatz von 5, 10, 15 bzw. 20% im GC analysiert. Der Anteil der abgespaltenen Fettsäuren jeder Kettenlänge ist in [%] angegeben.

In einem zweiten Experiment wurde die Kettenlängenspezifität der rekombinanten Lipase aus *Chromobacterium viscosum* in einem kompetitiven Assay mit „Random oil“ untersucht. „Random oil“ ist ein synthetisches Öl, in dem die Fettsäurereste mit einer Kettenlänge von C8 bis C18 auf alle drei Positionen gleichverteilt vorliegen. Dieses Öl wurde im pH-Stat zu 5 % bis 20 % umgesetzt und die abgespaltenen Fettsäuren im GC analysiert (Abb. 3.2.15). Auch in diesem Experiment zeigte sich die Präferenz der Lipase für mittelkettige Fettsäuren. Zu Beginn der Reaktion erzielte Myristinsäure (C14) die höchste Umsatzrate. Mit fortschreitendem Gesamtumsatz wurde am meisten Caprylsäure (C8) freigesetzt. Das Spektrum der *Chromobacterium viscosum* Lipase ist dennoch sehr breit. Alle 8 im Gemisch vorhandenen Fettsäurereste wurden zu Anteilen zwischen 9 % und 20 % umgesetzt.

3.3 Spezifität der Helferproteine

Um die Spezifität der Helferproteine gegenüber ihrer Lipase zu untersuchen, wurden *In-vitro*-Cross-Refolding-Studien durchgeführt. Die Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56, *Chromobacterium viscosum* und *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808 wurden in Anwesenheit jeweils eines der verkürzten Helferproteine aus *Pseudomonas species* KWI 56, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808 und *Pseudomonas aeruginosa* TE 3285 dem Standard-*In-vitro*-Refolding-Prozeß unterworfen.

Die rekombinante Expression von Lipase und Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* in *E. coli* sind in dieser Arbeit beschrieben (Kapitel 3.1 und 3.2), die rekombinante Expression von Lipase und Helfer aus *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808 wurde von Quyen *et al.* (1999) veröffentlicht. Das Gen für das Helferprotein von *Pseudomonas aeruginosa* TE 3285 wurde am ITB ebenfalls synthetisiert und in einer verkürzten Form entsprechend der anderen hier beschriebenen *Pseudomonas*-Helfer rekombinant in *E. coli* exprimiert (Dieterich, 1998). Tabelle 3.3.1 zeigt die im Cross-Refolding verwendeten Konstrukte.

Tabelle 3.3.1: Im Cross-Refolding verwendete Lipasen und Helferproteine.

	Expressionsvektor	exprimiertes Protein
Lipase aus <i>Ps. spec.</i> KWI 56	pETKWIrLip	rLip
Helfer aus <i>Ps. spec.</i> KWI 56	pKWIOmpAd70Act	OmpAd70Act
Lipase aus <i>C. viscosum</i>	pETCVrLipA	rLipA
Helfer aus <i>C. viscosum</i>	pETCVd79LipB	d79LipB
Lipase aus <i>Ps. cepacia</i>	pT-Lip-Hp	rLip
Helfer aus <i>Ps. cepacia</i>	pT-ompAd70HpHis	OmpAd70HpHis
Helfer aus <i>Ps. aeruginosa</i>	pTEompAd67LipB	OmpAd67LipB

Die Cross-Refolding-Studien wurden unter den für die Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* optimierten *In-vitro*-Refolding Bedingungen

durchgeführt. Das Refolding erfolgte in H₂O bei 4°C für 24 h mit einer Lipasekonzentration von 50-100 µg /ml Refoldingansatz.

Die nach dem Refolding der rekombinanten Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56, *Chromobacterium viscosum* und *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808 mit den Helferproteinen aus *Pseudomonas species* KWI 56, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808 und *Pseudomonas aeruginosa* TE 3285 erhaltene Aktivität ist in Abbildung 3.3.1 dargestellt. Die drei untersuchten Lipasen aus der Gruppe II der *Pseudomonas*-Lipasen können mit allen drei Helferproteinen aus Gruppe II effizient in ihre aktive Form gefaltet werden. Die Lipaseaktivitäten, die mit den verwandten Helferproteinen erreicht wurden, liegen zwischen 72 % und 120 % der im Refolding mit dem jeweils spezifischen Helferprotein gewonnenen Aktivität.

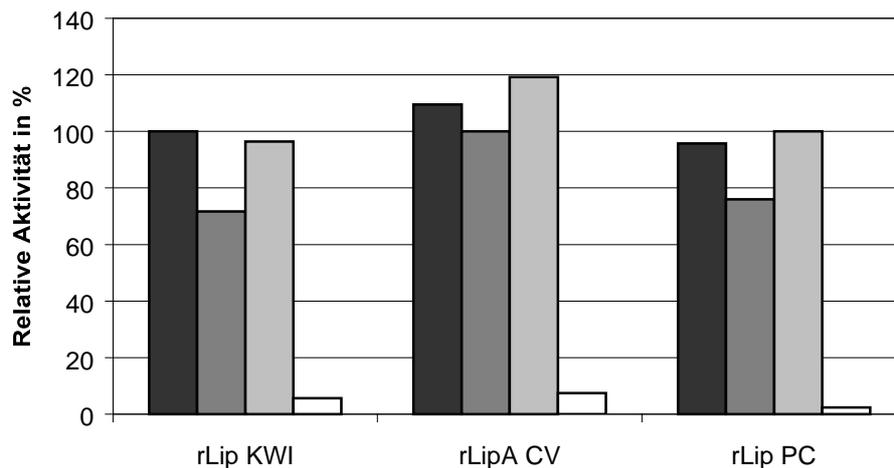


Abbildung 3.3.1: Austausch der Helferproteine beim Refolding der rekombinanten Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 (rLip KWI), *Chromobacterium viscosum* (rLipA CV) und *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808 (rLip PC). Jede Lipase wurde mit allen drei Helferproteinen der Gruppe II der *Pseudomonas*-Lipasen (OmpAd70Act aus *Pseudomonas species* KWI 56: schwarz; d79LipB aus *Chromobacterium viscosum*: dunkelgrau; OmpAd70HpHis aus *Pseudomonas cepacia* ATCC21808: hellgrau) und dem Helferprotein der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (OmpAd67LipB: weiß) rückgefaltet. Die Balken zeigen die relative Aktivität der Lipasen nach dem Refolding in [%] an. Die mit dem jeweils für die Lipase spezifischen Helferprotein erreichten Aktivitäten wurden als 100 % angenommen.

Beim Refolding der Lipasen in Anwesenheit des für die Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* TE 3285, einem Mitglied der Gruppe I der *Pseudomonas*-Lipasen, spezifischen Helferproteins, konnten lediglich 2 % bis 7 % der maximalen Lipaseaktivität gemessen werden. Dies entspricht der Aktivität, die auch bei der Rückfaltung ohne Helferprotein erreicht wird. Das für die Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* TE 3285 spezifische Helferprotein vermag also keinerlei Aktivierung der *Pseudomonas*-Lipasen aus der Gruppe II zu vermitteln.

