EIN GFP-BASIERTER *IN VIVO* ASSAY FÜR DAS HOCHDURCHSATZ-SCREENING NACH HYDROLASEAKTIVITÄT

VON DER FAKULTÄT CHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART
ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE EINES
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
GENEHMIGTE DISSERTATION

VORGELEGT VON
SASCHA SCHUSTER
AUS HECHINGEN

HAUPTBERICHTER: PROF. DR. ROLF D. SCHMID
MITBERICHTER: PROF. DR. DIETER H. WOLF

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 11. AUGUST 2005

INSTITUT FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART
JUNI 2005

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unterVerwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Stuttgart, den 20.06.2005

Der Mensch muss bei dem Glauben verharren,
dass das Unbegreifliche begreiflich ist,
sonst würde er nicht forschen.

(Johann Wolfgang von Goethe)

Evolution is the most powerful and the
most comprehensive idea that has ever
arisen on earth.

(Julian Huxley)

Danksagung

Besonders Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Überlassung dieses überaus spannenden und vor allem äußerst herausfordernden Themas, das mir einen interessanten Einstieg in aktuelle Fragestellungen der modernen Biotechnologie ermöglichte. Außerdem möchte ich ihm für seine Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Vlada Urlacher ganz herzlich für ihren starken persönlichen Einsatz sowie die vielen guten Ratschläge und Diskussionen danken, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Jens Fleischer von BD Bioscience und Frau Dipl.-Ing. Beate Rössle-Lorch für die Einführung sowie die Unterstützung in der magischen Welt der Durchflusszytometrie.

Danken möchte ich auch der Degussa AG, insbesondere Herrn Dr. Harald Trauthwein und Herrn Dr. Oliver May, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich auch Frau Dr. Monika Rusnak, Frau Dr. Yomi Nishimura Frau Dr. Isabelle Kauffmann, Frau Dr. Verena Grimm, Frau Dipl.-Ing. Susanne Münch, Frau Dipl.-Biol. Sabine Eiben, Frau Katja Kühnel, Herrn Dr. Markus Baumann, Herrn Dr. Oliver Lentz, Herrn Dr. Holger Schulze, Herrn Dipl.-Biol. Daniel Appel, Herrn Dipl.-Biol. Matthias Dietrich, Herrn Dipl.-Chem. Steffen Maurer, Herrn Dipl.-Chem. Michael Budde und Herrn Simon Pflug für die wunderbare Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis auch außerhalb des Instituts danken.

Bei meinen Eltern, meiner Schwester Miriam Schuster und meiner Freundin Julia Kauffmann möchte ich mich ganz besonders herzlich für ihre Geduld, ihre moralische Unterstützung und ihre Liebe bedanken, die sie mir nicht nur während der Anfertigung dieser Arbeit entgegengebracht haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis V

Zusammenfassung X

Summary XI

1. Einleitung 1

1.1 Hydrolasen 1

1.1.1 Hydrolasen in der organischen Synthese 1

1.1.2 Serin-Hydrolasen 5

1.1.2.1 Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE I) 8

1.1.2.2 Esterase aus Geobacillus stearothermophilus (BSE) 10

1.1.2.3 *p*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus subtilis* (BSubpNBE) 10

1.1.3 Hydantoinasen (Dihydropyrimidinasen) 11

1.1.3.1 Hydantoinase aus Arthrobacter crystallopoietes (HAC) 14

1.2 Möglichkeiten zur Optimierung eines Biokatalysators 15

1.2.1 Optimierung eines biokatalytischen Prozesses 15

1.2.2 Gerichtete Evolution und Rationales Proteindesign 17

1.2.3 High-Throughput Screening (HTS) 21

1.3 Das Green Fluorescent Protein (GFP) 24

1.3.1 Die geschichtliche Entdeckung und seine natürliche Funktion 24

1.3.2 Physikalische Eigenschaften 25

1.3.3 Die dreidimensionale Struktur und das Chromophor 27

1.3.4 Anwendungen des GFP Wildtyps und seiner Mutanten mit verbesserten Eigenschaften 32

1.3.5 pHluorine – pH-sensitive Mutanten von GFP 35

1.4 Regulation des cytoplasmischen pH-Werts in Bakterienzellen 38

1.4.1 Der intrazelluläre pH-Wert (pH_i) 38

1.4.2 Passive pH-Homöostase 39

1.4.3 Aktive pH-Homöostase 40

1.5 Die Durchflusszytometrie 42
1.5.1 Einführung und Definition der Durchflusszytometrie 42
1.5.2 Aufbau und Wirkungsweise eines Durchflusszytometers 43
1.5.3 Applikationen der Durchflusszytometrie 46

2. Zielsetzung 48

3. Ergebnisse 50
3.1 Klonierung und Koexpression von pHluorin und Hydrolasen 50
3.1.1 Klonierung der Hydrolasen in das Plasmid pGEX_pH_PFE 50
3.1.3 Koexpression von pHluorin und Hydrolasen 53
3.2 Assay-Entwicklung 54
3.2.1 Prinzip des Assays 54
3.2.2 Zusammenhang zwischen intrazellulärer pH-Änderung und dem Fluoreszenzemissionsverhältnis von pHluorin 55
3.2.3 Assayvalidierung anhand einer Modellhydrolase bei Umsatz verschiedener Substrate 57
3.2.5 Einfluss des Lösevermittlers auf das Fluoreszenzemissionsverhältnis von pHluorin 59
3.2.6 Einfluss der Kaliumphosphatpufferkonzentration auf die Fluoreszenzintensität und das Fluoreszenzemissionsverhältnis von pHluorin 60
3.3 Assay-Erweiterung auf weitere Hydrolasen und hydrolytische Umsetzungen 62
3.4 Etablierung des pHluorin-Assays im Mikrotiterplatten-Maßstab 66
3.5 Möglichkeiten einer Assay-Applikation in der Durchflusszytometrie 67
3.5.1 Analyse von *E. coli* Zellen 67
3.5.2 Analyse von Zellen mit pHluorin-Aktivität 68
3.5.3 Analyse von Zellen mit pHluorin- und Esteraseaktivität bei Substratumsatz 72
3.6 Assayanwendung für die Gerichtete Evolution 75

3.6.1 Gerichtete Evolution der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE I) mittels *error-prone* PCR 75
3.6.2 Screening der Mutantenbibliothek mit Hilfe des pHluorin-Assays 80
3.6.3 Charakterisierung der durch das Screening erhaltenen Mutanten 81
3.6.3.1 Sequenzierung der Mutanten 81
3.6.3.2 Aktivitätsuntersuchungen der Mutanten 82
3.6.3.3 Aktivitätsuntersuchung der Mutanten mittels HPLC 83

4. Diskussion 87
4.1 Assay-Entwicklung 88
4.2 Möglichkeiten einer Assay-Applikation in der Durchflusszytometrie 91
4.3 Assayanwendung für die Gerichtete Evolution 93

5. Material und Methoden 95
5.1 Chemikalien und Enzyme 95
5.2 Geräte 96
5.3 Verwendete Bakterienstämme 98
5.4 Plasmide 98
5.5 Oligonukleotide 99
5.6 Lösungen, Medien und Puffer 100
5.6.1 Kulturmedien 100
5.6.2 Zelltransformationen 101
5.6.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese 102
5.6.4 Puffer und Lösungen für die DNA-Sequenzierung 103
5.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 103
5.6.5 Stammlösungen 106
5.7 Mikrobiologische Methoden 107
5.7.1 Stammhaltung von *Escherichia coli* 107
5.7.2 Kultivierung von *Escherichia coli* 107
5.7.3 Transformation von *Escherichia coli* 108
5.7.3.1 Herstellung kompetenter Zellen mit der TSS-Methode 108
5.7.3.2 Herstellung kompetenter Zellen mit der Rubidiumchlorid-Methode 108

5.7.3.3 Hitzeschock-Transformation kompetenter Zellen 109
5.7.4 Koexpression von pHluorin und rekombinanten Hydrolasen in *E. coli* 109
5.7.5 Stammhaltung, Bakterienanzucht und Koexpression in Mikrotiterplatten 110
5.8 Molekularbiologische Methoden 110
5.8.1 Schnellisolierung und Reinigung von Plasmid-DNA 110
5.8.2 DNA-Präzipitation mit Ethanol 111
5.8.3 Bestimmung der DNA-Konzentration 112
5.8.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese 112
5.8.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen 114
5.8.6 Restriktionsspaltung von DNA 114
5.8.7 Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase 115
5.8.8 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction,* PCR) 115
5.8.8.1 PCR zur DNA-Sequenzierung 117
5.8.8.2 Einführung von Restriktionsschnittstellen mittels PCR 118
5.8.8.3 Die error-prone PCR 118
5.8.9 DNA-Sequenzierung 119
5.8.10 Bestimmung der Mutationshäufigkeit in Mutantenbibliotheken 122
5.9 Proteinchemische Methoden 122
5.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) 122
5.9.2 Bestimmung des Proteingehalts 124
5.9.3 Aktivitätsmessungen von Hydrolasen 124
5.9.3.1 pNPA-Assay 124
5.9.3.2 pH-Stat-Assay 125
5.10 Assaysysteme 127
5.10.1 pHluorin-Assay 127
5.10.1.1 Das Konzept des pHluorin-Assays 127
5.10.1.2 Testreaktionen zur Assayentwicklung 127
5.10.1.3 Selektion aktiver Hydrolasen 128
5.10.2 Fluoreszenzanalysen durch Fluorescence-Activated Cell-Sorting 128
5.10.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analytik 130

6. Literaturverzeichnis 132

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr(e)
Å	Ångström
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bps	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSE	Esterase aus *Geobacillus stearothermophilus*
BSubpNBE	*p*-Nitrobenzylesterase aus *Bacillus subtilis*
c	Konzentration
C	Celsius
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adeninmonophosphat
CRP	cAMP Rezeptorprotein
d	Tag(e)
d. h.	das heißt
dH_2O	Destilliertes Wasser
ddH_2O	Doppelt destilliertes Wasser
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DNAse	DNA-Endonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
*ep*PCR	*error-prone* PCR
EtOH	Ethanol
FID	Flammenionisationsdetektor

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	*Forward Scatter*
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GBL	γ-Butyrolacton
GC	Gaschromatographie
GFP	Green Fluorescent Protein
GHB	γ-Hydroxybutyrat
Glc	Glucose
GPI	Glycosylphospatidylinositol
GST	Gluthathion-*S*-Transferase
h	Stunde(n)
HAC	Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes*
HisTag	Aminosäuresequenz mit sechs aufeinanderfolgenden Histidinen
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
HTS	*High-Throughput Screening* (Hochdurchsatz-Screening)
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
Kap.	Kapitel
kB	Kilo-Base(n)
kDa	Kilo-Dalton
KP_i	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
LB	Luria-Bertani Komplexmedium
LB-Amp	Ampicillinhaltiges LB-Medium
M	Mol pro Liter
M_r	Molekulargewicht
m	Meter

mA	Milliampere
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
µM	Mikromol pro Liter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	*messenger* RNA
MTP	Mikrotiterplatte
m/v	Masse/Volumen
nm	Nanometer
NMR	Kernspin-Resonanz
OD_x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
p	para
P	Promotor
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	*Polymerase chain reaction* (Polymerasekettenreaktion)
PFE I	Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens*
Pfu	*Pyrococcus furiosis*
pH_{ex}	extrazellulärer pH
pH_i	intrazellulärer pH
pNPA	*p*-Nitrophenylacetat
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
$R_{x/y}$	Fluoreszenzemissionsverhältnis aus den beiden Anregungswellenlängen x und y
RNA	Ribo-Nukleinsäure
rpm	*Rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	*Side Scatter*
t	Tonnen
T	Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TfB	*Transformation buffer*
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	*Transformation storage solution*
U	*Units*
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp

Aminosäuren

A, Ala	Alanin
C, Cys	Cystein
D, Asp	Asparaginsäure, Apartat
E, Glu	Glutaminsäure, Glutamat
F, Phe	Phenylalanin
G, Gly	Glycin
H, His	Histidin
I, Ile	Isoleucin
K, Lys	Lysin
L, Leu	Leucin

M, Met	Methionin
N, Asn	Asparagin
P, Pro	Prolin
Q, Gln	Glutamin
R, Arg	Arginin
S, Ser	Serin
T, Thr	Threonin
V, Val	Valin
W, Trp	Tryptophan
Y, Tyr	Tyrosin

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein effektives intrazelluläres Testsystem zur Identifizierung von Hydrolaseaktivität entwickelt. Die Grundlage dieses *in vivo* Assays beruht auf dem Auftreten von pH-Änderungen bei Hydrolase-katalysierten Substratspaltungen. Ratiometrisches pHluorin, eine pH-sensitive Mutante von Green Fluorescent Protein (GFP) fungierte als Detektor zur Bestimmung dieser pH-Änderungen. pHluorin besitzt im Gegensatz zu GFP zwei pH-abhängige Peaks bei 395 bzw. 475 nm, deren Maxima sich innerhalb eines pH-Bereichs von 8,0 bis 5,5 reversibel zueinander verschieben. Das aus den beiden Peaks gebildete Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{475/395}$ kann - gemessen bei einer maximalen Emission bei 508 nm - direkt als Maß für intrazelluläre pH-Änderungen herangezogen werden.

Die praktische Anwendung dieses Prinzips wurde zunächst durch Koexpression von pHluorin und der Esterase aus *Geobacillus stearothermophilus* (BSE) als Modellhydrolase in *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen und anschließender Hydrolyse verschiedener Ester untersucht. So zeigten Zellen nach Expression von pHluorin und Esterase, in Abhängigkeit von der Enzymaktivität gegenüber den untersuchten Substraten eine mehr oder weniger starke Änderung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses. Daraufhin konnte die Anwendung des Assays auch erfolgreich auf Hydantoinase- sowie Amidase-katalysierte Substrathydrolysen erweitert werden. Außerdem wurden verschiedende Experimente im Mikrotiterplattenformat sowie in der Durchflusszytometrie im Hinblick auf eine erfolgreiche Assayapplikation im Hochdurchsatz-Screening (HTS) von Enzymbibliotheken durchgeführt.

Zur Etablierung im Hochdurchsatz-Screening wurde mittels *error-prone* PCR eine Mutantentenbibliothek der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE I) aufgebaut und mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Nachweissystems auf erhöhte hydrolytische Enzymaktivität gegenüber γ-Butyrolacton (GBL) untersucht. Auf diese Weise wurde eine Mutante mit einer 5,6-fach gesteigerten Umsatzrate von GBL im Vergleich zum PFE I-Wildtyp gefunden. Somit konnte gezeigt werden, daß eine schnelle und zuverlässige Untersuchung von Biokatalysatoren bei Anwendung des pHluorin-Assays zur Durchmusterung von Enzymbibliotheken möglich ist.

Summary

Over the past years, the importance of hydrolytical enzymes as catalysts for industrial applications has significantly increased due to their high chemo-, regio-, and stereoselectivity toward many different substrates under ambient temperature and neutral pH values. Modern chemical process technologies require biocatalysts with improved properties such as, e.g., higher activity, increased temperature stability, or selectivity. To create suitable catalysts, powerful methods such as protein design and directed evolution have been established. For mutant screening, simple and especially rapid assays are required. Beyond all doubt, the biggest challenge in assay development is the improvement of the throughput. A state of the art flow cytometric device is capable of analyzing and sorting up to 50000 cells/s. Combined with a sensitive assay, a cell sorter can be a very efficient tool for high-throughput screening of mutant libraries.

In this work an assay sensitive for screening of all types of hydrolase-catalyzed reactions has been developed. This *in vivo* assay is based on the detection of a change in pH during enzymatic hydrolysis. The strength of this pH change depends on the hydrolase activity. pHluorin, a pH-sensitive mutant of green fluorescent protein (GFP) isolated from *Aequorea victoria*, was used as a sensor for determination of intracellular pH changes. pHluorin has two pH-dependent excitation maxima, at 395 and 475 nm. A pH decline results in a decrease of the peak at 395 nm and a simultaneous increase of the peak at 475 nm. The ratio of both maxima, the so-called fluorescence emission ratio, acts as an indicator for pH changes, thus facilitating easy monitoring of the intracellular pH value within the range of pH 5.5 - 8.0. The significant advantage of the fluorescence emission ratio for detection of pH changes is its independence of the expression level of pHluorin that is of course inconstant for different cells within a culture.

To investigate the correlation between the pH and changes in the fluorescence emission ratio of pHluorin, pHluorin-producing *E. coli* DH5α cells were resuspended in potassium phosphate buffer at pH 6.0, 7.0, and 8.0, respectively. The fluorescence emission ratio increased significantly (almost by a factor of 2) with decreasing pH from 8.0 (0.98) over

7.0 (1.38) to 6.0 (1.95). These results indicate the strong pH dependency of pHluorin within this pH range.

Next, the emission ratio during conversion of different substrates in *E. coli* cells producing pHluorin and the *Geobacillus stearothermophilus* (*G. stearothermophilus*) esterase was determined. The fluorescence emission ratio of cells with pHluorin but without esterase activity served as reference. A significant increase in the fluorescence emission ratio was only observed in dependence of the enzyme activity toward the tested substrate. The highest fluorescence emission ratio for the cells with esterase activity was obtained in presence of tributyrin (2.15), which is hydrolyzed to butyric acid and glycerol. These results were confirmed by *in vitro* activity measurements using pH-stat, where the *G. stearothermophilus* esterase showed the highest activity toward tributyrin. Several other experiments with varied reaction conditions revealed additional influences on the fluorescence emission ratio such as substrate autohydrolysis, *in vivo* activity of the *E. coli* host strain toward a tested substrate, permeability of the cell membrane for substrates, use of certain organic cosolvents and different buffer concentrations.

After these promising results the assay was also tested on other hydrolase-catalyzed reactions. Two different model reactions were chosen: the hydrolysis of hydantoin to *N*-carbamoyl glycine catalyzed by the *Arthrobacter crystallopoietes* hydantoinase (ACH) and carboxylic acid amide cleavage to the corresponding carboxylic acid and the amine catalyzed by the *Bacillus subtilis p*-nitrobenzyl esterase (BsubpNBE).

For hydantoin conversion, the emission ratio of *E. coli* cells producing pHluorin and the recombinant hydantoinase was twice the value (2.25) of the fluorescence emission ratio of the reference (1.37), i.e., of the same magnitude as the values obtained for tributyrin hydrolysis by esterase expressing cells (2.15).

The overall pH change and the resulting fluorescence emission ratio (1.65) from the hydrolysis of *N*-(1-*p*-tolylethyl)octylamide reflects a sum signal derived from the obtained compounds caprylic acid (acidic compound) and 1-*p*-tolylethylamine (basic compound) and is therefore understandably not as high as that for hydantoin hydrolysis by ACH. To exemplify that the assay can also detect an increase in pH, amide cleavage was started at pH 6.0 instead of pH 8.0. In this case, cells without esterase activity, incubated at pH 6.0 were used as reference. The emission ratio of the cells with esterase activity was

indeed lower (1.59) than that of the reference (1.85). These results demonstrate that an increase in pH can be registered by pHluorin as well.

For downscaling of the assay to microtiter-plate scale eight single *E. coli* colonies producing the wild-type esterase from *G. stearothermophilus* and eight colonies producing a corresponding inactivated mutant were picked and cultivated in microtiter plates. The fluorescence emission ratios of eight *E. coli* cultures, which only expressed pHluorin, were used as reference. The inactive mutants were produced by site-directed mutagenesis replacing the active serine of the catalytic triad with alanine. As expected, esterase-expressing cells showed higher emission ratios (2.0-2.3) during tributyrin hydrolysis than the cells with inactivated esterase and controls (0.9-1.4) which meets the results obtained before in larger scale and demonstrates that pHluorin can be applied as a sensor of intracellular pH shifts in microtiter-plate scale.

The applicability of the assay for single cell sorting in flow-cytometric systems was also investigated. Measurements were carried out on LSR II (analyzer) and FACSDiVa (cell sorter) from BD Bioscience. For FACS analysis and sorting cells were illuminated at 405 nm with a violet laser diode and at 488 nm with an argon ion laser. Forward scattering (FSC), side scattering (SSC), and the emission as well as the emission ratio of pHluorin upon excitation at 488 and 405 nm were measured by using a 530/30-nm band-pass filter.

In the first set of experiments the behavior of *E. coli* cells with pHluorin in buffer at different pH values was investigated. A Ratio exc. 488nm/exc. 405nm vs. Forward Scatter (FSC)-density plot demonstrated that the decrease of pH 8.0 to 6.0 was accompanied by a significant population shift toward higher fluorescence emission ratios. Further *E. coli* cells, producing pHluorin and *G. stearothermophilus* esterase were analyzed during tributyrin hydrolysis. As reference, cells without esterase activity were measured. Additionally, the impact of DMSO as cosolvent on the flow-cytometric assay was investigated in more detail. In presence of DMSO, the shift of the cell population with esterase activity toward higher emission ratios was stronger than in the absence of DMSO, as this cosolvent is well-known to increase the permeability of the cell membrane. Finally, a mixed culture consisting of cells with and without esterase activity and pHluorin was analyzed during tributyrin hydrolysis. The cells, showing the maximum fluorescence emission ratio, were sorted out of this culture and subsequently applied for

fluorescence measurements. These fluorescence measurements confirmed the obtained results, indicating that only a strong pH shift can trigger a high emission ratio. The number of positive hits (cells with high hydrolytic activity) depends on the gate setting in FACS. A high fluorescence emission ratio as indicator (narrow gate setting) may result in highly active enzymes.

As the FACSDiVa cell-sorting device didn't have a laser diode for excitation at 405 nm like the analyzer LSR II, it was not possible to analyze and sort the cells by using the fluorescence emission ratio as a characteristic parameter for the strength of intracellular pH shifts. Thus, it was not possible to carry out further sorting experiments for a possible assay application in high-throughput screening.

Finally, to demonstrate the applicability of the pHluorin assay for intracellular high-throughput screening in microtiter-plate scale, a mutant library of 3200 clones of the *Pseudomonas fluorescens* esterase I (PFE I) was built up by using error-prone PCR. The screening for enzyme variants with improved activity toward the hydrolysis of γ-butyro lactone (GBL) to γ-hydroxy butyrate (GHB) was used as model problem. During this reaction a typical pH decrease occurs that should be easily detectable by pHluorin. During the screening process, twelve clones with a significant higher fluorescence emission ratio $R_{485/390}$ (1.3-1.5) compared to the PFE wild-type (0.9) were selected and characterized by sequencing and activity tests using pH-stat and HPLC. The sequencing results showed a very high mutation rate in a broad range of one to nine mutations. Three out of these twelve selected clones were expressed as active enzymes in *E. coli*. Finally, one mutant showed a 5.6-fold higher activity toward GBL compared to the PFE I wild-type.

As a conclusion, a novel pHluorin-based assay was developed and successfully tested on different esterases as well as on a hydantoinase. The assay is based on intracellular pH shifts and hence might be applied for the monitoring of any hydrolytic reaction. This in vivo assay allows detection of pH changes in single *E. coli* cells, producing recombinant hydrolases. Therefore it can be used not only in microtiter-plate scale but also in combination with flow cytometric systems. For final validation the pHluorin assay was successfully used to screen an enzyme library in microtiter-plate scale, obtaining a mutant with a 5.6-fold higher activity toward the hydrolysis of γ-butyro lactone compared to the PFE wild-type.

1. Einleitung

1.1 Hydrolasen

1.1.1 Hydrolasen in der organischen Synthese

Biokatalytische Prozesse wurden von Menschen bereits seit tausenden von Jahren zur Produktion von Nahrungs- und Genussmittel verwendet. Eines der wohl bekanntesten Beispiele ist die Fermentation von Zucker zu Alkohol mit Hilfe von Hefen [Gerhartz, 1990]. Das Verständnis über die Abläufe solcher Prozesse konnte jedoch erst in den vergangenen fünfundzwanzig Jahren mit Hilfe moderner Forschungsmethoden erreicht werden. Rapide Fortschritte auf den Gebieten der Mikrobiologie und Molekulargenetik, wie z.B. die rekombinante Produktion von Enzymen in mikrobiellen Expressionssystemen, die eine fortlaufende Gewinnung des Biokatalysators aus nachwachsenden Rohstoffen ermöglicht, forcierten das Interesse an enzymkatalytischen Prozessen. Während bis zum Beginn der achtziger Jahre biotechnologische Verfahren hauptsächlich nur zur Herstellung sehr komplexer Produkte (z.B. Antibiotika, Insulin) eingesetzt wurden, haben sie bis heute auch Anwendungen in zahlreichen weiteren Industriezweigen gefunden (Abbildung 1). Ihr Einsatz erstreckt sich über die Anwendung in der Textil- und Papierindustrie bis hin zur Verwendung in der Landwirtschaft und Umweltanalytik [Schmid, 2002].
Ebenso etablierten sich Mikroorganismen und Enzyme in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Produktion von Feinchemikalien und Wirkstoffen [Liese et al., 2000]. Dabei handelt es sich häufig um optisch aktive Substanzen, wobei eine der beiden Stereoisomere keine oder nur eingeschränkte Wirkungen für die gewünschte Applikation besitzt. Biokatalysatoren sind aufgrund ihrer hohen Chemo-, Regio- und Stereoselektivität in der Lage, das wirksamere der beiden Stereoisomere in hoher optischer Reinheit herzustellen und somit z. B. die Erfolgsrate eines Medikaments deutlich zu erhöhen. Außerdem ist es möglich, chemisch schwer zugängliche Verbindungen durch biotechnologische Verfahren herzustellen. Von besonders praktischem Wert ist hierbei die Tatsache, dass viele Enzyme nicht nur die Reaktionen ihrer natürlichen Substrate mit hoher Stereoselektivität katalysieren, sondern auch eine bemerkenswerte Toleranz gegenüber der Struktur der

umzusetzenden Substrate zu beobachten ist. Dies erlaubt die Umwandlung vieler nichtnatürlicher, synthetischer Verbindungen.

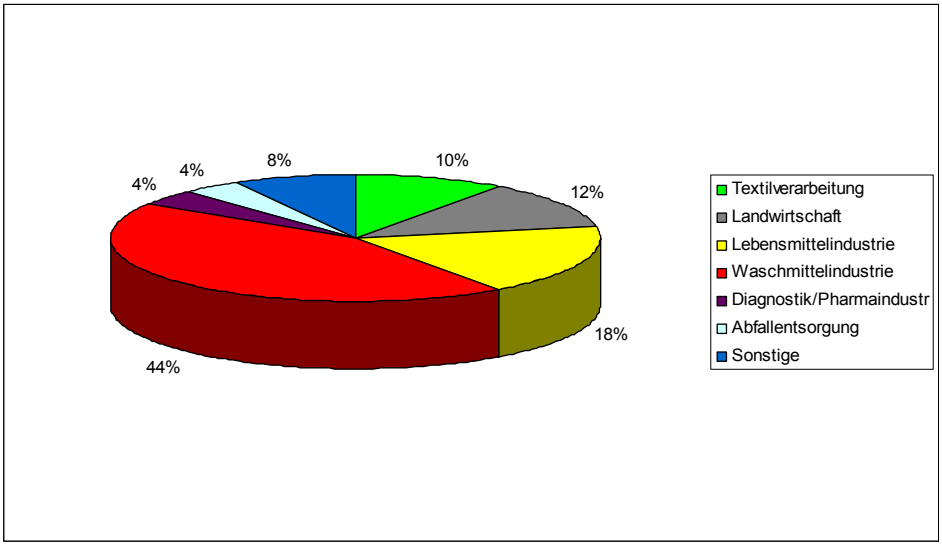


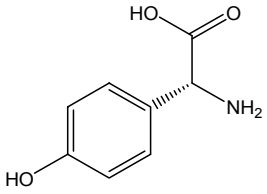
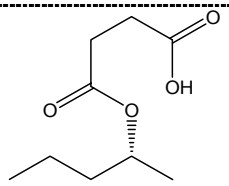
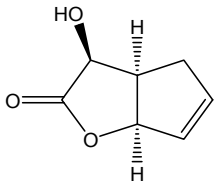
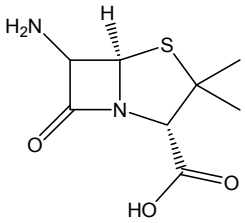
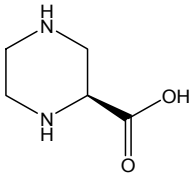
Abbildung 1: Einsatzgebiete und prozentuale Verteilung biotechnologischer Prozesse in der Industrie [Liese et al., 2000]

Biokatalysatoren haben aber noch weitere wichtige Vorteile. Gegenüber klassischen organischen Syntheseverfahren, die meist entweder die Verwendung hochreaktiver Reagenzien oder energetisch sehr aufwendige Rahmenbedingungen wie hohe Temperaturen bzw. Drücke erfordern, werden Biotransformationen üblicherweise unter milden Reaktionsbedingungen in wässriger Lösung durchgeführt, so dass im Vergleich zu den konventionellen, chemischen Syntheseverfahren die Prozessführung weniger Energie verbraucht. Zusammen mit der Möglichkeit zur Vermeidung toxischer Nebenprodukte und Abfälle ergibt sich eine positive Auswirkung auf die Kosten- und Umweltbilanz. Bei Bedarf sind heutzutage sogar organische Lösemittel und mehrphasige Systeme als Reaktionsmedien möglich, so dass neben wasserlöslichen sogar organische Verbindungen selektiv mit biokatalytisch aktiven Zellen und Enzymen modifiziert werden können. Biokatalysatoren aus mikrobiellen Quellen, die sich rekombinant in mikrobiellen Expressionssystemen herstellen lassen, haben außerdem den Vorteil einer möglichen fortlaufenden Produktion aus nachwachsenden Rohstoffen.

Die wohl wichtigste Enzymklasse für die Synthese von Feinchemikalien stellen die Hydrolasen dar. Ihr größter Vorteil im Vergleich zu anderen Enzymen wie z. B. den Oxidoreduktasen liegt in der Kofaktorunabhängigkeit, was die Prozessführung durch

das Entfallen aufwendiger und kostenintensiver Regenerierungsverfahren wesentlich vereinfacht. Des Weiteren besitzen viele Hydrolasen eine hohe Lagerstabilität und sind damit in großer Vielzahl kommerziell erhältlich. Aus diesen Gründen, gekoppelt mit einem breiten Substratspektrum und der hohen Toleranz in organischen Lösemitteln, setzte die Synthesechemie in den letzten 10 Jahren bevorzugt auf diese Enzymklasse. Einer der größten industriell durchgeführten Prozesse ist die enzymatische Racematspaltung von Aminen [Balkenhohl et al., 1997]. Die Jahresproduktion der BASF (Ludwigshafen) liegt bei mehreren tausend Tonnen pro Jahr [Schmid et al., 2001; Thayer, 2001]. Nach diesem Verfahren können verschiedene, sowohl aliphatische als auch aromatische Amine als Zwischenstufen für die Synthese von Pharmazeutika und Pestizide enantiomerenrein hergestellt werden. Als Beispiel ist (*S*)-Methoxyisopropylamin (MOIPA) als chiraler Baustein für das Herbizid *Frontier x2* zu nennen [Schmid et al., 2001]. Weitere Beispiele für industriell bedeutende hydrolasekatalysierte Biotransformationen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verschiedene Beispiele für hydrolase-katalysierte Biotransformationen in der Industrie [Ogawa et al., 1999; Patel, 2001b; Patel, 2001a; Schmid et al., 2001; Schulze et al., 1999; Shimizu, 2000; Zaks, 2001]

Produkt	Enzym / Verwendung	Hersteller
 D-*p*-Hydroxyphenylglycin	Racematspaltung mit Hydantoinasen und Carbamoylasen aus *Agrobacterium radiobacter* und *Pseudomonas putida* Synthese von Cephalosporinen	DSM Bayer Ajinomoto
 (*R*)-2-Pentylhemi-succinat	Racematspaltung mit Lipase z. B aus *Candida antarctica* Zwischenstufe für die Herstellung von Medikamenten gegen Alzheimer	Bristol-Myers Squibb
 (+)- und (-)-Enantiomer	Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* (+)-Enantiomer: Carbovir (HIV-Hemmer) (-)-Enantiomer: Brefeldin A (Fungizid, cholesterin-senkende Wirkung)	Chiroscience
 6-Aminopenicillansäure	Hydrolyse mit Penicillin-Acylase Produktion von halbsynthetischen Penicillinen	DSM Pfizer Toyo
 (*S*)-Piperazin-2-carbon-säure	Racematspaltung mit Amidase aus *Klebsiella terrigena* Zwischenstufe für HIV-Protease-Inhibitor „Crixivan“	Lonza