4 DISKUSSION

In der Biotechnologie spielen *Pseudomonas* Lipasen in der organischen Synthese bei der Herstellung optisch aktiver Substanzen und als Zusätze von Detergentien eine wichtige Rolle (Reetz & Jaeger, 1998; Sobéron-Chávez & Palmeros, 1994). Bisher werden die *Pseudomonas*-Lipasen entweder direkt aus dem Wirtstamm isoliert oder in rekombinanten *Pseudomonas*-Stämmen homolog exprimiert (Gerritse *et al.*, 1998; Hom *et al.*, 1991a; Nakamura *et al.*, 1992). Allerdings nimmt die Lipaseproduktion in rekombinanten *Pseudomonas*-Stämmen oft aufgrund der Größe und der damit verbundenden Instabilität der Expressionsplasmide mit der Zeit ab. Außerdem sind die meisten *Pseudomonas*-Stämme, die momentan für die homolog rekombinante Expression der Lipasen verwendet werden, potentiell pathogen (Sicherheitsstufe S2 in Deutschland). Bei der Lipaseproduktion sind daher besondere Sicherheitsvorkehrungen erforderlich. Um Risiken zu vermeiden und eine kostengünstige Produktion zu ermöglichen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein rekombinantes Expressionssystem für die Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* in *E. coli* etabliert und ein schnelles und effektives *In-vitro*-Refolding entwickelt.

4.1 Gensynthese

Um eine optimale Expression der Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* in *E. coli* zu erreichen, wurden die Gene für die beiden Lipasen und deren spezifische Helferproteine *de novo* synthetisiert (Kapitel 3.1.1). Die Gensynthese bietet die Möglichkeit, komplexe DNA-Sequenzen oder Gene, die durch Klonierung aus dem Wirtstamm nicht gewonnen werden können, synthetisch herzustellen (Brocca *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1994; Stemmer *et al.*, 1995). Das Design der Gene für die Lipasen und deren Helferproteine aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* erfolgte unter Ausnutzung verschiedener Vorteile der Gensynthese (Kapitel 3.1.1.1). So wurde zum Erreichen maximaler Proteinausbeuten und zur Verhinderung einer Wachstumsinhibierung (Kane, 1995; Mattes, 1993; Zahn, 1996) bei der Überexpression von Lipase und Helferprotein in *E. coli* die Codon-Usage der Gene für die rekombinante Expression in *E. coli* optimiert.

Zur Erleichterung molekularbiologischer Arbeiten wurde gleichzeitig der GC-Gehalt der DNA, der in Pseudomonaden normalerweise über 70 % beträgt (West & Iglewski, 1988), um bis zu 13 % reduziert (Tab. 3.1.1). Außerdem konnten die Gene für die Lipasen und Helferproteine aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* durch Einführung strategisch positionierter singulärer Restriktionsschnittstellen in Fragmente unterteilt werden (Abb. 3.1.1).

Die Gene für die Lipasen und Helferproteine aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* wurden erfolgreich mit der Methode der „self priming PCR“ (Ausubel *et al.*, 1994; Dillon & Rosen, 1990; Prodromou & Pearl, 1992) synthetisiert. Von beiden Stämmen wurden die Gene für Lipase und Helferprotein jeweils aus insgesamt 24 langen, sich um 20 bp überlappenden Oligonukleotiden mit Hilfe von PCR synthetisiert und in anschließenden Klonierungsschritten zu einem 2,2 kb großen DNA-Fragment zusammengefügt (Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.2). Diese PCR-basierte Methode der Gensynthese ist sehr effizient und wirtschaftlicher bzw. kostengünstiger als die Gensynthese durch Ligation oder DNA Shuffling von kurzen Oligonukleotiden. Bei den letzteren Methoden müssen beide Stränge der DNA durch die Oligonukleotide abgedeckt werden und im Falle der Ligationsmethode sind zusätzlich phosphorylierte Oligonukleotide erforderlich (Chen *et al.*, 1994; Jayaraman, 1995).

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Gensynthese mittels „self priming PCR“ zeigte sich, daß der entscheidende Faktor neben der „Proofreading“-Aktivität der verwendeten Polymerase insbesondere die Qualität und Homogenität der für die PCR eingesetzten langen Oligonukleotide ist.

4.2 Rekombinante Expression der *Pseudomonas*-Lipasen und deren spezifischen Helferproteine in *E. coli*

Die Lipasen aus Pseudomonaden können aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen in drei Familien unterteilt werden (Gilbert, 1993). Danach gehören sowohl die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 als auch die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* zur Familie II der *Pseudomonas*-Lipasen, wobei die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* identisch mit der Lipase aus *Pseudomonas glumae* ist (Schrag *et al.*, 1997; Taipa *et al.*, 1995). Die *Pseudomonas*-Lipasen der Familien I und II benötigen für ihre aktive Expression ein lipase-spezifisches Helferprotein, welches die korrekte Faltung der Lipasen in ihre aktive

Form vermittelt (Frenken *et al.*, 1993a; Hobson *et al.*, 1993; Ihara *et al.*, 1995; Iizumi & Fukase, 1994a). Daher ist für die funktionelle Expression der Lipasen in einem heterologen Wirtstamm die Koexpression des Helferproteins unbedingt erforderlich.

In dieser Arbeit wurden zunächst verschiedene Konstrukte für die rekombinante Expression der Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* in *E. coli* untersucht (Kapitel 3.1.2 und 3.2.2). In Tabelle 4.1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Expressionskonstrukte zusammengefaßt.

Die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 konnte sowohl in ihrer reifen Form (rLip), d.h. ohne Signalsequenz, als auch als Fusionsprotein der reifen Lipase mit der ompA-Signalsequenz (OmpArLip) erfolgreich in *E. coli* überexprimiert werden. Dabei konnten mit den Expressionsplasmiden pETKWIrLip und pKWI OmpArLip jeweils Expressionsraten von über 50 % des Gesamtzellproteins erzielt werden. Die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* (rLipA) konnte ebenfalls in ihrer nativen Form ohne Signalsequenz mit einer Ausbeute von etwa 50 % mit dem Plasmid pETCVrLipA in *E. coli* überexprimiert werden. Beide Lipasen bildeten jedoch Inclusion-Bodies in *E. coli* und waren nicht aktiv. Dies war in der Literatur bereits für eine Vielzahl anderer in *E. coli* exprimierten *Pseudomonas*-Lipasen berichtet worden: In Zellsaten von rekombinanten *E. coli* Zellen, die Plasmide für die Expression von Lipase und auch Helferprotein enthielten, konnten jeweils nur sehr geringe Lipaseaktivitäten gemessen werden (Frenken *et al.*, 1993b; Ihara *et al.*, 1992; Iizumi & Fukase, 1994a; Jorgensen *et al.*, 1991; Oshima-Hirayama *et al.*, 1993).

Da in diesen Fällen die Koexpression des für die Lipase spezifischen Helferproteins nicht oder nur mit geringer Ausbeute erfolgte, wurde zunächst vermutet, daß die in der *E. coli* Zelle vorhandene Menge an rekombinantem Helferprotein nicht für die effektive Rückfaltung der rekombinanten Lipase ausreicht. *In-vitro*-Studien zum Faltungsmechanismus der *Pseudomonas*-Lipasen hatten gezeigt, daß für eine effektive Rückfaltung der Lipase in ihre aktive Form äquimolare Mengen an Lipase und Helferprotein erforderlich sind (Shibata *et al.*, 1998a). Quyen untersuchte daher die rekombinante Koexpression der Lipase und ihres Helferproteins aus *Pseudomonas cepacia* mit einem Expressionsplasmid, welches beide Gene unter einem eigenen Promotor trug (Quyen, 1998). Sowohl die Lipase als auch deren Helferprotein konnten mit einer Ausbeute von jeweils etwa 25 % Gesamtzellprotein in *E. coli* koexprimiert werden. Dabei zeigte sich jedoch, daß die Lipase auch in Anwesenheit ausreichender Mengen an Helferprotein in *E. coli* nicht aktiv vorliegt. Offensichtlich vermag das

Tabelle 4.1: Übersicht der Ergebnisse in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte zur heterologen Expression der Lipasen und Helferproteine aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* in *E. coli*.