1.1.2 Serin-Hydrolasen

Die Klasse der Serin-Hydrolasen setzt sich im Wesentlichen aus den Esterasen (Carboxylester-Hydrolasen, EC 3.1.1.1), den Lipasen (Triacylglycerol-Acylhydrolasen, EC 3.1.1.3) sowie den Serin-Proteasen (EC 3.4.21...) zusammen.
Man findet sie in der Natur vor allem in Tieren (Verdauungstrakt) und Pflanzen, aber auch in Mikroorganismen. Ihre natürliche Funktion liegt in der Katalyse verschiedener Stoffwechselprozesse wie z. B. im Fettmetabolismus sowie in der Lipidmodifikation [Jaeger et al., 1994]. Darüber hinaus sind sie aber auch am Abbau verschiedener Toxine beteiligt [Blackman et al., 1995; Wie, 1996].
Eine strukturelle Besonderheit vieler Serin-Hydrolasen ist die zentrale katalytische Domäne, die als α/β-Hydrolasefaltung [Ollis et al., 1992] bezeichnet wird. Dieses gemeinsame Strukturelement ist aus acht, meist parallelen β-Faltblättern (1 bis 8) aufgebaut, die über α-Helices (A bis F) miteinander verknüpft sind (Abbildung 2). Obwohl diese Anordnung eine gewisse Variabilität in der Anzahl der Protein-Sekundärstrukturen erlaubt (zusätzliche α-Helices und β-Faltblätter z.B. bei der Lipase aus *Geotrichum candidum*), bleibt die zentrale Topologie des aktiven Zentrums erhalten. Zusätzliche Helices spielen häufig eine wichtige Rolle bei Substratbindungen. Das katalytische Zentrum von Esterhydrolasen besteht aus drei Aminosäureresten, die als katalytische Triade bezeichnet wird. Bei diesen Resten handelt es sich um ein Serin, ein Histidin und einen protonenakzeptierenden Carboxylatrest (Aspartat oder Glutamat). Darüber hinaus ist auch die Sequenzumgebung des aktiven Serins, die aus dem Pentapeptid Gly-X-Ser-X-Gly (X steht für eine beliebige Aminosäure) besteht, ein charakteristisches Motiv. Auch die räumliche Anordnung der drei katalytischen Aminosäuren ist in allen Strukturen identisch, d.h. sie sind immer auf bestimmten Verbindungen (*loops*) zwischen den strukturgebenden β-Faltblättern und α-Helices lokalisiert. So befindet sich das aktive Serin (Nu) zwischen β-Faltblatt 5 und der α-Helix B, die aktive Säurefunktion (Sre) zwischen 7 und E und das Histidin (His) zwischen 8 und F. Die sogenannte Oxyaniontasche (Ox) enthält meist Aminosäuren mit sterisch anspruchslosen Resten wie Glycin oder Alanin, deren Amidprotonen die Carbonylgruppe des Substratesters während der Umsetzung stabilisieren (Abbildungen 2 und 3). Die Konservierung der räumlichen Anordnung der katalytischen Triade und der Oxyaniontasche deutet darauf hin, dass die stereochemischen Faktoren, die eine nukleophile Spaltung einer

Esterbindung dirigieren, hinsichtlich der strukturellen und chemischen Vorgänge spezifisch und genau definiert sein müssen [Dodson et al., 1998].

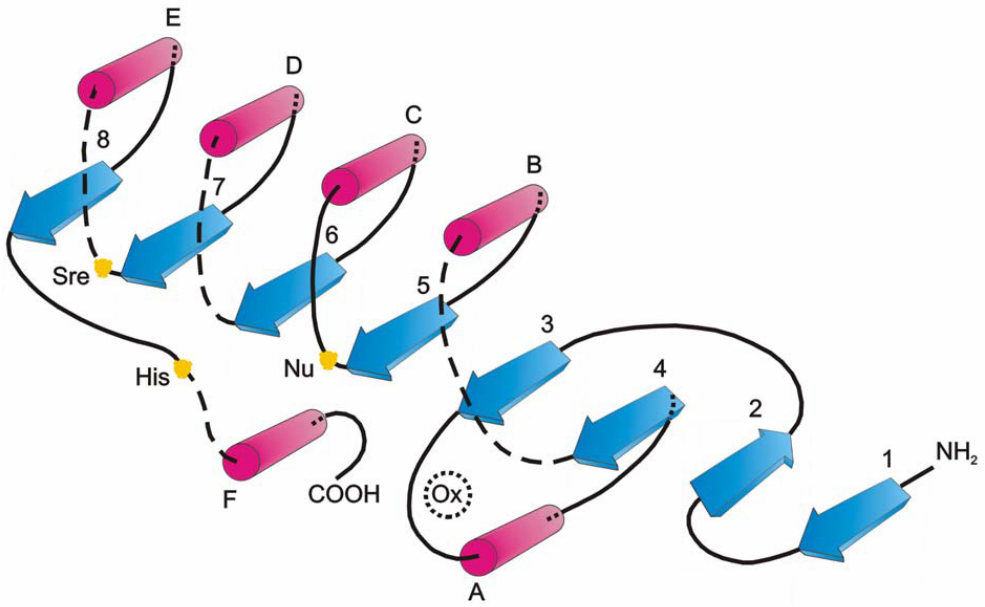


Abbildung 2: Schematische Darstellung der α/β-Hydrolasefaltung [Ollis et al., 1992].

Die β-Faltblätter (1 bis 8) sind als blaue Pfeile und die α-Helices (A bis F) als rote Zylinder wiedergegeben. Die relativen Positionen der katalytisch aktiven Aminosäurereste (gelbe Punkte) sowie die Oxyaniontasche (Ox) sind ebenfalls dargestellt. Trotz der Variabilität in bestimmten Bereichen (gestrichelte Linien) bleibt die zentrale Topologie weitestgehend erhalten.

Serin-Hydrolasen sind typische *induced-fit* Enzyme, d.h. die Konformation und damit auch die Geometrie der Bindungstasche passt sich dem jeweiligen Substrat an, so dass die katalytischen Aminosäuren in eine geeignete Anordnung für die Reaktion gebracht werden [Koshland, 1994]. Der anschließende katalytische Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 3 anhand des Beispiels der Lipase aus *Candida rugosa* dargestellt [Bornscheuer, 1999]. Zur Steigerung der Nukleophilie des Serinrests abstrahiert das His449 ein Proton vom Ser209. Anschließend erfolgt ein nukleophiler Angriff dieses Serins unter Ausbildung eines tetrahedralen Intermediats (T_d1) auf den Carbonylkohlenstoff des Substrats, welches bereits in der Oxyaniontasche über van-der-Waals-Wechselwirkungen an Gly124 und Ala210 gebunden ist. Im darauf folgenden Schritt bildet sich unter Austritt des Alkohols ein planarer Acyl-Enzym-Komplex aus, der vor allem durch den Imidazolrest des His449, welcher das freiwerdende Proton des Serinrests übernimmt, und durch das Carboxylatanion des Acylrestes (hier Glu349) unterstützt wird. Der Acyl-Enzym-Komplex wird durch den Angriff eines Nukleophils (hier Wasser) in ein zweites tetrahedrales Intermediat (T_d2) überführt. Dieses zerfällt im letzten Schritt des katalytischen Prozesses in das freie Enzym (Regeneration des Katalysators) und das

Produkt (Säure). Handelt es sich bei dem angreifenden Nukleophil um einen Alkohol, so entsteht erneut eine Esterverbindung (Umesterung). Die Freisetzung des Produkts limitiert die Geschwindigkeit des Reaktionsmechanismus (geschwindigkeitsbestimmender Schritt).

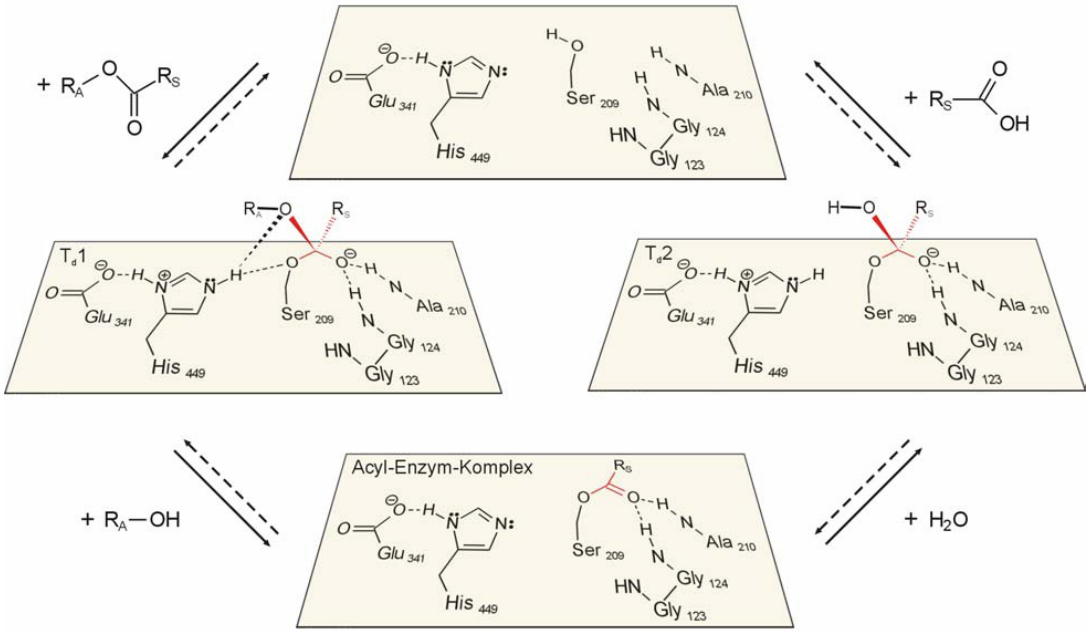


Abbildung 3: Reaktionsmechanismus von Lipasen bei der Hydrolyse von Esterverbindungen anhand der *Candida rugosa* Lipase [Bornscheuer, 1999]

Der wichtigste strukturelle Unterschied zwischen Lipasen und Esterasen ist eine bei Lipasen vorhandene bewegliche Oligopeptideinheit, die in der freien, nicht aktiven Form den Zugang zum aktiven Zentrum für Substratmoleküle versperrt. Die Öffnung dieses so genannten Deckels („lid“) wird durch Konformationsänderungen der Lipase an der Grenzfläche zwischen Wasser und einer hydrophoben Substanz hervorgerufen. Außerdem ist diese Grenzflächenaktivierung der Lipase häufig von einer kritischen Substratkonzentration abhängig. Diese Konformationsänderungen an der Grenzfläche sorgen aber nicht nur für den Zugang zum aktiven Zentrum sondern auch für die korrekte Orientierung der Oxyaniontasche, was ebenfalls für die katalytische Aktivität einer Lipase von großer Bedeutung ist. Diese Eigenschaft führt dazu, dass Lipasen bevorzugt wasserunlösliche Substrate umsetzen.

Esterasen dagegen besitzen dieses Strukturelement nicht. Auch die gegenüber Lipasen unterschiedliche Beschaffenheit der Substratbindungsstelle sorgt dafür, dass Esterasen eher wasserlösliche, kurzkettige Ester als Substrate bevorzugen.

Zwischen den beiden Unterklassen der Lipasen und Esterasen gibt es jedoch einige Grenzfälle. So zeigt die Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL-B) nur ein verkürztes Lid-Strukturelement, was sich auch auf die enzymatischen Eigenschaften niederschlägt [Uppenberg et al., 1994]. Bei CAL-B beispielsweise entfällt die Grenzflächenaktivierung.

1.1.2.1 Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE I)

Im Jahr 1990 konnte eine Esterase von Choi et al. aus *Pseudomonas fluorescens* kloniert und exprimiert werden [Choi et al., 1990]. Das Gen zeigte eine Größe von 708 bps *orf*, kodierend für ein Protein mit 236 Aminosäuren und einer theoretischen Molekülmasse von 26936 Da. Spätere Untersuchungen ergaben jedoch eine Sequenz bestehend aus insgesamt 816 bps [Pelletier et al., 1995]. Das Gen besitzt einen für *Pseudomonas* typischen GC-Gehalt von 62 % und kodiert für 272 Aminosäuren. Die Kristallstruktur der PFE I ist nicht bekannt. Allerdings zeigt sie neben den typischen Esterase-Eigenschaften auch Bromierungsaktivität und weist darüber hinaus auch eine hohe Sequenzhomologie zu den häm-freien bakteriellen Haloperoxidasen auf, wodurch die evolutive Verwandtschaft mit diesen Enzymen indiziert wird [Pelletier et al., 1995]. Insbesondere mit der Chloroperoxidase F aus *Pseudomonas fluorescens* (55%), der Chloroperoxidase L aus *Streptomyces lividans* (49%) und der Bromoperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762 (45%) ist eine hohe Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenz zu beobachten. Ausgehend von den bekannten Strukturen dieser Haloperoxidasen konnte ein Homologiemodell der PFE I erstellt werden (Abbildung 4).

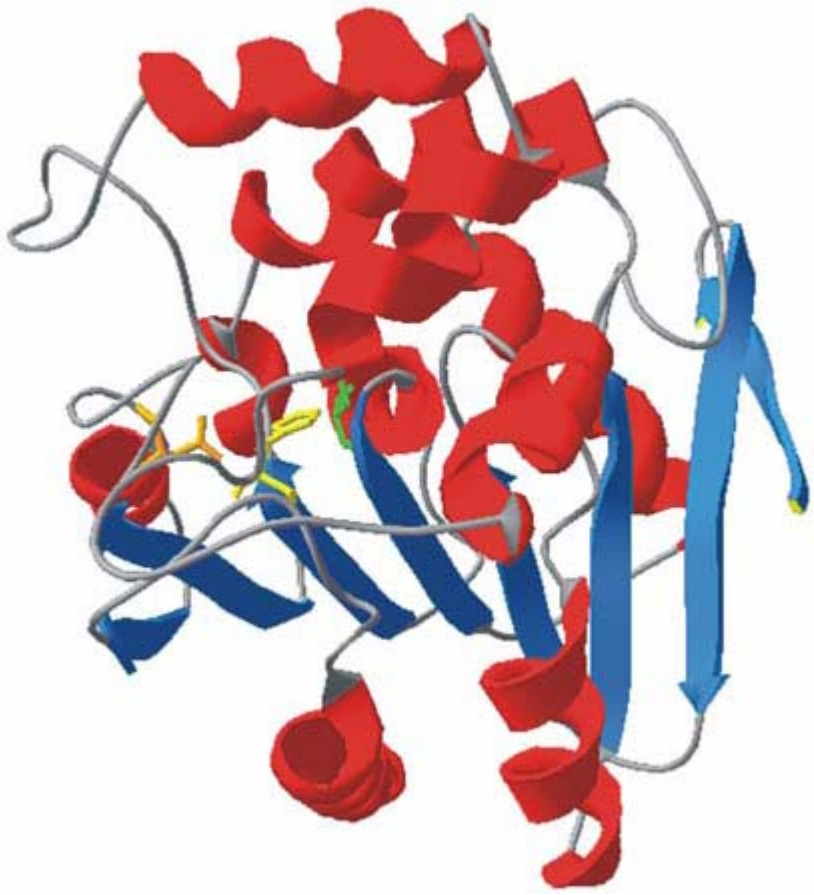


Abbildung 4: Homologiemodell der PFE I.

Die acht parallelen β-Faltblatt-Strukturen (blau) und die α-Helices (rot) weisen die für Serin-Hydrolasen typische α/β-Hydrolasefaltung auf [Ollis et al., 1992]. Die katalytische Triade ist aus den Aminosäuren Serin (grün), Asparaginsäure (orange) und Histidin (gelb) zusammengesetzt. Der im Gegensatz zu Lipasen für Esterasen charakteristische freie Zugang zum aktiven Zentrum ist gut zu erkennen.

Außerdem gelang es, die PFE I in *E. coli* zu überexprimieren und vollständig zu charakterisieren [Krebsfanger et al., 1998a; Krebsfanger et al., 1998b; Liu et al., 2001; Zocher et al., 1998].

Die Esterase ist im pH-Bereich von 5 bis 10 aktiv, wobei das Aktivitätsoptimum bei pH 8 zu finden ist. Ebenso ist sie im Temperaturbereich von 30 – 70°C aktiv, jedoch bei Temperaturen über 50°C äußerst instabil. Das Temperaturoptimum liegt bei 40°C. Gegenüber 4-Nitrophenylacetat zeigte die PFE I eine spezifische Aktivität von 120 U/mg. Von den eingesetzten Substraten wurden bevorzugt Substrate mit kurzkettiger Säure- ($<C_5$) bzw. Alkoholfunktion ($<C_5$) wie beispielsweise Essigsäureethylester, Buttersäureethylester und –propylester umgesetzt. Bei den Untersuchungen zur Darstellung optisch reiner Verbindungen zeigte die PFE I lediglich in der Racematspaltung von 1-Phenylethanol bzw. 1-Phenylethylacetat eine hohe Stereoselektivität.

1.1.2.2 Esterase aus Geobacillus stearothermophilus (BSE)

Die Esterase wurde von Kugimiya et al. aus dem Stamm *Bacillus stearothermophilus* IFO12550 (später *Geobacillus stearothermophilus*) isoliert und vollständig charakterisiert. Das Gen der BSE besteht aus 765 Nukleotiden (255 Aminosäuren, M_r = 29341 Da). Der GC-Anteil ist mit 49 % für ein thermophiles Bakterium eher gering.

Ein paar Jahre danach gelang es, durch den Einsatz rekombinanter DNA-Technologien das Enzym durch Überexpression in *Bacillus brevis* in größerem Maßstab herzustellen [Tulin et al., 1993].

Die Esterase zeigte, aus einem thermophilen Organismus kloniert, auch bei Temperaturen bis 60 °C hohe Aktivitäten (Temperaturoptimum: 55 °C), was sie zu einem äußerst interessanten Enzym für Industrie und Diagnostik machte. Amaki et al. konnten die Thermostabilität des Enzyms durch ortsspezifische Mutagenese auf 70°C erhöhen. Die Aminosäuresequenz der Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* besitzt an den Positionen 45 und 115 zwei freie Cysteinreste, deren Disulfidbindungen bei hohen Temperaturen äußerst instabil sind. Ein Austausch der beiden Cysteine durch Alanin oder Serin führte letztendlich zu der deutlich erhöhten Temperaturstabilität des Enzyms.

Die BSE ist im Bereich von pH 7,5 bis 8,5 stabil und sogar zwischen pH 6,5 und 8,5 aktiv (Aktivitätsoptimum: pH 7,5). Sie zeigt eine für Esterasen typische Substratspezifität gegenüber kurzkettigen Fettsäuren (C_2 bis C_4) wie 4-Nitrophenylacetat und Tributyrin. Mit Zunahme an Kohlenstoffatomen in der Acylgruppe nimmt die Aktivität systematisch ab.

1.1.2.3 *p*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus subtilis* (BSubpNBE)

Bei der Untersuchung von Extrakten aus Bakterien- und Pilzkulturen stellten Brannon et al. fest, dass *B. subtilis* eine Esterase produziert, die in der Lage ist, selektiv die *p*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe in synthetischen Vorläufern des Antibiotikums Cephalexin abzuspalten [Brannon et al., 1976]. Das für die Esterase kodierende Gen *pnbA* besteht aus 1470 Nukleotiden. Die 489 Aminosäuren große BsubpNBE hat eine theoretische Masse von 53997 Da.

Eli Lilly suchte Anfang der 90er Jahre einen Ersatz für die bisher verwendete katalytische Abspaltung dieser Schutzgruppe in der Synthese von Antibiotika, bei der große Mengen Zinkabfälle anfielen [Chen et al., 1995]. Um größere Mengen des Biokatalysators produzieren zu können, wurde das kodierende *pnb*A-Gen kloniert und in *E. coli* DH5α exprimiert [Zock et al., 1994]. Als Problem bei der technischen Verwendung des Enzyms zur Synthese des Antibiotikums Loracarbef trat allerdings die hohe Empfindlichkeit der Esterase gegenüber dem Kosolvens DMF auf. Die in Zusammenarbeit mit Eli Lilly durchgeführten Arbeiten von Arnold [Moore et al., 1996] zur Steigerung der Lösungsmittelstabilität der BsubpNBE waren mit die Ersten auf dem Gebiet der gerichteten Evolution.

1.1.3 Hydantoinasen (Dihydropyrimidinasen)

Hydantoinasen sind in der EC-Nomenklatur als cyclische Amidasen (EC 3.5.2) klassifiziert [Syldatk et al., 1999]. Diese, im Vergleich zu Lipasen oder Esterasen, relativ kleine Unterklasse setzt sich aus nur vier verschiedenen Enzymen zusammen: die Dihydropyrimidinase (Hydantoinase, 5,6-Dihydropyrimidin-Aminohydrolase, EC 3.5.2.2), die Allantoinase (Allantoin-Amidohydrolase, EC 3.5.2.5), die Carboxymethylhydantoinase (L-Carboxymethylhydantoin-Amidohydrolase, EC 3.5.2.4) sowie die *N*-Methylhydantoinase (EC 3.5.2.14).

Der Begriff der „Hydantoinase“ wurde in der EC-Nomenklatur eigentlich als alternativer Name für die Dihydropyrimidinase eingeführt. Dihydropyrimidinasen sind in der Natur sehr weit verbreitet. Man hat sie schon frühzeitig in Säugetieren [Gaebler et al., 1926] und Pflanzen [Eadie et al., 1949], später auch in vielen bekannten Mikroorganismen wie *Bacillus, Pseudomonas, Agrobacterium, Streptomyces* oder *Arthrobacter* gefunden [Lee et al., 1995; Syldatk et al., 1987; Yamada et al., 1978]. In ihrer natürlichen Funktion sind die Dihydropyrimidinasen am reduktiven Stoffwechsel von Pyrimidin und dessen Derivaten beteiligt (Abbildung 5). Der Abbau von Pyrimidinanaloga wie z. B. 5-Fluorouracil, die als Wirkstoffe für die Tumorbehandlung eingesetzt werden, brachte diesem Enzym große Bedeutung ein. Defekte an der Dihydropyrimidinase sowie an anderen Enzyme, die an diesem Stoffwechsel beteiligt sind, können zu Funktionsstörungen des zentralen

Nervensystems aufgrund niedriger Konzentrationen an Neurotransmittern wie β-Alanin und β-Aminoisobutyrat führen [vanGennip et al., 1997].

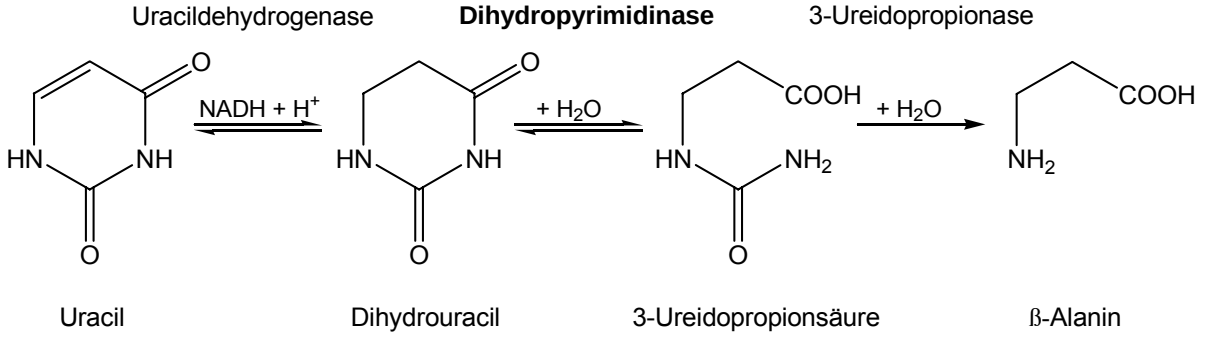


Abbildung 5: Reduktiver Stoffwechsel von Pyrimidinen am Beispiel des Uracils unter Beteiligung der Dihdropyrimidinase

Alle bisher gefundenen Dihydropyrimidinasen liegen als Homodimere bzw. Homotetramere vor, deren Untereinheiten jeweils eine Masse von 50 bis 60 kDa aufweisen. Sie benötigen Metallionen, um ihre katalytische Aktivität aufrecht zu erhalten (Abbildung 6). Dies hat zur Folge, dass Dihydropyrimidinasen durch Chelatliganden inhibiert werden können. Bis auf die Dihydropyrimidinase aus *Clostridium uracilum* [Campbell, 1958] hydrolysieren alle bekannten Dihydropyrimidinasen Hydantoin und dessen Derivate. Dies stellt die EC-Nomenklatur in Frage, die besagt, dass „alle Dihydropyrimidinasen auch gleichzeitig Hydantoinasen sind“ (siehe oben). Interessanterweise zeigen alle Dihydropyrimidinasen beim Umsatz von 5’-monosubstituierte Hydantoinen ausnahmslos D-Selektivität. In Abbildung 6 ist ein vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für die Hydrolyse von Hydantoinen, katalysiert durch die Hydantoinase von *Arthrobacter aurescens* DSM 3745, schematisch dargestellt [Syldatk et al., 1999].

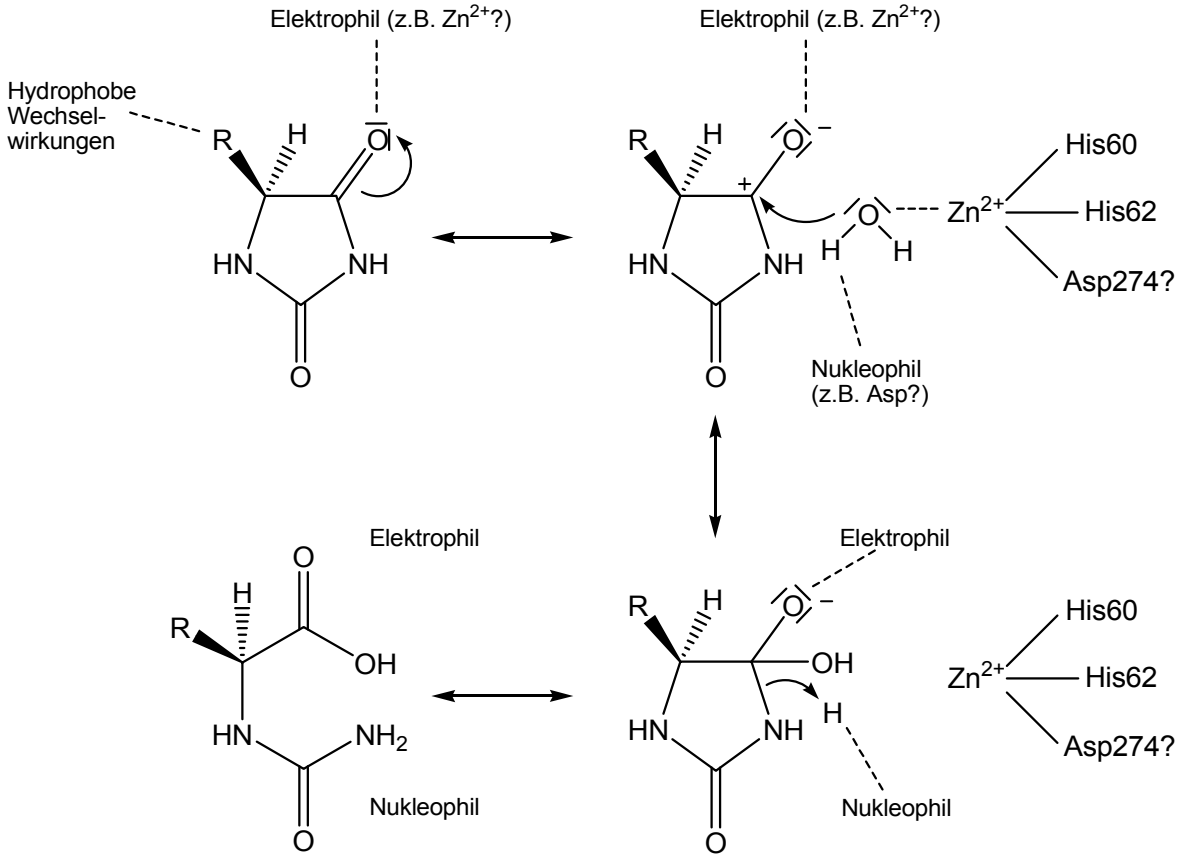


Abbildung 6: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für die Hydrolyse von 5'-monosubstituierten Hydantoinen katalysiert durch die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745.

Nach der Substratbindung wird der Carbonylsauerstoff durch einen elektrophilen Aminosäurerest oder möglicherweise sogar ein Zinkion stabilisiert. Ein durch Zinkionen aktiviertes Wassermolekül greift nukleophil am positivierten Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe an. Dies führt zur Ausbildung eines tetrahedralen Intermediats. Die darauffolgende Ringöffnung wird durch Protonierung des Ringstickstoffs unterstützt [Syldatk et al., 1999].

Mittlerweile hat man jedoch eine bisher nicht näher klassifizierbare ATP-abhängige Hydantoinase aus *Bacillus brevis* gefunden, die in der Lage ist, 5'-monosubstituierte Hydantoine L-enantioselektiv umzusetzen [Yamashiro et al., 1988].

Die wichtigste industrielle Anwendung von Hydantoinasen liegt in der Produktion von optisch reinen Aminosäuren aus racemischen Hydantoinderivaten [Ogawa et al., 1997]. Bei diesem zweistufigen Prozess katalysiert die Hydantoinase zunächst die Hydrolyse von racemischen Hydantoinderivaten je nach Enantioselektivität zu D- bzw. L-*N*-Carbamoylaminosäure (Abbildung 7). Zur Abspaltung der Carbamoylschutzgruppe und damit zur Freisetzung der Aminosäure wird eine Carbamoylase benötigt. Um die Ausbeuten an optisch reinem Produkt theoretisch auf bis zu 100% zu erhöhen, wird eine Hydantoinracemase verwendet.

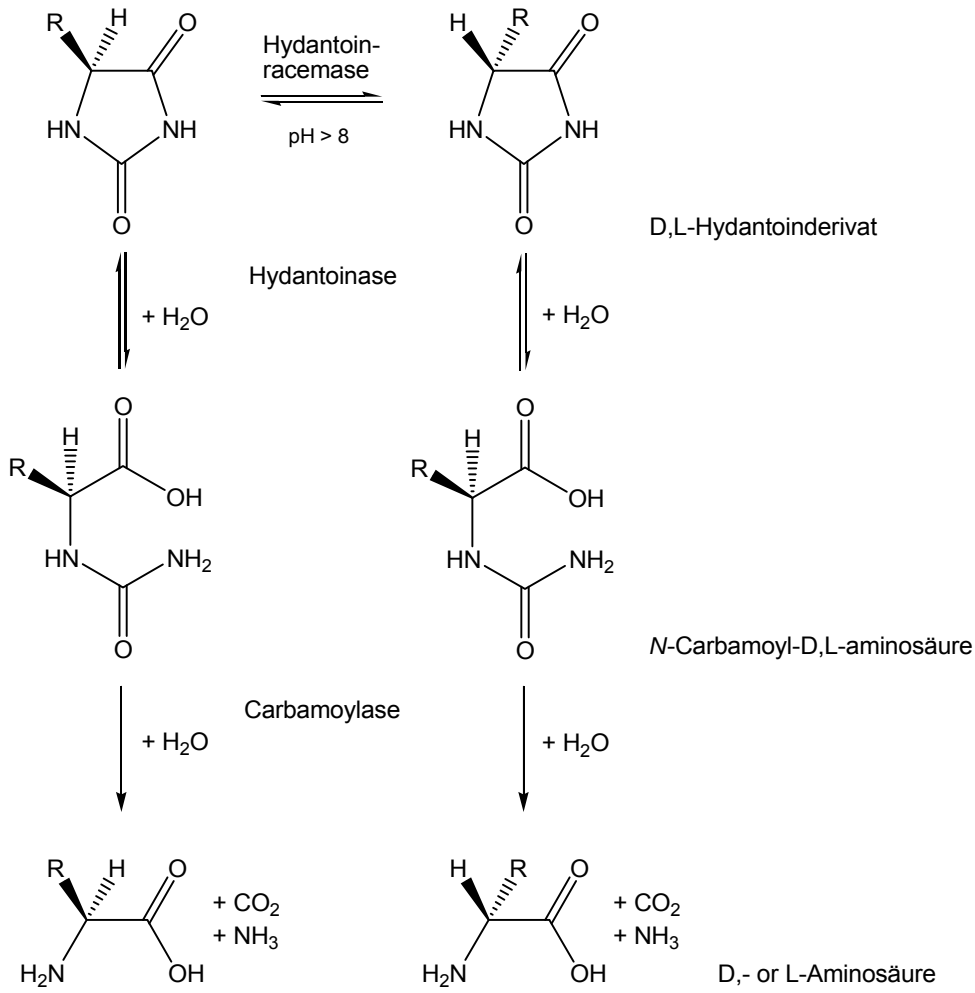


Abbildung 7: Schema des Hydantoinaseprozesses zur Herstellung enantiomerenreiner Aminosäuren [Syldatk et al., 1999]