Expressionskonstrukte	Expressionslevel in <i>E. coli</i> ^c	Aktivität nach <i>In-vitro</i> -Refolding
Lipase aus <i>Pseudomonas species</i> KWI 56		
P_L: pKWILipAct	keine	nicht bestimmt
pKWIrLipAct	keine	nicht bestimmt
pKWIrLip	keine	nicht bestimmt
pKWIompArLipAct	50 %	2000 U/g Zellen ^a
pKWIompArLip	50 %	1700 U/g Zellen ^a
P_{T7}: pETKWIrLip	50 %	310000 U/g Zellen ^b
Helfer aus <i>Pseudomonas species</i> KWI 56		
P_L: pKWIAct	keine	-
pKWId70Act	5-10 %	-
pKWIompAAct	keine	-
pKWIompAd70Act	50 %	-
P_{T7}: pETKWIAct	5 %	-
PETKWId70Act	50 %	-
Lipase aus <i>Chromobacterium viscosum</i>		
P_{T7}: pETCVrLipA	50 %	190000 U/g Zellen ^b
Helfer aus <i>Chromobacterium viscosum</i>		
P_{T7}: pETCVLipB	keine	-
pETCVd79Lip	25 %	-

^aIm pNPP-Assay (Substrat: pNPP) bestimmt. (Die mit dem pNPP-Assay gemessene Lipaseaktivität liegt aufgrund des Substrates generell um Faktor 10 unter den im pH-Stat mit Triolein als Substrat gemessenen Werten.)

^bIm pH-Stat (Substrat: Triolein) bestimmt.

^cin [%] des Gesamtzellproteins

rekombinante Helferprotein die Rückfaltung der *Pseudomonas*-Lipase in ihre aktive Form in *E. coli* nicht zu vermitteln. Zur Gewinnung aktiver Lipase, die rekombinant in *E. coli* exprimiert wurde, ist daher im Anschluß an die Expression ein *In-vitro*-Refolding der Lipase

unumgänglich (vergl. Kapitel 4.3) (Frenken *et al.*, 1993b; Ihara *et al.*, 1992; Iizumi & Fukase, 1994a; Jorgensen *et al.*, 1991; Oshima-Hirayama *et al.*, 1993; Quyen, 1998).

Aufgrund dieser bei der rekombinanten Expression verwandter *Pseudomonas*-Lipasen gewonnenen Erfahrungen, wurden in der vorliegenden Arbeit daher die Helferproteine der Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* von den Lipasen unabhängig kloniert und exprimiert.

Untersuchungen zur Funktion des Helferproteins zeigten, daß das Helferprotein in *Pseudomonas* mit einer N-terminalen hydrophoben Sequenz in der inneren Membran verankert ist (Frenken *et al.*, 1993b). Dieser Membrananker ist für die Funktion des Helferproteins bei der Rückfaltung der Lipase nicht erforderlich (El Khattabi *et al.*, 1999; Quyen *et al.*, 1999; Shibata *et al.*, 1998b). Allerdings beeinträchtigt er die rekombinante Expression der *Pseudomonas*-Helferproteine in *E. coli* stark. So war sowohl die Überexpression des Helferproteins aus *Pseudomonas species* KWI 56 als auch aus *Chromobacterium viscosum* in dieser Arbeit erst möglich, nachdem der Membrananker ganz entfernt oder durch die ompA-Signalsequenz ersetzt worden war (Kapitel 3.1.2 und 3.2.2). Das Helferprotein aus *Pseudomonas species* KWI 56 konnte mit den Expressionsplasmiden pKWIOmpAd70Act und pETKWId70Act mit Ausbeuten von etwa 50 % des Gesamtzellproteins exprimiert werden. Bei der Expression des Helferproteins aus *Chromobacterium viscosum* mit dem Plasmid pETCvd79LipB in *E. coli* wurde eine Expressionsrate von etwa 25 % erzielt. Ähnliche Resultate wurden auch für die lipase-spezifischen Helferproteine aus *Pseudomonas cepacia* (Quyen *et al.*, 1999) und aus *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet (Dieterich, 1998; Shibata *et al.*, 1998b).

4.3 *In-vitro*-Refolding

Das *In-vitro* Refolding der in *E. coli* heterolog exprimierten *Pseudomonas*-Lipasen resultierte bisher in relativ geringer Lipaseaktivität. Im allgemeinen konnten lediglich 5 bis 10 % der Aktivität der nativen Lipase gewonnen werden (Hobson *et al.*, 1993; Iizumi & Fukase, 1994a). Quyen *et al.* (1999) entwickelten jedoch ein einfaches und effizientes *In-vitro*-Refolding Protokoll, mit dem erstmals die quantitative Rückfaltung der rekombinanten in *E. coli* exprimierten Lipase aus *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808 unter Einsatz des ebenfalls in *E. coli* exprimierten lipase-spezifischen Helferproteins gelungen war.

In einer entsprechenden Refoldingprozedur konnten daraufhin die in der vorliegenden Arbeit heterolog in *E. coli* exprimierten Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* ebenfalls unter Einsatz ihres jeweils spezifischen Helferproteins effizient rückgefaltet werden (Kapitel 3.1.4 und 3.2.3). Die gewonnenen Lipaseaktivitäten, 310 000 U/g Zellen für die Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 (Substrat: Triolein) und 190 000 U/g Zellen für die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* (Substrat: Triolein) sind vergleichbar mit den veröffentlichten Werten der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808 (314 000 U/g Zellen) (Quyen *et al.*, 1999). Diese Ausbeuten übertreffen die in früheren Expressions- und Rückfaltungsversuchen gewonnenen Lipaseaktivitäten um das 10 bis 100-fache (Frenken *et al.*, 1993a; Frenken *et al.*, 1993b; Iizumi & Fukase, 1994a; Iizumi *et al.*, 1991).

Untersuchungen zum *In-vitro*-Refolding der Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 mit ihrem spezifischen Helferprotein zeigten, daß die reife Lipase sowohl in Anwesenheit des gekürzten Helferproteins als auch des mit *ompA* fusionierten Helferproteins quantitativ rückgefaltet werden kann (Kapitel 3.1.4.4). Offensichtlich ist der N-Terminus für die Funktion des Helferproteins nicht erforderlich und auch nicht in die zur Funktion notwendigen Struktur des Helferproteins involviert. Im Gegensatz hierzu erwies sich die Signalsequenz bei der mit *ompA* fusionierten reifen Lipase als hinderlich. Beim *In-vitro*-Refolding der mit *ompA* fusionierten Lipase konnten nur Ausbeuten von 10 % im Vergleich zur Aktivität der reifen Lipase nach Rückfaltung erreicht werden (Kapitel 3.1.4.4). Die Lipase muß demnach zuerst prozessiert werden und in ihrer reifen Form vorliegen, bevor sie mit Hilfe des Helferproteins in ihre korrekte Form gefaltet werden kann.

Das *In-vitro*-Refolding der rekombinanten Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* erfolgte standardmäßig in H₂O. Der Einsatz verschiedener Puffer im *In-vitro*-Refolding erbrachte keine weitere Steigerung der Lipaseaktivität (Kapitel 3.1.4.5). Auch der Zusatz von Ca²⁺-Ionen zum Refoldingansatz führte zu eher geringerer Lipaseaktivität im Vergleich zum Refolding in H₂O. Dies ist bemerkenswert, da beim *In-vitro*-Refolding der rekombinanten Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* eine Ca²⁺-Abhängigkeit beschrieben worden war (Shibata *et al.*, 1998a). Die Helferproteine der Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* benötigen für ihre Funktion als Mittler der Faltung der Lipasen in ihre aktive Konformation offensichtlich keine Kofaktoren. Lipase und Helferprotein müssen jedoch für die maximale Ausbeute an aktiver

Lipase in äquimolaren Mengen vorliegen (Kapitel 3.1.4.8). Ein „Recycling“ der Helferproteine findet nicht statt (Shibata *et al.*, 1998a).