1.1.3.1 Hydantoinase aus Arthrobacter crystallopoietes (HAC)

Im Jahr 1998 isolierten und charakterisierten Siemann et al. eine D-spezifische Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 [Siemann et al., 1999]. Das aktive Enzym ist ein für Hydantoinasen typisches Tetramer mit einer Gesamtmasse von 257 kDa, während die vier identischen Untereinheiten eine Masse von ca. 64 kDa aufweisen. Die Hydantoinase besitzt bei ihrem pH-Optimum (pH 8,0) eine extrem hohe Stabilität mit einer Halbwertszeit von 400 h. Das Temperaturoptimum bei Einsatz des Hydantoinasemodellsubstrat D,L-5-Phenylhydantoin liegt bei 50°C. Besonders hohe Aktivität zeigt die Hydantoinase auch gegenüber unsubstituiertem Hydantoin, D,L-5-Indolylmethylhydantoin und D,L-

5-Methylthioethylhydantoin, wobei sie streng D-selektiv ist. Allerdings benötigt sie, wie bei Hydantoinasen üblich, 1mM $Zink^{2+}$-Ionen als Kofaktor für eine korrekte Faltung während des Expressionsvorgangs sowie für die Aufrechterhaltung der katalytischen Aktivität (Kap. 1.1.3)

1.2 Möglichkeiten zur Optimierung eines Biokatalysators

1.2.1 Optimierung eines biokatalytischen Prozesses

Die Natur stellt eine reichhaltige Quelle an Biokatalysatoren aus mikrobiellen Organismen dar, die für industrielle Prozesse interessant sein können. Oftmals führt die Charakterisierung eines geeigneten Enzyms, das im Rahmen des Testverfahrens identifiziert wurde, zu der Erkenntnis, dass die Eigenschaften im Hinblick auf die Entwicklung eines rentablen Herstellungsprozesses nur unzureichend sind. Häufig zeigt das Enzym bei den angestrebten Reaktionsbedingungen (organisches Lösemittel, Temperatur) eine zu geringe Stabilität, eine zu niedrige Umsatzrate oder eine zu geringe Regio- bzw. Enantioselektivität. Zur weiteren Optimierung stehen mehrere Möglichkeiten offen (Abbildung 8).

Beim Substrat-Engineering wird die Fähigkeit des Enzyms zur chiralen Diskriminierung aufgrund der Sterik des umzusetzenden Substrats ausgenutzt. So lässt sich die Enantio- aber auch die Regioselektivität eines Enzyms durch Variation der Substratstruktur (z.B. Addition oder Entfernung einer Schutzgruppe) verändern [Faber, 2000].

Eine weitere Möglichkeit ist die Beeinflussung der Selektivität durch den Einsatz von organischen Lösemitteln oder Kosolvenzien. Außerdem spielt der pH-Wert eine nicht zu unterschätzende Rolle im Hinblick auf die Enzymaktivität sowie die Substratstabilität [Klibanov, 1997].

Auch die Immobilisierung oder die chemische Modifikation eines Enzyms kann einige Vorteile mit sich bringen. Neben einer gesteigerten Raum-Zeit-Ausbeute ist eine Isolierung, Langzeit- und Lagerstabilität sowie die Möglichkeit einer Wiederverwertung des Biokatalysators möglich, was für immense Kosteneinsparungen sorgt [Vorlop, 1997]. Bei der sogenannten *imprinting*-Technik ändert sich die Anordnung der Proteinstruktur in Gegenwart eines Liganden. Wird

das Enzym daraufhin lyophilisiert, so bleibt der Konformationswechsel, unter anderem des aktiven Zentrums, auch beim Einsatz in wasserfreien Lösemitteln erhalten, was unter anderem die Regio- und Stereoselektivität verändern kann [Klibanov, 2001].

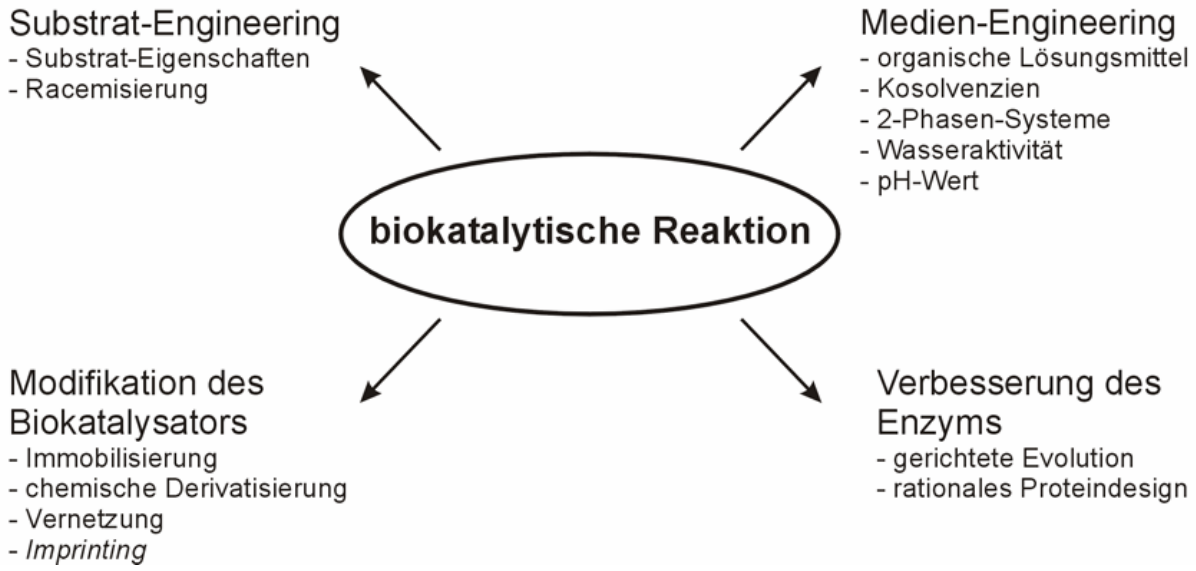


Abbildung 8: Methoden zur Optimierung enzymkatalysierter Reaktionen

Stellt sich jedoch das Problem, dass man mit dem generell brauchbaren Enzym keinen kostengünstigen Prozess etablieren kann, da bestimmte Reaktionsparameter nicht toleriert werden – durch geringe Temperatur-, Lösungsmittel- oder pH-Stabilität - bleibt die Möglichkeit, direkte Veränderungen am Enzym auf molekular-genetischer Ebene durchzuführen. Die Methoden der Gerichteten Evolution und des Rationalen Proteindesigns werden im nächsten Kapitel näher erläutert (Kap. 1.2.2)

1.2.2 Gerichtete Evolution und Rationales Proteindesign

Zur Optimierung von Enzymen für einen bestimmten biokatalytischen Prozess wurden seit dem Beginn der neunziger Jahre neben chemisch-physikalischen Methoden auch Modifikationen auf molekular-genetischer Ebene durchgeführt [Olsen et al., 2000]. Es handelt sich hierbei vor allem um das Rationale Protein Design sowie die Gerichtete Evolution (Abbildung 9) [Arnold, 2001; Bornscheuer, 1998; Bornscheuer et al., 2001].

Beim **Rationalen Protein Design** wird mittels bioinformatischer Methoden (*molecular modelling*) versucht, Vorhersagen darüber zu machen, wie eine Proteinstruktur geändert werden muss, damit sich die Eigenschaften des Biokatalysators in die gewünschte Richtung lenken lassen. Hierzu sind neben der Kenntnis der Aminosäure-Sequenz und der damit verbundenen Proteinstruktur auch genaue Informationen über mechanistische und dynamische Vorgänge bei der Katalysereaktion erforderlich. Jedoch stehen solch fundierte Informationen nur bei ganz wenigen Proteinen zur Verfügung. Zudem ist es nach Änderung eines Merkmals (z.B. erhöhte Stabilität) nahezu unmöglich, die Auswirkungen auf andere Eigenschaften (z.B. Aktivität) vorherzusagen. Trotz des hohen Zeitaufwands und der relativ wenigen Beispiele für die Verbesserung eines Enzyms (vor allem zur Thermostabilität) durch rationales Proteindesign, stellt dieser Ansatz, insbesondere im Zusammenspiel mit evolutiven Methoden, eine aussichtsreiche Perspektive für die Zukunft dar [Bornscheuer et al., 2001]. Unterstützt wird dieser Anspruch durch neueste Erkenntnisse, dass die derzeit bekannten Enzyme nur aus wenigen gemeinsamen Vorläufern abstammen und somit die unterschiedlichen Aktivitäten auf geringen Modifikationen in den Strukturen der aktiven Zentren beruhen [Arnold, 2001].

Bei der Methode der **Gerichteten Evolution** dagegen macht man sich die natürlichen, evolutiven Vorgänge zur Adaption von Organismen aller Art an veränderte Lebensbedingungen zu nutze. Während bei den Ansätzen zur Veränderung ganzer metabolischer Wege in Mikroorganismen im Allgemeinen auf den Einsatz mutagener Bedingungen, wie dem Zusatz von chemischen Mutagenen oder die Bestrahlung mit UV-Licht zurückgegriffen wurde, beruhen die beschriebenen Methoden der Zufallsmutagenese in der gerichteten Evolution meist auf dem Einsatz von PCR–Techniken [Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988; Saiki et al., 1985].

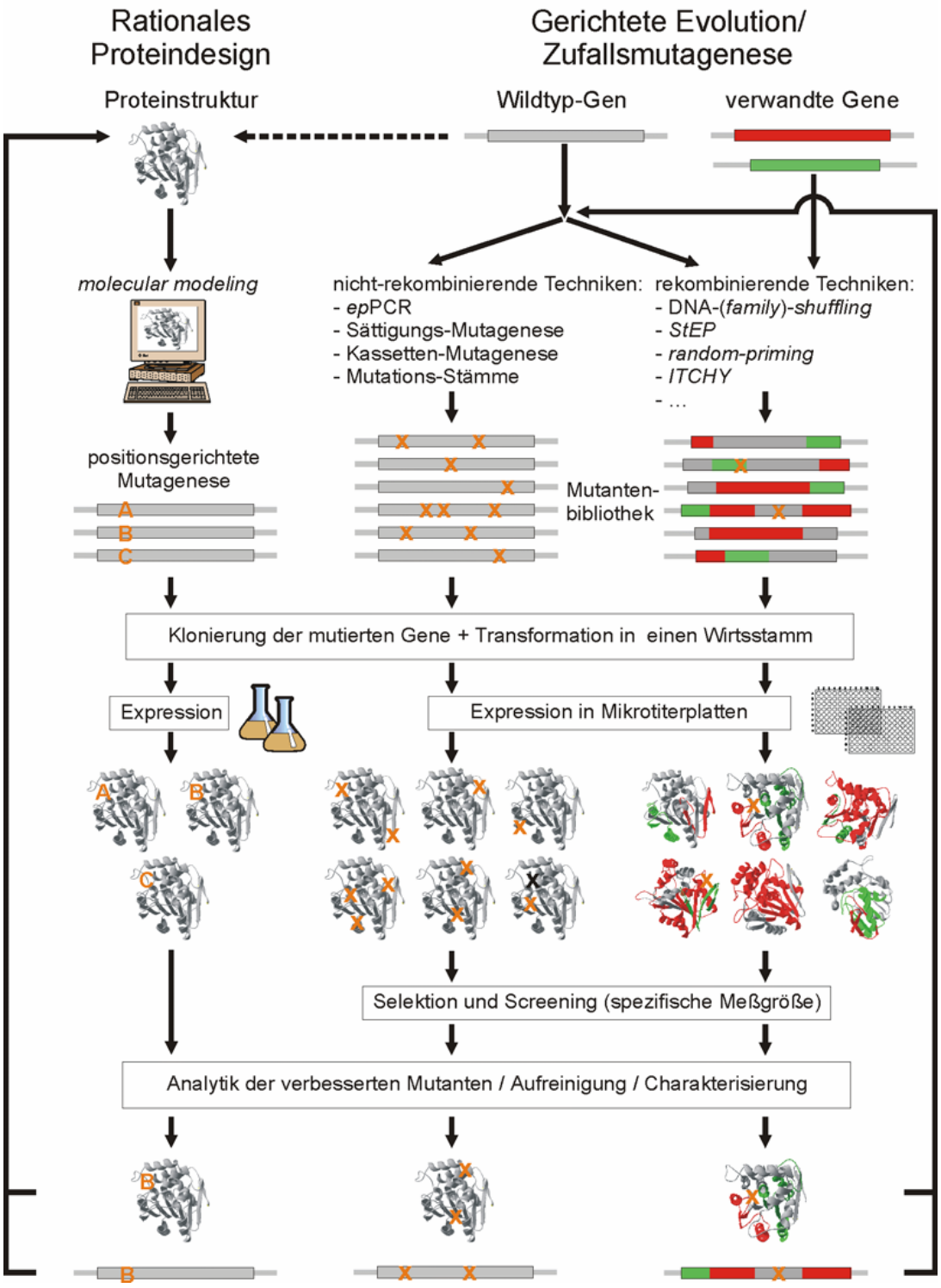


Abbildung 9: Schematische Darstellung der prinzipiellen Vorgehensweisen beim rationalen Proteindesign (A,B,C: gezielt ausgetauschte Aminosäure) und der gerichteten Evolution (X: Punktmutation durch Zufallsmutagenese). Die schrittweise Verbesserung des Enzyms kann iterativ erfolgen, wobei im Idealfall beide Methoden zum Einsatz kommen sollten [Baumann, 2002].

Generell kann man die Methode der gerichteten Evolution als einen Prozess beschreiben, bei dem zunächst mittels spezieller Techniken zufällige Veränderungen in ein Protein eingebracht werden. Anschließend werden aus der Vielzahl der Proteinvarianten mit Hilfe eines dem Problem angepassten Screeningverfahrens (Kap. 1.2.3) verbesserte Mutanten erkennbar gemacht. So sind bei evolutiven Methoden diese beiden Schritte, Etablierung eines zuverlässigen Mutationsverfahrens und einer schnellen Technik zum Auffinden positiver Varianten, von besonderer Bedeutung. Die prinzipielle Vorgehensweise bei der Gerichteten Evolution ist in vielen Übersichtsartikeln umfassend erörtert [Arnold, 1998; Arnold et al., 1999; Arnold, 1997; Bornscheuer, 1998; Bornscheuer, 2000; Bornscheuer, 2001; Bornscheuer et al., 2001; Burton et al., 2002; Farinas et al., 2001; Jaeger et al., 2001; Powell et al., 2001; Reetz, 2000; Reetz et al., 1999; Reetz et al., 2000a; Schmidt-Dannert, 2001; Smith, 1994; Zhao et al., 2002; Zhao et al., 1998; Zocher, 2001].

Als eine der wichtigsten, sogenannten nicht-rekombinierenden Techniken auf dem Gebiet der Zufallsmutagenese ist die sogenannte *error-prone* PCR (*ep*PCR) zu nennen (Abbildung 8). Dabei wird ein Gen mittels PCR unter empirischer Variation der Reaktionsbedingungen (Nukleotid-Verhältnis, Mg^{2+}- und Mn^{2+}-Konzentration sowie Basenanaloga) amplifiziert, die zu fehlerhaftem Austausch von einzelnen Nukleotiden führt [Leung, 1989]. Erste erfolgreiche Arbeiten, die tatsächlich verbesserte Biokatalysatoren mit sich brachten, wurden jedoch erst ein paar Jahre später veröffentlicht [Chen et al., 1993; Moore et al., 1996; You et al., 1996].

Eine weitere bekannte Methode ist das sogenannte DNA *shuffling* (Abbildung 8). Diese komplexe Technik beruht auf der zufälligen Fragmentierung des zu mutierenden Gens durch partiellen Verdau mit einer unspezifischen Endonuklease (DNAse). Anschließendes Wiederzusammensetzen der Fragmente mittels einer speziellen PCR-Technik führt ebenfalls zu einzelnen Punktmutationen. Das besondere Potential dieser Technik liegt in der Möglichkeit, Fragmente verschiedener (hoch)homologer Gene, z. B. verschiedener durch Zufallsmutagenese erhaltener Varianten eines Gens, miteinander zu rekombinieren [Chang et al., 1999; Christians et al., 1999; Crameri et al., 1996]. Werden als parenterale Gene tatsächlich verwandte Gene aus verschiedenen Quellen eingesetzt und nicht Varianten desselben Gens, spricht man häufig vom *DNA family shuffling*. Als weitere Methoden zur Zufallsmutagenese, die wie beim DNA *shuffling* auf Rekombination

beruhen, ist der *Staggered Extension Process* (StEP) [Zhao et al., 1998], die *Random-Priming* Methode [Shao et al., 1998], das *RACHITT*-Verfahren (*random chimeragenesis on transient templates*) [Coco et al., 2001] sowie die *ITCHY* Methode (*incremantal truncation for the creation of hybrid enzymes*) [Kurtzman et al., 2001; Ostermeier et al., 1999] zur Vermischung nicht-homologer DNA-Sequenzen zu nennen. Diese Verfahren haben aber bei weitem nicht die Verbreitung wie das DNA *shuffling* oder die *ep*PCR gefunden.

Mit den Methoden der Gerichteten Evolution lässt sich eher selten bereits nach einem ersten Durchgang von Zufallsmutagenese und Selektion eine zufrieden stellende Verbesserung der gewünschten Eigenschaft eines Proteins erreichen. Zur weiteren Optimierung können zusätzliche Mutationen durch erneute Zufallsmutagenesedurchgänge mit dem bereits angewendeten Verfahren sowie stattdessen eine Kombination mit anderen Mutagenesearten, wie z. B. eine Sättigungs-Mutagenese (durch den *one-step overlap extension process*) [Jaeger et al., 2001] für sogenannte „*Hot Spots*“ (Bereiche, die bekanntermaßen für die Veränderung einer bestimmten Eigenschaft des Enzyms sorgen) oder eine Kassetten-Mutagenese (gezielte Mutationen in einem entscheidenden Sequenzbereich), verwendet werden. So konnten Reetz et al. [Reetz et al., 2000a] eine deutliche Steigerung der Enantioselektivität einer Lipase erst durch mehrere Runden von *ep*PCR mit anschließender Sättigungsmutagenese auf den Positionen, die sich als besonders einflussreich gezeigt hatten, erreichen.

Beide Methoden, die **Gerichtete Evolution** sowie das **Rationale Protein Design**, besitzen einige entscheidende Vor- und Nachteile. Um ein Protein mit evolutiven Methoden zu verändern, muss das kodierende Gen für dieses Protein zugänglich und hinreichend aktiv in einem geeigneten Wirtsorganismus exprimiert werden können. Daher ist im Allgemeinen zur Expression auch ein effektiv zu transformierender und leicht kultivierbarer Organismus notwendig. Dabei hat sich *E. coli* als idealer Organismus für die Bedingungen der Gerichteten Evolution erwiesen. Sind bei einem Protein, dessen Eigenschaften verbessert werden sollen, zur aktiven Expression jedoch post-translationale Modifikationen wie z.B. eine Glykosylierung notwendig, kommt man nicht umhin, statt *E. coli* Hefezellen wie *Saccharomyces cerevisiae* [Low et al., 1996] als Expressionssysteme einzusetzen. Des Weiteren sind beim Screening großer Mutantenbibliotheken aufwendige Aktivierungen eines

Enzyms wie z.B. das *Refolding* mit Helferproteinen nicht möglich, was zur Folge hat, dass dieses Enzym zur Verbesserung mittels evolutiver Methoden nicht geeignet ist.
Rationale Methoden benötigen, wie bereits erwähnt, weit reichende strukturelle Informationen des zu verändernden Proteins. Da ebenfalls Kenntnisse darüber vorhanden sein sollten, wie die gewünschte Änderung der Proteineigenschaften durch strukturelle Modifikationen zu erreichen ist, bieten sich vor allem in Bereichen, in denen Struktur-Wirkungs-Mechanismen nur unzureichend verstanden sind, bessere Ausgangschancen mit evolutiven Methoden. Andererseits können durch die Methoden der Gerichteten Evolution auch Hinweise auf Verknüpfungen zwischen geringen strukturellen Veränderungen im Molekül und einer veränderten Proteineigenschaft gefunden werden, um weitere Erkenntnisse im Bereich der Struktur-Wirkungs-Beziehung zu erhalten.

1.2.3 High-Throughput Screening (HTS)

An erster Stelle eines HTS-Systems steht die physikalische Trennung der Zellen, um die Untersuchung der einzelnen Klone bzw. der hiervon abgeleiteten Kolonien zu ermöglichen [Cohen et al., 2001]. Diese Separation erfolgt üblicherweise durch Ausplattieren auf einem Festmedium (z.B. in Petri-Schalen), woran sich in Abhängigkeit vom Testsystems eine Vereinzelung der Kolonien in Mikrotiterplatten anschließen kann. Diese Überführung und Separation in Mikrotiterplatten wird üblicherweise mit Hilfe eines Pick-Roboters durchgeführt. Hiernach ist es möglich, die Untersuchungen zur Identifizierung eines neuen oder verbesserten Biokatalysators mit lebenden, ganzen Zellen auszuführen bzw. die nach einem Aufschluss freigesetzten Enzyme über eine spezifische Messgröße zu charakterisieren und zu vergleichen.
Die Auswahl eines geeigneten Screening- oder Selektionsverfahrens richtet sich in erster Linie nach der Aufgabenstellung. Hierbei ist zu beachten, dass die gewählten Testbedingungen (Substrat; pH-Wert; Temperatur; Lösungsmittel; usw.) die Anforderungen des angestrebten biokatalytischen Prozesses so gut wie möglich imitieren. Die qualitative Unterscheidung der einzelnen Individuen einer Bibliothek beruht meist auf einem Aktivitätsassay z. B. auf Hofbildung (Tributyrin-Agar) oder

erfolgt über eine Indikatorreaktion (pH-Indikatoren; Farbreaktionen) [Demirjian et al., 1999; Moris-Varas, 2001; Moris-Varas et al., 1999].

Stemmer verwendete bei seinen ersten Arbeiten ein Selektionsverfahren, um die Technik des *DNA shufflings* zu etablieren [Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b]. Dabei wurde eine β-Lactamase der Zufallsmutagenese unterworfen und die erhaltenen Klone auf Agarplatten mit steigenden Konzentrationen des Antibiotikums Cefotaxime ausplattiert, das vom Wildtyp der Lactamase nur schlecht hydrolysiert wird. So konnten nur Klone auf den Platten wachsen, deren veränderte β-Lactamasen eine höhere Aktivität gegenüber dem Antibiotikum aufwiesen.

Die Gruppe um Arnold verwendete für ihre Arbeiten zur Steigerung der Lösungsmittelstabilität einer Esterase [Moore et al., 1996] ein Assaysystem, bei dem bei erfolgreicher Hydrolyse ein Chromophor freigesetzt wurde. Bei den Versuchen, die Abspaltung der *p*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe von dem Antibiotikum Loracarbef in wässrigen Lösungen mit hohem Dimethylformamidanteil zu ermöglichen, setzte man das entsprechende *p*-Nitrophenyl-Analogon ein. Bei erfolgreicher Umsetzung konnte man so das freigesetzte gelbe *p*-Nitrophenolat nachweisen.

Im Gegensatz zu den Testsystemen, bei denen die Identifizierung von neuen oder verbesserten Biokatalysatoren über den Substratverbrauch oder die Produktzunahme erfolgt, sind in den letzten Jahren neue molekularbiologisch-molekulargenetische Selektionsverfahren (genetische Marker-Proteine, wie z.B. GFP oder β-Galactosidase; *querying for enzymes using the three-hybrid system - QUEST*), für das Screening spezieller Enzyme entwickelt worden [Firestine et al., 2000; Olsen et al., 2000; Waldo et al., 1999; Wigley et al., 2001]. In Tabelle 2 sind einige publizierte Screening-Methoden zusammengefasst.

Tabelle 2: Verschiedene publizierte Arbeiten über Enzymoptimierung mittels Gerichteter Evolution

Problem	Mutagenesemethode	Screening-Verfahren	Referenz
Aktivitätserhöhung einer β-Lactamase	DNA *shuffling*	Selektionsverfahren	[Stemmer, 1994b]
Änderung des Produktspektrums einer Phytoen Desaturase aus *Rhodobacter spaeroides*	*ep*PCR und Sättigungsmutagenese	Koloniefärbung auf Agarplatten	[Wang et al., 2001a]
Reaktivierung einer nicht aktiven, monomeren Triosephosphat-isomerase	*ep*PCR	Selektion in einem auxotrophen Stamm	[Saab-Rincon et al., 2001]
Aktivitätssteigerung einer Alkoholdehydrogenase aus *Sulfolobus solfaribus*	*ep*PCR	Aktivitätsassay	[Giordano et al., 1999]
Aktivitätssteigerung von GFP (Kap. 1.3.4)	DNA *shuffling*	Detektion der höheren Fluoreszenzaktivität	[Crameri et al., 1996]
Steigerung der Lösemittelstabilität einer Esterase aus *Bacillus subtilis*	*ep*PCR	Aktivitätsassay mit Chromophoren	[Moore et al., 1996]
Aktivitätserhöhung einer thermophilen Glucosidase bei niedrigen Temperaturen	*ep*PCR und DNA *shuffling*	Chromophor-Assay	[Lebbink et al., 2000]
Eröhung der Enantioselektivität einer Lipase	*ep*PCR und Sättigungsmutagenese	Chromophor-Assay	[Jaeger et al., 2000]
Erhöhung der Thermostabilität einer Alkoholdehydrogenase aus *Zymomonas mobilis*	*ep*PCR	Farbassay: Aldehydnachweis mit NBT	[Rellos et al., 1994]
Änderung der Substratspezifität einer Galactosidase	DNA *shuffling*	Farbassay auf Agarplatten mit X-Fucose	[Zhang et al., 1997]
Erhöhung der Thermostabilität von Meerrettich-Peroxidase	*ep*PCR und StEP	Farbassay in MTP	[Morawski et al., 2001]
Steigerung der antiviralen Aktivität von Alpha-Interferonen	DNA *family shuffling*	Assay auf cytopathische Effekte	[Chang et al., 1999]
Erhöhung der Thermo- und Chemostabilität einer Häm-Peroxidase aus *Coprineus cinereus*	*ep*PCR kombiniert mit Rationalem Proteindesign	Messung der Restaktivität unter deaktivierenden Bedingungen	[Cherry et al., 1999]
Steigerung der Affinität eines Antikörperfragments	Mutationsstamm	*Yeast-surface-display*. Fluoreszenz-Labeling	[Boder et al., 2000]

1.3 Das Green Fluorescent Protein (GFP)

1.3.1 Die geschichtliche Entdeckung und seine natürliche Funktion

Bereits im Jahr 1955 entdeckten Davenport und Nicol [Davenport et al., 1955], dass die Licht produzierenden Zellen der Qualle *Aequorea victoria* bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht eine grünliche Fluoreszenz zeigen (Abbildung 10). Sieben Jahre später gelang die Extraktion eines Proteins aus dieser Qualle, welches genau diese fluoreszierenden Eigenschaften aufwies [Shimomura et al., 1962]. Dieses Protein wurde fortan als Green Fluorescent Protein (GFP) bezeichnet [Hastings et al., 1969].

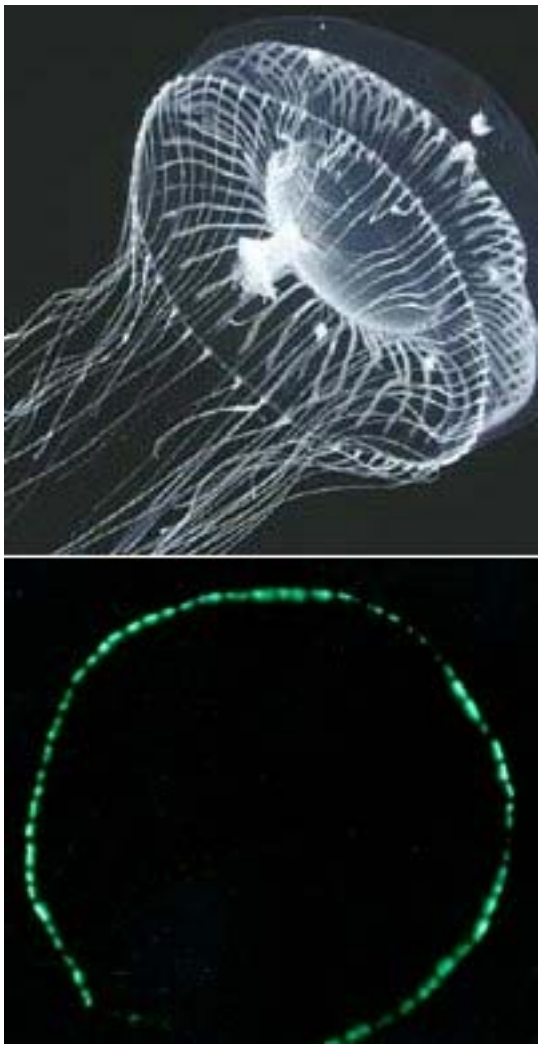


Abbildung 10: Die Qualle *Aequorea victoria* ohne (oben) und mit (unten) Biolumineszenz

Insgesamt konnten bisher vierundzwanzig natürlich vorkommende Green Fluorescent Proteine in vielen verschiedenen Hohltieren der Klassen Hydrozoa und Anthozoa gefunden werden [Cormier et al., 1974; Levine et al., 1982; Morin et al., 1971; Ward et al., 1979].

Die biologische Funktion von GFP liegt in der Konvertierung der blauen Biolumineszenz anderer Proteine. Biolumineszenz ist die Bezeichnung für einen Prozess, bei dem durch eine chemische Reaktion sichtbares Licht emittiert wird. Dabei handelt es sich meist um die Oxidation eines Substrats (Luciferin) durch ein Enzym (Luciferase). Bei dem Redoxpartner handelt es sich um molekularen Sauerstoff. Bei Aequorea sind zwei Proteine - Aequorin (die Luciferase) und GFP - an der Biolumineszenz beteiligt. Bei dem Substrat handelt es sich um Coelenterazin (das Luciferin). Durch Bindung dreier Calciumionen wird das Coelenterazin von Aequorin mit proteingebundenem

Sauerstoff oxidiert. Der Ca_3-Aequorin-Coelenteramid-Komplex emittiert blaues Licht, welches durch strahlungslosen Energietransfer zu GFP in grünlich fluoreszierendes Licht umgewandelt wird, was in einer Zunahme der Quantenausbeute der Lichtemission resultiert [Ward et al., 1979]. Diese Konvertierung unterstützt die Reduktion der Lichtstreuung und verbessert zusätzlich das Durchdringen des Lichts über größere Entfernungen [Morin et al., 1971; Ward et al., 1979].
Mit der Klonierung [Prasher et al., 1992] und Expression [Chalfie et al., 1994] des *Aequorea victoria* GFP in verschiedenen Organismen nahm das Interesse an diesem Protein deutlich zu (Kap. 1.3.4).

1.3.2 Physikalische Eigenschaften

Aequorea GFP besteht aus einem Monomer mit insgesamt 238 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 27 kDa. Alle anderen bekannten Green Fluorescent Proteine hingegen kommen in der Natur als kompakte, globuläre Dimere (2 x 27 kDa) vor.
Sie emittieren ebenso wie die meisten Mutanten des rekombinanten Wildtyps aus *Aequorea victoria* (Kap. 1.3.4) Licht im Bereich von 490 bis 520 nm; meistens bei 508 bis 509 nm (Abbildung 11). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die fluoreszierenden Proteine im Anregungsbereich von 395 bis 498 nm relativ deutlich. Besonders interessant ist die Tatsache, dass *Aequorea* GFP im Gegensatz zu allen anderen Green Fluorescent Proteinen ein Anregungsmaximum im UV-Bereich bei 395 nm besitzt [Chalfie et al., 1994; Prasher et al., 1992]. Der Extinktionskoeffizient von *Aequorea* GFP wurde bei einer Anregung von 395 nm in 1 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7,2 auf 27600 l mol^{-1} cm^{-1} bestimmt [Ward et al., 1982a]. Dieser Wert ist jedoch stark abhängig von pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke und Proteinkonzentration.