Die Verdünnung der in 8 M Harnstoff denaturierten Lipase und Helferprotein im Refoldingansatz hat einen starken Einfluß auf die gewonnene Lipaseaktivität (Kapitel 3.1.4.7). Die besten Ergebnisse wurden mit Verdünnungsraten von 1:100 bis 1:250 erzielt. Bei geringerer Verdünnungsrate hemmt die höhere Harnstoffkonzentration im Ansatz das erfolgreiche Refolding. Abhilfe wäre nur durch Dialyse zu schaffen. Bei größeren Verdünnungen wird der Refoldingprozeß durch die Diffusion von Lipase und deren spezifischen Helferprotein limitiert.

Die lipase-spezifischen Helferproteine aus Pseudomonaden vermitteln die Faltung der Lipasen in ihre aktive Konformation. Eine entsprechende Funktion erfüllen auch die bekannten Chaperone, wie Hsp60 oder Hsp70, für ein Reihe von Proteinen (Fink, 1999; Hartl & Martin, 1995; Langer *et al.*, 1992). Generell unterscheiden sich die lipase-spezifischen Helferproteine aber gravierend von der Funktion eines Chaperons. Sie sind spezifisch für die zugehörige Lipase und benötigen im Gegensatz zu Chaperonen für ihre Funktion keine Energie in Form von ATP. Außerdem vermag ein Helferprotein lediglich die Faltung eines Lipaseproteins zu vermitteln, Chaperone hingegen können reaktiviert werden. Die Helferproteine der Lipasen können daher allenfalls als „chaperonähnlich“ bezeichnet werden und bilden aufgrund ihrer physiologischen Funktion eine eigene Proteinfamilie.

4.4 Charakterisierung der rekombinanten Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum*

Die rekombinant in *E. coli* exprimierten und *in vitro* rückgefalteten Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* wurden bezüglich einiger biochemischer Eigenschaften charakterisiert und den aus der Literatur bekannten Daten der nativen Enzyme gegenübergestellt (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Eigenschaften der nativen und rekombinanten Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum*.

	Lipase aus <i>Pseudomonas species</i> KWI 56		Lipase aus <i>Chromobacterium viscosum</i>	
	nativ ^a	rekombinant ^b	nativ ^c	rekombinant ^d
Temperaturoptimum	60°C	60-80°C	70°C	60°C
Temperaturstabilität	60°C	50°C	40°C	60°C
pH-Optimum	pH 5,5-7	pH 7-9	pH 6,5	pH 8,5
pH-Stabilität	pH 4-10	pH 7-9	pH 4-11	pH 7-11
Ca ²⁺ -Abhängigkeit	keine	keine	keine	keine
Substratspektrum (C4-C18)	breit, C8-C16 bevorzugt	breit, C8-C14 bevorzugt	n.b.	breit, C8 und C14 bevorzugt

^aIizumi *et al.*, 1990

^bKapitel 3.1.6

^cSugiura & Isobe, 1974

^dKapitel 3.2.4

Beide Lipasen sind thermostabile Enzyme, ihr Temperaturoptimum liegt bei etwa 60°C, bei Temperaturen unter 50°C bleiben sie über mehrere Stunden aktiv. Das pH-Optimum der nativen Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 liegt mit pH 5,5-7 etwas niedriger als bei der rekombinanten Lipase, deren pH-Optimum bei pH 7-9 ermittelt wurde. Auch bei der Lipase aus *Chromobacterium viscosum* hat das native Enzym mit pH 6,5 ein niedrigeres pH-Optimum als die rekombinante Lipase (pH 8,5). Die pH-Stabilität der nativen Lipasen umfaßt mit pH 4-10 bzw. pH 4-11 jeweils einen breiteren pH-Bereich als die für die rekombinanten Enzyme ermittelten Werte (pH 7-9 bzw. pH 7-11). Diese Unterschiede zwischen nativen und rekombinanten Lipasen könnten auf die unterschiedlichen Assay-Bedingungen, die in dieser Arbeit und der Literatur verwendet wurden (Iizumi *et al.*, 1990; Sugiura & Isobe, 1974) zurückzuführen sein. So wurden in dieser Arbeit und in der Literatur verschiedene Assays zur Messung der Lipaseaktivität verwendet, die Inkubationsdauer reicht von 20 min bis 24 h und es wurden unterschiedliche Pufferzusammensetzungen und Lipasekonzentrationen verwendet. Für die Lipasen aus Pseudomonaden sind keine posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Glycosylierung bekannt, die rekombinanten Enzyme sollten sich daher in ihren Eigenschaften unter gleichen Versuchsbedingungen nicht von den nativen unterscheiden.

Da für verschiedene *Pseudomonas*-Lipasen eine Aktivierung durch Ca^{2+} -Ionen gezeigt werden konnte (Gilbert *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993), wurde auch der Einfluß von Ca^{2+} auf die Aktivität der Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* untersucht (Kapitel 3.1.6.5 und 3.2.4.5). Es stellte sich jedoch heraus, daß keine der beiden Lipasen durch Ca^{2+} aktiviert werden kann. Dies ist bemerkenswert, da sowohl bei der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (Kim *et al.*, 1997) als auch den Lipasen aus *Chromobacterium viscosum* (Lang *et al.*, 1996) und *Pseudomonas glumae* (Noble *et al.*, 1994; Noble *et al.*, 1993) bei der Untersuchung der Proteinstrukturen jeweils eine Ca^{2+} -Bindestelle gefunden wurde, Ca^{2+} aber offensichtlich weder auf die Aktivität noch auf das Refolding Einfluß nimmt.

4.5 Spezifität der Helferproteine

Die Aminosäuresequenzen der Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56, *Chromobacterium viscosum* und *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808 weisen 80 % Homologie untereinander auf (Abb. 4.1). Ihre spezifischen Helferproteine hingegen teilen nur 56 % identische und 15 % ähnliche Aminosäuren (Abb. 4.2). Die in dieser Arbeit durchgeführten *In-vitro*-Cross-Refolding-Studien (Kapitel 3.3) zeigten, daß alle drei rekombinanten Lipasen in Anwesenheit eines beliebigen dieser drei Helferproteine effizient in ihre aktive Form gefaltet werden können. Weniger verwandte Helferproteine, wie das Helferprotein der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* TE 3285, einem Mitglied der Familie I der *Pseudomonas*-Lipasen, welches etwa 40 % Sequenzhomologie zu den Helferproteinen der Familie II-*Pseudomonas*-Lipasen aufweist, vermochte keine der drei Lipasen zu aktivieren. Dies steht in Übereinstimmung mit den von El Khattabi *et al.* (1999) beschriebenen Ergebnissen, die zeigten, daß die Helferproteine aus *Pseudomonas glumae* und *Pseudomonas aeruginosa* nicht gegeneinander austauschbar sind. Umgekehrt konnte in Studien von Shibata *et al.* (1998) das Helferprotein der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* die Faltung der Lipase aus *Pseudomonas species* 109 vermitteln, nicht jedoch die Faltung der Familie II-Lipase aus *Pseudomonas cepacia* M 12-33.