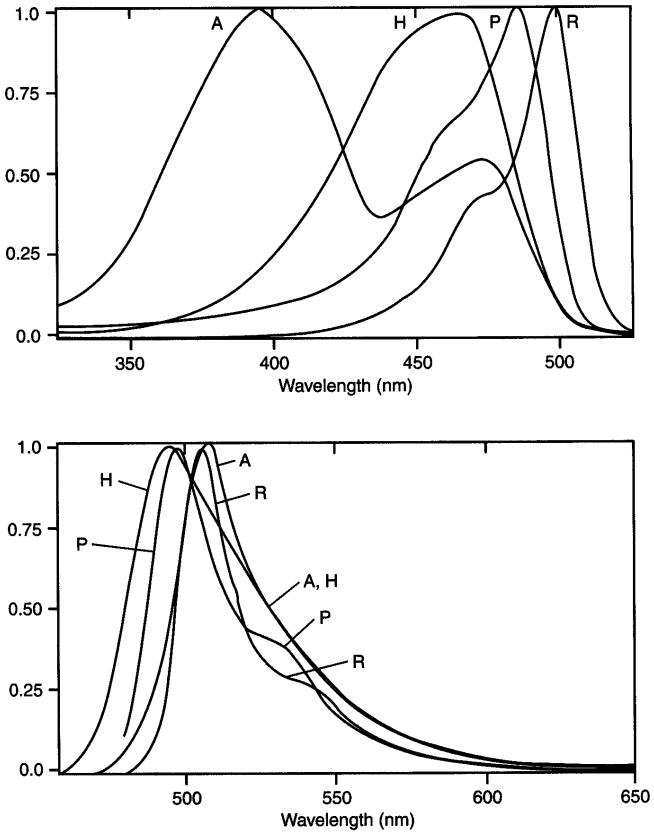


Abbildung 11: Anregungs- (oben) und Emissionsspektren (unten) von Green Fluorescent Protein von *Aequorea victoria* (A), *Halistaura cellularia* (H), *Phialidium gregarium* (P) und *Renilla reniformis* (R). Die Anregungsmaxima liegen bei 395, 465, 485 bzw. 498 nm und die Emissionsmaxima bei 509, 497, 498 bzw. 508 nm [Chalfie et al., 1998].

Ein großer Vorteil für die Nutzung als Reporter für Genexpression (Kap. 1.3.4) ist die hohe Stabilität von GFP. Diese Stabilität lässt sich anhand der dreidimensionalen Struktur erklären (Kap. 1.3.3). Die Abschirmung des Chromophors ist so vollkommen, dass klassische Fluoreszenzquencher wie Acrylamid, Halogenide oder molekularer Sauerstoff praktisch keinen Einfluss auf die Fluoreszenz haben [Rao et al., 1980].

Ein Nachteil dagegen ist die post-translationale Bildung des Chromophors erst zwei Stunden nach der Synthese von GFP (Kap. 1.3.3). Des Weiteren tendiert GFP zur Präzipitation und damit zur Bildung nicht fluoreszierender *inclusion bodies*. Auch die Größe des Fluoreszenzsignals ist relativ schwach im Vergleich zu anderen Reporterproteinen wie z. B. β-Galactosidase (LacZ) oder Luciferase (Lux) [Chalfie et al., 1998].

Die Temperaturstabilität von GFP ist bemerkenswert. Die Temperatur T_m, bei der die Hälfte der endogenen Fluoreszenz verschwunden ist, liegt bei 76°C [Bokman et al., 1981].

Natives *Aequorea* GFP und die rekombinanten Formen sind in einem pH-Bereich von 5,5 bis 10,0 stabil [Chalfie et al., 1994]. Darüber hinaus kommt es unter stark alkalischen Bedingungen zu Verschiebungen im Anregungsspektrum. Bei pH 12,0 nimmt der Peak bei 395 nm im Vergleich zu pH 8,0 ungefähr um das Doppelte ab, während sich die Schulter bei 475 nm nahezu verdreifacht [Ward et al., 1982b]. Nach saurer oder basischer Denaturierung kann die Fluoreszenz sowohl von *Aequorea* als auch von *Renilla* GFP durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol bei pH 8,0 wieder vollständig reaktiviert werden [Ward et al., 1982a].
Organische Solventien können, ähnlich wie im alkalischen Bereich, spektrale Verschiebungen von GFP auslösen [Ward et al., 1982b]. Außerdem zeichnet sich auch durch eine hohe Stabilität gegenüber denaturierenden Reagenzien wie 8 M Harnstoff, 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) oder 6 M Guanidinhydrochlorid aus [Ward et al., 1979; Ward et al., 1982b].
Der Einsatz von Proteasen in moderaten Konzentrationen zeigt keinen negativen Effekt auf die Fluoreszenz von GFP. Bei Untersuchungen mit verschiedenen Proteasen (Trypsin, Chymotrypsin, Thermolysin, Elastase, Ficin, Proteinase K, Chymopapain, Papain, Subtilisin, Pancreatin, Bromalein und Pronase) mit einer Konzentration von 43 mg/ml zeigten nur Bromalein und Pronase eine signifikante Beeinträchtigung der Fluoreszenz [Roth et al., 1983].

1.3.3 Die dreidimensionale Struktur und das Chromophor

Das Chromophor, das sich nahe des geometrischen Zentrums eines zylinderförmigen Gebildes, der sogenannten β-*can* befindet, wird von elf β-Faltblattsträngen sehr gut abgeschirmt (Abbildung 12). Am oberen und unteren Ende befinden sich kurze *loop regions* und deformierte α-Helices. Eine weitere Helix zieht sich diagonal durch diese „Kanne“, die insgesamt einen Durchmesser von ungefähr 22 Å und eine Länge von 42 Å besitzt [Yang et al., 1996].
Diese kompakte Anordnung um das Chromophor herum sorgt für hohe Stabilität und gute Fluoreszenzaktivität des Proteins (Kap. 1.3.2 und 1.3.4).

Die Tasche, in der sich das Chromophor befindet, enthält eine auffällig große Anzahl an Aminosäuren mit geladenen Seitenketten, die wahrscheinlich die Abstraktion der Protonen beim Oxidationsprozess unterstützen.

Deletionsexperimente haben gezeigt, dass nahezu die komplette Struktur (Aminosäuren 2 bis 232 [Dopf et al., 1996] oder 7 bis 229 [Li et al., 1997]) für die Chromophorbildung und Fluoreszenzaktivität benötigt wird. Das wasserstoffbindende Netzwerk um das Chromophor wird durch mehrere polare Reste und Wassermoleküle komplettiert.

Über die Interaktion zwischen GFP und Aequorin ist nur sehr wenig bekannt. Vermutlich ist ein hydrophober *patch* die Bindungstelle am GFP, an dem die Aminosäurereste 206, 221 und 223 beteiligt sind [Yang et al., 1996].

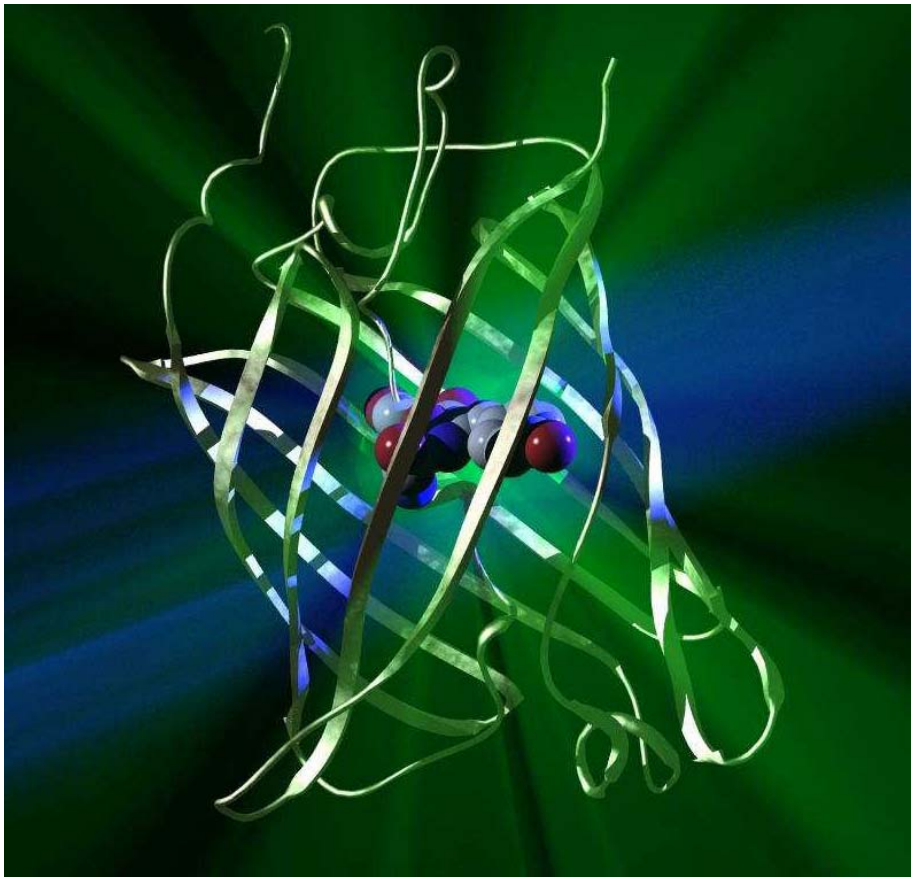
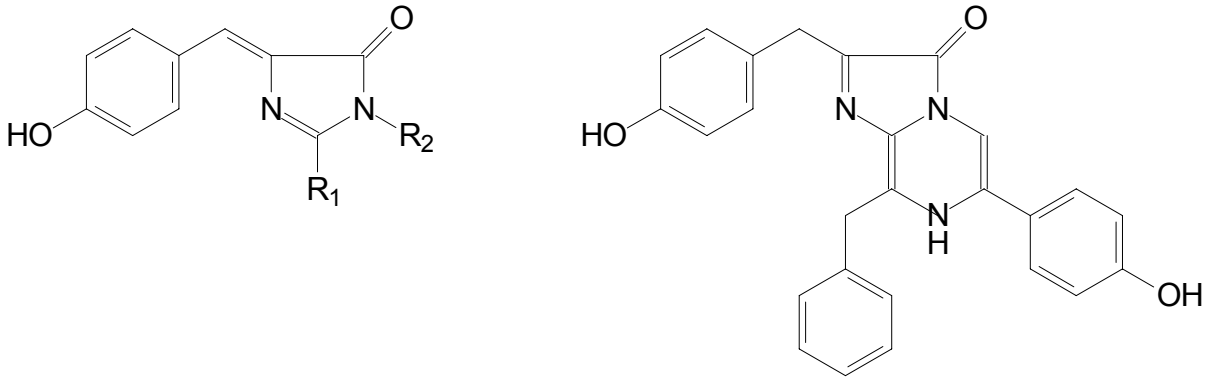


Abbildung 12: Dreidimensionale Struktur von GFP (A. Tepper, 2001, Universität Leiden, Niederlande)

Im Jahre 1979 gelang Shimomura die Isolierung des Chromophors durch Verdau von Aequorea GFP mit Papain [Shimomura, 1979]. Sein Strukturvorschlag basierte auf Ähnlichkeiten in den Fluoreszenzeigenschaften des Chromophors im Vergleich zu Coelenterazin, dessen Struktur bereits zwanzig Jahre zuvor aufgeklärt worden war (Abbildung 13). Später konnte gezeigt werden, dass bei Verdau mit Papain ein Hexapeptid (Phe64-Ser-Tyr-Gly-Val-Gln69) isoliert werden kann [Cody et al., 1993].



(1) (2)

Abbildung 13: (1) Struktur des Chromophors von GFP
(2) Struktur von Coelenterazin [Shimomura, 1979]

Der Reaktionsmechanismus für die Bildung des Chromophors ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Durch aktive Expression von GFP in zellfreien Systemen konnte gezeigt werden, dass das Protein für die Bildung des Fluoreszenzchromophors keinen Kofaktor benötigt [Kolb et al., 1996] (Kap. 1.3.4). Als wahrscheinlich gilt, dass durch schnelle post-translationale Cyclisierung aus dem Carboxylkohlenstoffatom von Ser65 zunächst das Intermediat Imidazolin-5-on gebildet wird (Abbildung 14). Die Fluoreszenzaktivierung erfolgt letztendlich durch mehrstündige Oxidation mit Luftsauerstoff, was zur Dehydrierung der Methylenbrücke des Tyr66 und damit zur Bildung des eigentlichen Chromophors 4-(*p*- Hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on führt [Heim et al., 1994].

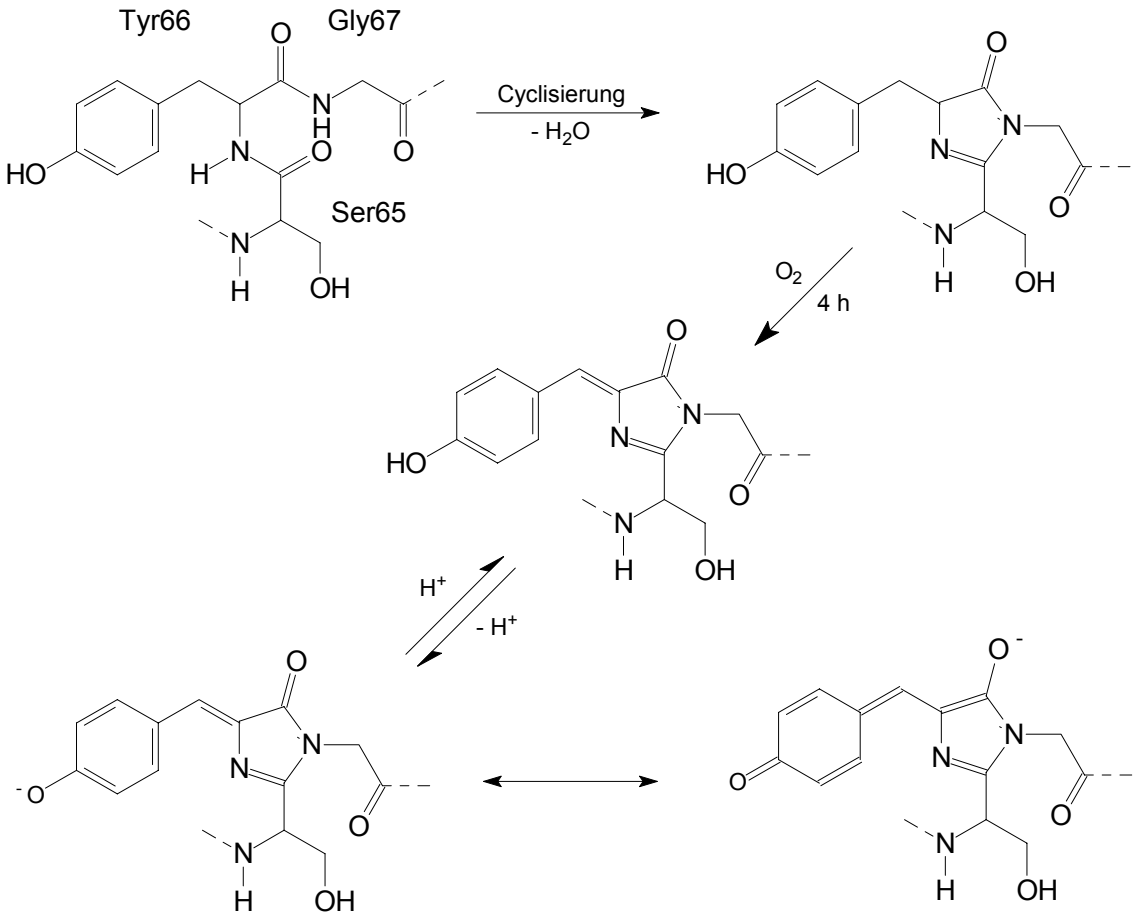


Abbildung 14: Biosynthetisches Reaktionsschema für die Chromophorbildung von GFP [Heim et al., 1994]

Für die Cyclisierung sind vor allem zwei Faktoren verantwortlich. Ein Kriterium ist die unmittelbare Nähe der Atome des Peptidrückgrats der beiden Aminosäuren Ser65 und Gly67 zueinander. Des Weiteren kann Arg96, welches sich ebenfalls sehr nahe am Tripeptid befindet, als Base fungieren, die dem Carbonylsauerstoff des Ser65 durch Wasserstoffbrückenbindung Elektronen entzieht und somit zur Aktivierung des Carbonylkohlenstoffs für einen nukleophilen Angriff durch den Aminostickstoff des Gly67 beiträgt (Abbildung 15).

Lange Zeit glaubte man, dass diese Cyclisierungreaktion einzigartig sei. Mittlerweile hat man eine weitere Enzymfamilie entdeckt, bei der es ebenfalls zu post-translationalen Ringbildung kommt. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem auch die Histidin-Ammonium-Lyase (HAL) und die mit ihr verwandte Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) [Donnelly et al., 2001; Schwede et al., 1999].

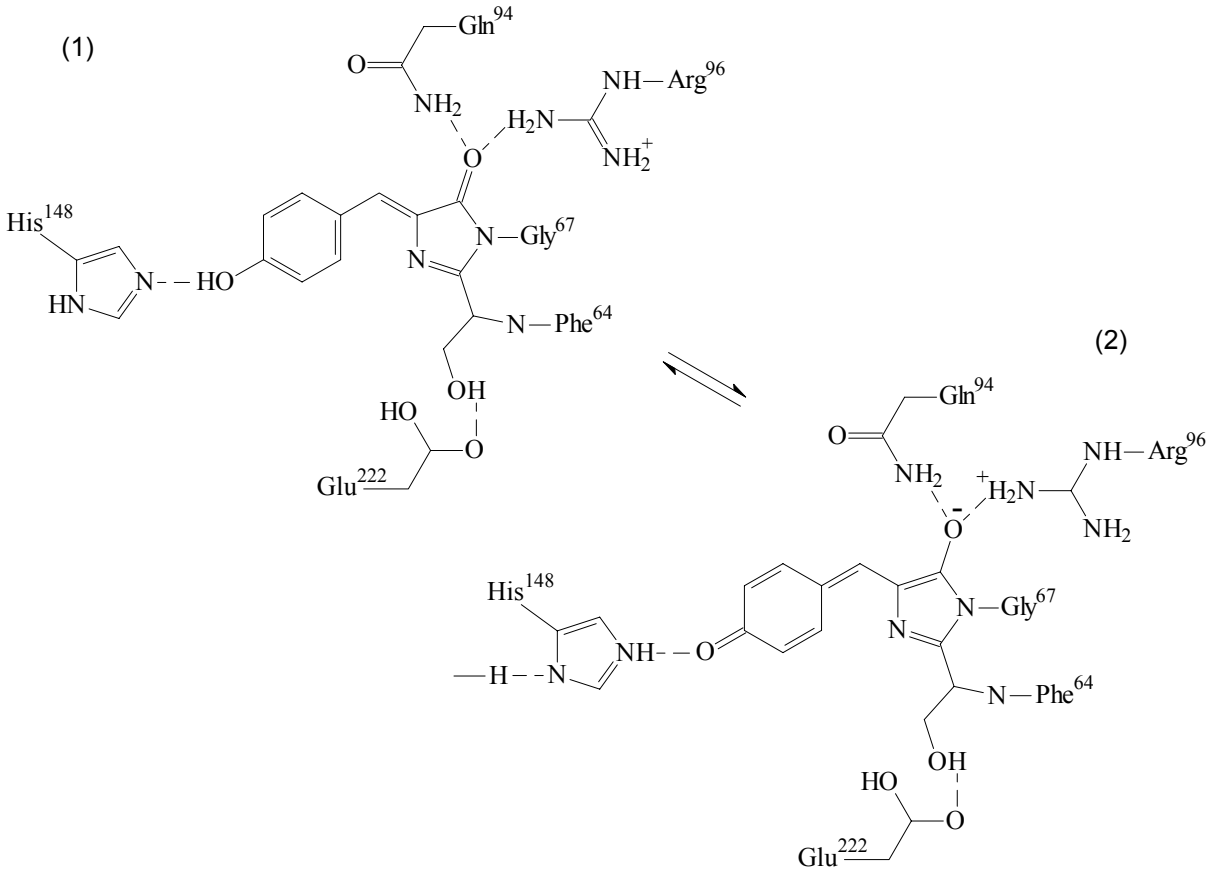


Abbildung 15: Tautomerie des GFP Chromophors.

(1) Die protonierte phenolische Form des Chromophors mit einem Ketosauerstoff am Imidazolring. Diese Form ist vermutlich für die Absorptionsbande bei 395 nm verantwortlich. (2) Die Chinon-Enol-Form des Chromophors mit einer negativen Ladung am Imidazolonsauerstoff. Diese Form ist vermutlich für die Absorptionsbande bei 475 nm verantwortlich [Chalfie et al., 1998].

Letztendlich als verantwortlich für die beiden Anregungsmaxima bei 395 bzw. 475 nm gelten die protonierte phenolische bzw. die deprotonierte Chinon-Enol-Form (Abbildungen 14 und 15). Der angeregte Zustand des Phenols ist wesentlich acider als der Grundzustand, so dass die Emission wohl nur von der deprotonierten Form herrührt.

1.3.4 Anwendungen des GFP Wildtyps und seiner Mutanten mit verbesserten Eigenschaften

GFP besitzt einige Vorteile gegenüber anderen Proteinen, was seine Attraktivität in den letzten Jahren weit über seine ursprüngliche Anwendung als Reporter für die Kontrolle von Genexpressionen [Kremer et al., 1995] gesteigert hat. Zum einen konnte es in vielen verschiedenen bakteriellen Spezies wie z. B. *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida* [Chalfie et al., 1994; Inouye et al., 1994], aber auch in Hefezellen wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* aktiv exprimiert werden [Moreno et al., 1991]. Zum anderen zeigt GFP eine sehr hohe Stabilität und ist weder für die Expression noch für die Bildung seines Fluoreszenzchromophors auf einen Kofaktor angewiesen [Chalfie et al., 1994; Inouye et al., 1994] (Kap. 1.3.2 und 1.3.3).
Diese Besonderheiten machen das Protein zu einem hervorragenden Indikator für die Lokalisation von Proteinen in Zellen. Außerdem beeinträchtigt die Nutzung von GFP als Fusionspartner nicht die normalen Funktionen des zu untersuchenden Proteins [Bastiaens et al., 2000; Lippincott-Schwartz et al., 2001]. Da sowohl Permeabilisierung von Zellmembranen für einen Substrateintritt als auch eine Fixierung für die Detektion von GFP nicht notwendig sind, können GFP-markierte Proteine, Organellen und Zellen sogar in lebendem Gewebe untersucht werden. Somit konnte die Dynamik vieler zellulärer Prozesse untersucht werden [Chalfie et al., 1998]. GFP-Fusionsmarker wurden in vielen Organismen von Viren bis hin zu Säugerzellen erfolgreich eingesetzt [Kanda et al., 1998; Ward et al., 2001]. Aufgrund der starken Affinität seiner zehn Histidinreste zu Schwermetallen, was je nach Metallionenkonzentration zu einer Fluoreszenzabschwächung führt, konnte GFP als Biosensor etabliert werden [Li et al., 2001; Richmond et al., 2000]. Zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* und *in vitro* wurde die biologische Funktion von GFP ausgenutzt (Kap. 1.3.1). Dazu wurde GFP mit einem der beiden zu untersuchenden Proteinen und die Luciferase aus *Renilla* mit dem anderen fusioniert [Wang et al., 2001b]. Nach Zugabe des Luciferase-Substrats Coelenterazin kam es bei einer gewissen Annäherung der beiden Fusionsproteine zu einer strahlenlosen Energieübertragung von der Luciferase auf GFP und damit zur Biolumineszenz.

Auch die Industrie ist mittlerweile auf dieses in höchstem Maße interessante Protein aufmerksam geworden. So wurde GFP als wichtiger Reporter im High-Throughput Drug Screening in der Evaluierung viraler Vektoren für die humane Gentherapie sowie in der biologischen Schädlingsbekämpfung eingesetzt [Zimmer, 2002].

Im Laufe der Jahre konnten einige GFP-Mutanten mit verbesserten oder veränderten Eigenschaften hergestellt werden. Mutationen in der Nähe des Chromophors (z.B. S65A, G, T oder L sowie F64L und S72A) unterstützen eine schnellere Chromophorbildung, während weiter entfernte (z. B. V163A) für eine Verbesserung der Temperaturstabilität wichtig sind [Cubitt et al., 1999]. Oberflächenmutationen (z.B. F99S, M153T) reduzieren die Hydrophobizität des Enzyms [Fukuda et al., 2000]. Jedoch sind diese Mutationen meistens nicht additiv, was das Design einer Mutante von GFP, die Verbesserungen aller Eigenschaften mit sich bringt, deutlich erschwert. Die am besten untersuchte Mutante ist die sogenannte *Cycle3*-Mutante [Crameri et al., 1996]. Sie besitzt die Mutationen F99S, M153T und V163A, was in einer deutlichen Verbesserung der Expressionsrate resultiert. Daneben sorgt die Mutation S65T für eine Verstärkung der absoluten Fluoreszenzintensität gegenüber dem Wildtyp [Heim et al., 1995]. Diese Verstärkung wird vermutlich durch verbesserten Umsatz von Tyrosin zu Dehydrotyrosin hervorgerufen. Die Mutante V163R führt zu einer erhöhten Temperaturverträglichkeit bei der funktionellen Expression von GFP [Kahana et al., 1996]. Außerdem waren mit Hilfe der beiden Punktmutationen V163A und F64L höhere Ausbeuten an löslichem Protein und eine Verbesserung des Fluoreszenzlevels erreichbar [Palm et al., 1997].

Eine Studie befasste sich außerdem mit der Herstellung von FACS-optimierten GFP-Mutanten, welche gegenüber dem Wildtyp eine hundertfach verstärkte Fluoreszenzintensität durch Anregung des Absorptionspeaks bei 475 nm mit Hilfe eines 488nm-Argonionenlasers aufweisen [Cormack et al., 1996]. Einige Mutationen mit verbesserten Eigenschaften sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Mutanten von GFP mit verbesserten Eigenschaften

Mutation	Verbesserte Eigenschaften und Referenzen
F64L	Verbesserung der bakteriellen Expression von S65T [Cormack et al., 1996]
V68L	Verbesserung der bakteriellen Expression von S65A [Cormack et al., 1996]
S72A	Verbesserung der bakteriellen Expression von S65G und S65A sowie des Extinktionskoeffizienten von T203Y [Cormack et al., 1996]
F99S	Verbesserung der bakteriellen Expression des Wildtyps [Crameri et al., 1996]
Y145F	Verbesserung des Extinktionskoeffizienten und der Fluoreszenz von Y66H [Hein et al., 1996]
N146I	Verbesserung des Extinktionskoeffizienten und der Fluoreszenz von Y66W [Hein et al., 1996]
M153T	Verbesserung der bakteriellen Expression des Wildtyps [Crameri et al., 1996]
V163A	Verbesserung des Extinktionskoeffizienten und der Fluoreszenz von Y66W [Hein et al., 1996]
I167T	Verbesserung der Fluoreszenz von S65T zusammen mit V163A und S175G [Siemering et al., 1996]
S175G	Verbesserung der Thermostabilität des Wildtyps [Siemering et al., 1996]
N212K	Verbesserung des Extinktionskoeffizienten und der Fluoreszenz von Y66W [Hein et al., 1996]

Da synthetische Indikatoren nicht sehr effektiv für intrazelluläre pH-Messungen sind, haben GFP-basierte pH-sensitive Mutanten in den letzten Jahren sehr stark an Bedeutung für die Bestimmung des pH-Werts in den Mitochondrien, im Golgi-Apparat und im Cytoplasma gewonnen [Takahashi et al., 2001].

Die wohl wichtigsten und interessantesten pH-sensitiven GFP-Mutanten, die pHluorine [Miesenbock et al., 1998], die auch Kern des in dieser Dissertation entwickelten intrazellulären Nachweissystems für Hydrolaseaktivität sind, werden im nächsten Kapitel genauer betrachtet.

1.3.5 pHluorine – pH-sensitive Mutanten von GFP

Wie bereits in Kap. 1.2.3 erwähnt, besitzt der GFP-Wildtyp ein bimodales Anregungsspektrum mit zwei Maxima bei 395 nm und 475 nm, die dem protonierten und deprotonierten Zustand des Tyr66 entspricht, welches ein Teil des Chromophors bildet [Brejc et al., 1997]. Obwohl auch andere Aminosäurereste Protonen mit ihrer Umgebung austauschen, ist das GFP weitestgehend auf diese beiden chromophoren Zustände beschränkt [Chattoraj et al., 1996] und zeigt daher auch nur äußerst geringe Veränderungen im Anregungsspektrum im Bereich von pH 8,0 bis 5,5 (Abbildung 16a).

Um die pH-Abhängigkeit in diesem Bereich zu erhöhen wurden mehrere Schlüsselpositionen (Gln94, Arg96, His148, Ile167, Thr203, Ser202, Ser205 und Glu222) bei der Herstellung von Mutanten berücksichtigt, die nicht nur in engem Kontakt zum Chromophor stehen, sondern auch dessen protonierten bzw. deprotonierten Zustand und damit das Anregungsspektrum von GFP beeinflussen [Miesenbock et al., 1998; Ormo et al., 1996]. Besonders durch die Mutation S202H zeigte sich gegenüber dem GFP-Wildtyp eine Reduktion des Anregungspeaks bei 395 nm um 16 %, verbunden mit einem gleichzeitigen Anstieg des Maximums bei 475 nm um 26 %. Diese Mutante wurde weiteren Zufallsmutageneserunden unterworfen. Dies führte letztendlich zu zwei Klassen von pH-sensitven GFP-Mutanten (pHluorine) [Miesenbock et al., 1998].

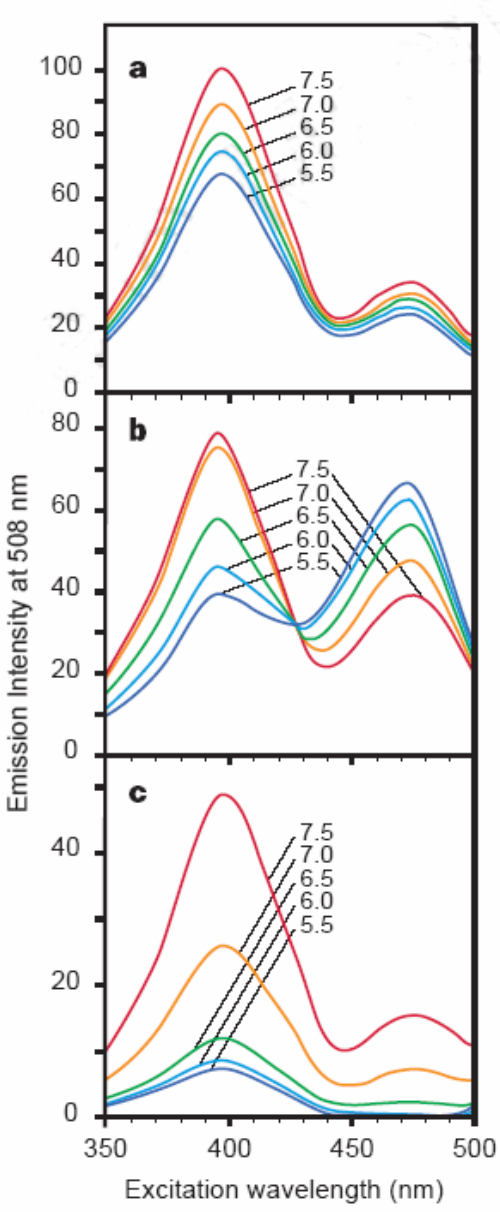


Abbildung 16: Fluoreszenzspektren
a GFP-Wildtyp
b Ratiomerisches pHluorin
c Ecliptisches pHluorin

Das **ratiometrische pHluorin** enthält die Mutationen S202H plus E132D, S147E, N149L, N164I, K166Q, I167V, R168H und L220F. Es zeigt, im Gegensatz zum GFP-

Wildtyp, im Anregungsspektrum bei 395 nm und 475 nm im Bereich von pH 8,0 zu pH 5,5 zwei pH-abhängige Maxima (Abbildung 16b). Das Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{475/395}$ bei den beiden Anregungswellenlängen verändert sich also reversibel abhängig vom pH-Wert. Die Messung des Fluoreszenzemissionsverhältnis hat den Vorteil, dass man von der Fluoreszenzintensität unabhängig ist und daher auch bei geringerer pHluorin Aktivität immer ein eindeutiges Verhältnis der Emissionsbanden zueinander bekommt [Miesenbock et al., 1998].

Beim **