	1					50
KWI	MARTMRSRVV	AGAVACAMSI	APFAGTTAVM	TLATTHAAMA	ATAPADGYAA	
PC	MARSMRSRVV	AGAVACAMSV	APFAGMTAAM	TLATTRAAMA	ASAPADNYAA	
CV	MVRSMRSRVA	ARAVAWALAV	MPLAG-AAGL	TMAASPAAVA	----ADTYAA	
	Signalsequenz					
	51					100
KWI	TRYPILLVHG	LSGTDKYAGV	VEYWYGIQED	LQONGATVYV	ANLSGFQSD	
PC	TRYPILLVHG	LTGTDKYAGV	LEYWYGIQED	LQQRGATVYV	ANLSGFQSD	
CV	TRYPVILVHG	LAGTDKFANV	VDYWYGIQSD	LQSHGAKVYV	ANLSGFQSD	
	101					150
KWI	GANGRGEQLL	AYVKTVLAAT	GATKVNLVGH	SQGGLTSRYV	AAVAPDLVAS	
PC	GPNGRGEQLL	AYVKTVLAAT	GATKVNLVGH	SQGGLTSRYV	AAVAPDLVAS	
CV	GPNGRGEQLL	AYVKQVLAAT	GATKVNLIH	SQGGLTSRYV	AAVAPQLVAS	
	151					200
KWI	VTTIGTPHRG	SEFADFVQNV	LAYDPTGLSS	SVIAAFVNVF	GILTSSSHNT	
PC	VTTIGTPHRG	SEFADFVQGV	LAYDPTGLSS	TVIAAFVNVF	GILTSSSNNT	
CV	VTTIGTPHRG	SEFADFVQDV	LKTDPDPTGLSS	TVIAAFVNVF	GTLVSSSHNT	
	201					250
KWI	NQDALAALQT	LTTARAATYN	QNYPSAGLGA	PGSCQTGAPT	ETVGGNTHLL	
PC	NQDALAALKT	LTTAQAATYN	QNYPSAGLGA	PGSCQTGAPT	ETVGGNTHLL	
CV	DQDALAALRT	LTTAQTATYN	RNFPSAGLGA	PGSCQTGAAT	ETVGGSQHLL	
	251					300
KWI	YSWAGTAIQP	TLSVFGITGA	TDTSTVPLVD	LANVLDPSTL	ALFGTGTVMI	
PC	YSWAGTAIQP	TISVFGVTGA	TDTSTIPLVD	PANALDPSTL	ALFGTGTVMV	
CV	YSWGTAIQP	TSTVLGVTGA	TDTSTGTL-D	VANVTDPSL	ALLATGAVMI	
	301					350
KWI	NRSGQNDGL	VSKCSALYGK	VLSTSYKWNH	LDEINQLLGV	RGAYAEDPVA	
PC	NRSGQNDGV	VSKCSALYGQ	VLSTSCKWNH	LDEINQLLGV	RGANAEDPVA	
CV	NRASQNDGL	VSRCSLFGQ	VISTSYHWNH	LDEINQLLGV	RGANAEDPVA	
	351	364				
KWI	VIRTHANRLK	LAGV				
PC	VIRTHANRLK	LAGV				
CV	VIRTHVNRLK	LQGV				

Abbildung 4.1: Sequenzhomologie der Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 (KWI), *Chromobacterium viscosum* (CV) und *Pseudomonas cepacia* ATCC21808 (PC) (Corpet, 1988). In allen drei Lipasen identische oder ähnliche Aminosäuren sind schwarz unterlegt, Homologien zwischen 2 Lipasesequenzen sind durch grau unterlegte Aminosäuren gekennzeichnet. Die bei der Prozessierung der Lipase in *Pseudomonas* abgespaltene Signalsequenz ist unterstrichen.

	1		50
KWI-H	MTSREGRA	PLARRAVVYG	VVGLAAIAGV
PC-H	MTAREGRA	PLARCAVVYG	VVGLAAIAGV
CV-H	MAQADRPARG	GLAARPMRGA	SFALAGLVAC
TE-H		MKK ILLL IPLAFA	ASLAWFVWLE
	N-terminale hydrophobe Sequenz		
	51		100
KWI-H	ASVAGGSVTA	PP-----Q	AA---VPAST
PC-H	AAAAGGAAAA	PP-----Q	AA---LPAST
CV-H	GAVAGGPAAG	VPAAASGAAE	AA---MELPA
TE-H	ASPQAGADRA	PPAASAGEAV	PAPQVMPAKV
	101		150
KWI-H	GGHLAKSRRAV	RDFFDYCLTA	QSDLSAAGLD
PC-H	GGHLAKSRRAV	RDFFDYCLTA	QSDLSAAALD
CV-H	GGRLARTRAV	REFFDYCLTA	QGELTPAALD
TE-H	SGNLLITRDI	RNLFDYFLSD	GEEPLQQSLD
	151		200
KWI-H	LDVWHRYRAY	LDALAKLRDA	GAA--DKSDL
PC-H	LDVWHRYRAY	LDALAKLRDA	GAV--DKSDL
CV-H	LGVWRRYRAY	FDALAQLPGD	GAVLGDKLDP
TE-H	LALMQQYIDY	KKELVLLERD	LPRLADLDAI
	201		250
KWI-H	WSQPFPGAEO	WRQRYDLARL	KIAQDPILTD
PC-H	WSQPFPGAEO	WRQRYDLARL	KIAQDRILTD
CV-H	WAEPPFGDEQ	RRQRHDLERI	RIANDTILSP
TE-H	AHVAFFADEE	TYNQFTLERL	AIRQDQKLSL
	251		300
KWI-H	AQQHIDQORA	AIDQIAQLQK	SGATPDAMRA
PC-H	AQQRVDQORA	AIDRIAQLQK	SGATPDAMRA
CV-H	QQAALHAQQD	AVTKIADLQK	AGATPDQMR
TE-H	ESVLPQLQSE	LQQQTAALQA	AGAGPEAIRQ
	301		350
KWI-H	DASWQSRYAD	YAAQRTQIES	-AGLSPQDRD
PC-H	DASWQSRYAD	YATQRAEIES	-AGLSPQDRD
CV-H	DEAWQTRYQA	YAAERDRIAA	-QCLAPQDRD
TE-H	RSAWKGRLLD	YFAEKSRIEG	NAGLSEADRR
	351	362	
KWI-H	ASLDRGAGSA	R	
PC-H	ASLDRGAGSA	Q	
CV-H	ASLDRGAGG		
TE-H	GALEQMRQAE	QR	

Abbildung 4.2: Sequenzhomologie der Helferproteine aus *Pseudomonas species* KWI 56 (KWI-H), *Chromobacterium viscosum* (CV-H), *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808 (PS-H) und *Pseudomonas aeruginosa* TE 3285 (TE-H) (Corpet, 1988). In allen vier Helferproteinen identische oder ähnliche Aminosäuren sind schwarz unterlegt, Homologien zwischen 2 oder 3 Helferproteinsequenzen sind durch grau unterlegte Aminosäuren gekennzeichnet. Die N-terminalen hydrophoben Bereiche der Helferproteine, die für die rekombinante Expression in *E. coli* entfernt wurden, sind unterstrichen.

Offensichtlich besteht innerhalb einer Familie von Lipasen und ihren zugehörigen Helferproteinen ein gemeinsamer Mechanismus bei der Faltung der Lipasen sowie konservierte Proteinstrukturen, über die die Lipase mit ihrem Helferprotein interagiert. Hieraus kann gefolgert werden, daß auch alle anderen Lipasen aus der Familie II der *Pseudomonas*-Lipasen nach ihrer Klonierung und Überexpression in *E. coli* mit einem der in dieser Arbeit bereitgestellten rekombinanten Helferproteine rückgefaltet werden können. In der vorliegenden Arbeit konnte daher ein allgemeines Konzept zur heterologen Expression aller *Pseudomonas*-Lipasen aus der Familie II in *E. coli* entwickelt und ein effektives *In-vitro*-Refolding dieser Lipasen unter Einsatz eines vorhandenen rekombinanten Helferproteins etabliert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Pseudomonas-Lipasen finden breite industrielle Anwendung als Waschmittelzusätze, in der Nahrungsmittelindustrie und in der organischen Synthese. Ihre Gewinnung erfolgte bisher durch Isolierung aus dem Wirtsorganismus oder durch homologe Expression in *Pseudomonas*. Da viele der verwendeten Pseudomonaden jedoch als potentiell pathogen gelten, sind spezielle Sicherheitsmaßnahmen bei ihrer Kultivierung erforderlich. Auch eignen sie sich nicht zum Proteindesign mit Hilfe evolutiver Strategien. Daher wurde in dieser Arbeit ein heterologes Expressionssystem in *E. coli* und ein *In-vitro*-Refolding für diese Lipasen etabliert.

Die Gene für die Lipasen und deren zur korrekten Faltung erforderlichen Helferproteine wurden *de novo* synthetisiert. Beim Design der Gene wurde der GC-Gehalt gegenüber den Wildtyp-Genen um 12 % bzw. 13 % verringert, die Codon-Usage für *E. coli* optimiert und die Gene durch Einführung singulärer Restriktionsschnittstellen in Module aufgeteilt. Zur Expression wurden die Gene in verschiedene Vektoren kloniert. Hohe Expressionsraten (50 % des Gesamtzellproteins) der Lipasen konnten unter der Kontrolle des T₇-Promotors im Plasmid pET20b(+) erreicht werden, allerdings liegt die Lipase inaktiv in *E. coli* vor. Eine Expression der Helferproteine in *E. coli* war erst nach Entfernung stark hydrophober N-terminaler Sequenzen zu erreichen. Unter Einsatz der rekombinanten Helferproteine wurde ein schnelles und effizientes *In-vitro*-Refolding zur Aktivierung der rekombinanten Lipasen entwickelt. Das Refolding resultiert in Ausbeuten von 310 000 U/g Zellen für die rekombinante Lipase aus *Pseudomonas species* KWI 56 und 200 000 U/g Zellen für die rekombinante Lipase aus *Chromobacterium viscosum* mit Triolein als Substrat.

Die Lipasen aus *Pseudomonas species* KWI 56 und *Chromobacterium viscosum* gehören beide zur Gruppe II der *Pseudomonas*-Lipasen und weisen 80 % Sequenzhomologie untereinander auf. Es konnte gezeigt werden, daß beide Lipasen auch unter Einsatz von Helferproteinen verwandter Lipasen effizient aktiviert werden können.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen konnte die Voraussetzung für evolutives und rationales Proteindesign dieser industriell relevanten Lipasen geschaffen werden und zugleich ein allgemein gültiges System für die rekombinante Expression in *E. coli* und die effiziente Rückfaltung der *Pseudomonas* Lipasen der Klasse II gefunden werden.

6 LITERATUR

Aamand, J. L., Hobson, A. H., Buckley, C. M., Jorgensen, S. T., Diderichsen, B. und McConnell, D. J. (1994). Chaperone-mediated activation *in vivo* of a *Pseudomonas cepacia* lipase. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 556-564.

Alberghina, L., Schmid, R. D. und Verger, R. (1991). Lipases: Structure, mechanism and genetic engineering (Weinheim: VCH).

Andreoli, P. M., Cox, M. M. J., Farin, F. und Wohlfahrt, S. (1989). Molecular cloning and expression of genes encoding lipolytic enzymes. *Eur. Pat. Appl.* EP 0334462.

Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C. und Zenke, M. (1987). Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **15**, 4593-4602.

Ansorge, W., Sproat, B. S., Stegemann, J. und Schwager, C. (1986). A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *J. Biochem. Biophys. Methods* **13**, 315-323.

Aoyama, S., Inouye, S. und Yoshida, N. (1989). A lipase gene. *Eur. Pat. Appl.* EP 0318775.

Aoyama, S., Yoshida, N. und Inouye, S. (1988). Cloning, sequencing and expression of the lipase gene from *Pseudomonas fragi* IFO-12049 in *E. coli*. *FEBS Lett* **242**, 36-40.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1994). Current protocols in molecular biology, Volume I (New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience).

Bachmann, B. J. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**, 130-197.

Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 411-421.

Batenburg, A. M., Egmond, M. R., Frenken, L. G. J. und Verrips, C. T. (1991b). Enzymes and enzymatic detergent compositions. *Eur. Pat. Appl.* EP 0407225.

Batenburg, A. M., Egmond, M. R., Frenken, L. G. J. und Verrips, C. T. (1991a). Lipases with improved stability and enzymatic detergent compositions. *Eur. Pat. Appl.* EP 0464922.

Beer, H. D., Wohlfahrt, G., McCarthy, J. E., Schomburg, D. und Schmid, R. D. (1996). Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants. *Protein Eng.* **9**, 507-517.

Belev, T. N., Singh, M. und McCarthy, J. E. (1991). A fully modular vector system for optimization of gene expression in *Escherichia coli*. *Plasmid* **26**, 147-150.

- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bornscheuer, U. T. und Kazlauskas, R. J. (1999).** *Hydrolases in organic synthesis* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Hüge-Jensen, B., Nørskov Thim, L. und Menge, U. (1990).** A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**, 767-770.
- Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Lotti, M., Alberghina, L. und Schmid, R. D. (1998).** Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci.* **7**, 1415-1422.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Hüge-Jensen, B., Patkar, S. A. und Thim, L. (1991).** A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351**, 491-494.
- Carter, P. und Wells, J. A. (1988).** Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* **332**, 564-568.
- Chen, G.-Q., Choi, I., Ramachandran, B. und Gouaux, J. E. (1994).** Total gene synthesis: novel single step and convergent strategies applied to the construction of a 779 base pair bacteriorhodopsin gene. *J. Am. Chem. Soc.* **11**, 8799-8800.
- Chihara-Siomi, M., Yoshikawa, K., Oshima-Hirayama, N., Yamamoto, K., Sogabe, Y., Nakatani, T., Nishioka, T. und Oda, J. (1992).** Purification, molecular cloning, and expression of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 505-513.
- 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**, 2172-2175.
- Chung, G. H., Lee, P. Y., Yoo, O. J. und Rhee, J. S. (1991b).** Overexpression of a thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* in *Escherichia coli*. *Appl. Microbial Biotechnol.* **35**, 237-241.
- Chung, G. H., Lee, Y. P., Jeohn, G. H., Yoo, O. J. und Rhee, J. S. (1991a).** Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2359-2365.
- Corpet, F. (1988).** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10881-10890.
- Cygler, M., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M. K. und Doctor, B. P. (1993).** Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci.* **2**, 366-382.

- Dieterich, C. (1998).** Die Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* TE3285 und ihr Chaperon: Expression in *E. coli* und Rückfaltung in vitro. Studienarbeit, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart.
- Dillon, P. J. und Rosen, C. A. (1990).** A rapid method for the construction of synthetic genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **9**, 298-300.
- Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988).** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Edman, P. (1950).** Method for determination of the amino acid sequences in peptides. *Acta Chem. Scand.* **4**, 283-293.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. und Wall, R. (1984).** Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **179**, 125-142.
- El Khattabi, M., Ockhuijsen, C., Bitter, W., Jaeger, K. E. und Tommassen, J. (1999).** Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 770-776.
- Fink, A. L. (1999).** Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* **79**, 425-449.
- Frenken, L. G., Bos, J. W., Visser, C., Muller, W., Tommassen, J. und Verrips, C. T. (1993a).** An accessory gene, *lipB*, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase. *Mol. Microbiol.* **9**, 579-589.
- Frenken, L. G., de Groot, A., Tommassen, J. und Verrips, C. T. (1993b).** Role of the *lipB* gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. *Mol. Microbiol.* **9**, 591-599.
- Frenken, L. G., Egmond, M. R., Batenburg, A. M., Bos, J. W., Visser, C. und Verrips, C. T. (1992).** Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site residues. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3787-3791.
- Gerritse, G., Hommes, R. W. und Quax, W. J. (1998).** Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2644-2651.
- Gilbert, E. J. (1993).** *Pseudomonas* lipases: Biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 634-645.
- Gilbert, E. J., Cornish, A. und Jones, C. W. (1991).** Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2223-2229.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B. und Cygler, M. (1993).** Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **268**, 12843-12847.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D. und Cygler, M. (1994).** Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.* **3**, 82-91.

- Haas, M. J. und Joerger, R. D. (1995).** Lipases of the genera *Rhizopus* and *Rhizomucor*: versatile catalyst in nature and the laboratory, Y. H. Hui und G. G. Khachatourians, Eds. (Weinheim: VCH).
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**, 557-580.
- Hartl, F. U. und Martin, J. (1995).** Molecular chaperones in cellular protein folding. Curr. Opin. Struct. Biol. **5**, 92-102.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. und Pease, L. R. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene **77**, 51-59.
- Hobson, A. H., Buckley, C. M., Aamand, J. L., Jorgensen, S. T., Diderichsen, B. und McConnell, D. J. (1993).** Activation of a bacterial lipase by its chaperone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 5682-5686.
- Hom, S. S. M. und Mielenz, J. R. (1991b).** *Pseudomonas* lipase gene, vectors for the expression thereof, production of the lipase by transformed microorganisms and uses of this enzyme. Eur. Pat. Appl. EP 0443063 **16**, 267-270.
- Hom, S. S. M., Scott, E. M., Atchison, R. E., Picataggio, S. und Mielenz, J. R. (1991a).** Characterization and overexpression of a cloned *Pseudomonas* lipase gene. GBF Monogr. **16**, 267-270.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. und Pease, L. R. (1989).** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. Gene **77**, 61-68.
- Ihara, F., Kageyama, Y., Hirata, M., Nihira, T. und Yamada, Y. (1991).** Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas species*. J. Biol. Chem. **266**, 18135-18140.
- Ihara, F., Okamoto, I., Akao, K., Nihira, T. und Yamada, Y. (1995).** Lipase modulator protein (LimL) of *Pseudomonas sp.* strain 109. J. Bacteriol. **177**, 1254-1258.
- Ihara, F., Okamoto, I., Nihira, T. und Yamada, Y. (1992).** Requirement in trans of the downstream *limL* gene for activation of lactonizing lipase from *Pseudomonas sp.* 109. J. Ferment. Bioeng. **73**, 337-342.
- Iizumi, T. und Fukase, T. (1994a).** Role of the gene encoding lipase activator from *Pseudomonas sp.* strain KWI-56 in *in vitro* activation of lipase. Biosci. Biotechnol. Biochem. **58**, 1023-1027.
- Iizumi, T., Nakamura, K. und Fukase, T. (1994b).** Gene, vector and transformant for thermostable lipase and preparation of them and thermostable lipase. United States Patent US 5306636.
- Iizumi, T., Nakamura, K. und Fukase, T. (1990).** Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas sp.* KWI-56. Agric. Biol. Chem. **54**, 1253-1258.

- Iizumi, T., Nakamura, K., Shimada, Y., Sugihara, A. und Fukase, T. (1991).** Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a lipase and its activator genes from *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2349-2357.
- Inouye, M., DiRienzo, J., Maeda, T., Movva, R., Nakamura, K., Lee, N., Pirtle, R. und Pirtle, I. (1980).** Secretion of outer membrane proteins of *Escherichia coli* across the cytoplasmic membrane. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **343**, 362-367.
- Jaeger, K. E., Adrian, F. J., Meyer, H. E., Hancock, R. E. und Winkler, U. K. (1992).** Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* is an amphiphilic protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1120**, 315-321.
- Jaeger, K. E. und Reetz, M. T. (1998).** Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**, 396-403.
- Jayaraman, K. (1995).** PCR-mediated gene synthesis. *Meth. Neurosci.* **26**, 86-102.
- Johnson, L. A., Beacham, I. R., MavRae, I. C. und Free, M. L. (1992).** Degradation of triglycerides by a pseudomonad isolated from milk: molecular analysis of a lipase-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* **58**, 1776-1779.
- Jorgensen, S., Skov, K. W. und Diderichsen, B. (1991).** Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. *J. Bacteriol.* **173**, 559-567.
- Kane, J. F. (1995).** Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 494-500.
- Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y. und Suh, S. W. (1997).** The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* **5**, 173-185.
- Kim, T. R., Park, S. H. und Yang, C. H. (1994).** Cloning and expression of lipase from *Pseudomonas fragi* as fusion protein in *E. coli*. *Korean Biochem. J.* **27**, 13-16.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D. und Schmid, R. D. (1991).** Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *J. Bacteriol.* **173**, 4836-4841.
- Kugimiya, W., Otani, Y., Hashimoto, Y. und Takagi, Y. (1986).** Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *Pseudomonas fragi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 185-190.
- Kunkel, T. A. (1985).** Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488-492.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lang, D., Hofmann, B., Haalck, L., Hecht, H. J., Spener, F., Schmid, R. D. und Schomburg, D. (1996).** Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.* **259**, 704-717.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K. und Hartl, F. U. (1992).** Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**, 683-689.
- Lee, Y. P., Chung, G. H. und Rhee, J. S. (1993).** Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1169**, 156-164.
- Marston, F. A. und Hartley, D. L. (1990).** Solubilization of protein aggregates. *Methods Enzymol.* **182**, 264-276.
- Matsudaira, P. (1987).** Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038.
- Mattes, R. (1993).** Principles of gene expression. In *Biotechnology*, H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler und P. Stadler, Eds. (Weinheim: VCH), pp. 233-256.
- Movva, N. R., Nakamura, K. und Inouye, M. (1980).** Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 27-29.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Nakamura, R., Iizumi, T. und Fukase, T. (1992).** Hyperproduction of thermostable lipase by genetically engineered *Pseudomonas species*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **672**, 100-102.
- Nakanishi, J., Kurono, Y., Koide, Y. und Beppu, T. (1989).** Recombinant manufacture of *Pseudomonas cepacia* lipase using a *Pseudomonas* host. *Eur. Pat. Appl.* EP 0331376.
- Nakanishi, Y., Watanabe, H., Washizu, K., Narahashi, Y. und Kurono, Y. (1991).** Cloning, sequencing and regulation of the lipase gene from *Pseudomonas sp.* M-1233. *GBF Monogr. (Lipases)* **16**, 263-266.
- Nishioka, T., Chihara-Siomi, M., Yoshikawa, K. und Inagaki, M. (1991).** Lipase from *Pseudomonas sp.*: reactions, cloning, and amino acid sequence analysis. *GBF Monogr. (Lipases)* **16**, 253-262.
- Noble, M. E., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. und Frenken, L. G. (1994).** Analysis of the structure of *Pseudomonas glumae* lipase. *Protein Eng.* **7**, 559-562.
- Noble, M. E., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. und Frenken, L. G. (1993).** The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* **331**, 123-128.

Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussmann, J. L., Verschueren, K. H. G. und Goldmann, A. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**, 197-211.

Oshima-Hirayama, N., Yoshikawa, K., Nishioka, T. und Oda, J. (1993). Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. Production in *Escherichia coli* and activation *in vitro* with a protein from the downstream gene. *Eur. J. Biochem.* **215**, 239-246.

Peled, N. und Krenz, M. C. (1981). A new assay of microbial lipases with emulsified trioleoyl glycerol. *Anal. Biochem.* **112**, 219-222.

Prodromou, C. und Pearl, L. H. (1992). Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng.* **5**, 827-829.

Quyen, D. T. (1998). Recombinant lipase from *Pseudomonas cepacia*: high-level expression in *Escherichia coli* and protein engineering. Dissertation: Fakultät Bio- und Geowissenschaften, Universität Stuttgart.

Quyen, D. T., Schmidt-Dannert, C. und Schmid, R. D. (1999). High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid *in vitro* refolding. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 787-794.

Reetz, M. T. und Jaeger, K. E. (1998). Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. *Chem. Phys. Lipids* **93**, 3-14.

Reetz, M. T., Zonta, A., Schimossek, K., Liebeton, K. und Jaeger, K.-E. (1997). Erzeugung enantioselektiver Biokatalysatoren für die organische Chemie durch *In-vitro*-Evolution. *Angew. Chem.* **109**, 2961-2963.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn., C. S. H. Laborator, (New York).

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

Sarda, L. und Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 513-521.

Schmid, R. D. und Verger, R. (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 1608-1633.

Schoner, B. E., Belagaje, R. M. und Schoner, R. G. (1990). Enhanced translational efficiency with two-cistron expression system. *Methods Enzymol.* **185**, 94-103.

Schrag, J., Li, Y., Wu, S. und Cygler, M. (1991b). Multiple crystal forms of lipases from *Geotrichum candidum*. *J. Mol. Biol.* **220**, 541-543.

Schrag, J., Li, Y., Wu, S. und Cygler, M. (1991a). Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* **351**, 761-764.

Schrag, J. D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H. J., Schmid, R., Schomburg, D., Rydel, T. J., Oliver, J. D., Strickland, L. C., Dunaway, C. M., Larson, S. B., Day, J. und McPherson, A. (1997). The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* **5**, 187-202.

Sharp, P. A., Sugden, B. und Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**, 3055-63.

Sharp, P. M., Cowe, E., Higgins, D. G., Shields, D. C., Wolfe, K. H. und Wright, F. (1988). Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Res.* **16**, 8207-8211.

Shibata, H., Kato, H. und Oda, J. (1998a). Calcium ion-dependent reactivation of a *Pseudomonas* lipase by its specific modulating protein, LipB. *J. Biochem. (Tokyo)* **123**, 136-141.

Shibata, H., Kato, H. und Oda, J. (1998b). Molecular properties and activity of amino-terminal truncated forms of lipase activator protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 354-357.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.

Sobéron-Chávez, G. und Palmeros, B. (1994). *Pseudomonas* Lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 95-105.

Stemmer, W. P., Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M. und Heyneker, H. L. (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* **164**, 49-53.

Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.

Sugiura, M. und Isobe, M. (1974). Studies on the lipase of *Chromobacterium viscosum*. 3. Purification of a low molecular weight lipase and its enzymatic properties. *Biochim. Biophys. Acta* **341**, 195-200.

Svendsen, A. (1994). Sequence comparisons within the lipase family., P. Wooley, Peterson, S.B., ed. (Cambridge: Cambridge University Press).

Svendsen, A., Borch, K., Barfoed, M., Nielsen, T. B., Gormsen, E. und Patkar, S. A. (1995). Biochemical properties of cloned lipases from the *Pseudomonas* family. *Biochim. Biophys. Acta* **1259**, 9-17.

- Sztajer, H., Lunsdorf, H., Erdmann, H., Menge, U. und Schmid, R. (1992).** Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1124**, 253-261.
- Tabor, S. und Richardson, C. C. (1985).** A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1074-1078.
- Taipa, M. A., Liebeton, K., Costa, J. V., Cabral, J. M. und Jaeger, K. E. (1995).** Lipase from *Chromobacterium viscosum*: biochemical characterization indicating homology to the lipase from *Pseudomonas glumae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1256**, 396-402.
- Tan, Y. und Miller, K. J. (1992).** Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B 52. *Appl. Env. Microbiol.* **58**, 1402-1407.
- Tilbeurgh, H. v., Egloff, M. P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. und Cambillau, C. (1993).** Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* **362**, 814-20.
- Tipton, K. F. (1994).** Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions. *Eur. J. Biochem.* **223**, 1-5.
- Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A. und Olins, P. O. (1996).** Optimization of heterologous protein production in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 494-499.
- West, S. E. und Iglewski, B. H. (1988).** Codon usage in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9323-9335.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A. und Hunziker, W. (1990).** Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**, 771-774.
- 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**, 663-670.
- Wohlfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C. und Winkler, U. K. (1992).** Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1325-1335.
- Wohlfarth, S. und Winkler, U. K. (1988).** Chromosomal mapping and cloning of the lipase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 433-440.
- Woolley, P. und Petersen, S. B. (1994).** Lipases: their structure, biochemistry and application, (Cambridge University Press: Cambridge).
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

Zahn, K. (1996). Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *J. Bacteriol.* **178**, 2926-2933.

Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J. und Ansorge, W. (1988). Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Lett.* **233**, 432-436.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Technische Biochemie an der Universität Stuttgart unter der Leitung von Prof. Dr. Rolf D. Schmid angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut und sein Interesse an dieser Arbeit. Mit seinen ehrgeizigen Forderungen und seiner „doktorväterlichen“ Unterstützung ebnete er den Weg für den Erfolg dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Christoph Syldatk danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Besonders wertvoll war die Zusammenarbeit mit Frau Dr. Claudia Schmidt-Dannert und Frau Dr. Jutta Schmitt. Während von Claudia die ursprüngliche Idee dieser Arbeit stammt und sie vor allen Dingen zu Beginn dieser Arbeit mit ihren vielen praktischen Tips entscheidend zum Vorankommen beigetragen hat, war mir Jutta bei der Abrundung der Arbeit und der Fertigstellung des Manuskriptes eine sehr große Hilfe.

Volker Nödinger führte eine Vielzahl der DNA-Sequenzierungen und die Proteinsequenzierungen durch. Vor allem aber kümmerte er sich um den reibungslosen Ablauf im Labor. Gaby Neumann stand mir bei allen Arbeiten im Technikum hilfreich zur Seite. Danke!

Christoph Dieterich, Erik Roth und Kerstin Schierholz danke ich für ihre wertvollen Beiträge, mit denen sie im Rahmen von Studienarbeit, Praktikum und Hiwi diese Arbeit vorangebracht haben.

Unseren Computerexperten, allen voran Dr. Holger Scheib, Dr. Stefan Minning und Markus Fischer, danke ich vielmals für ihre unkomplizierte und prompte Hilfe bei allen aufgetreten Rechnerproblemen.

Ein ganz großer Dank geht an Dr. Jürgen Heim, Gaby Neumann und Sandra Pisch-Heberle, die immer ein offenes Ohr für die vielen kleinen Probleme hatten und gute Freunde wurden.

Allen Mitgliedern des ITBs, und ganz besonders natürlich meinen Kollegen aus der Genetik-Gruppe, danke ich für die klasse Arbeitsatmosphäre.

Natürlich bin ich ganz besonders auch meinen Eltern dankbar, die mich immer in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Ein ganz spezieller Dank geht an Jochen, der mir immer mit Rat und Tat zu Seite stand, und mir mit seiner Liebe und seinem Elan stets neue Kraft gab.

Lebenslauf

Name: Petra Christine Traub
Geburtsdatum: 16.06.1970
Geburtsort: Göppingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1976-1980 Grundschole Boll
1980-1989 Mörike-Gymnasium Göppingen
Abschluß: Abitur

Studium

1989-1995 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart
Abschluß: Diplom
Hauptfach: Bioverfahrenstechnik
Nebenfächer: Industrielle Genetik
Biochemie
Mikrobiologie

1993 Studienarbeit am California Institute of Biological Research, La Jolla, CA, USA

1994/95 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Ralf Mattes am Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart

Dissertation

seit 1996 Anfertigung der vorliegenden Dissertation bei Prof. Dr. Rolf D. Schmid am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart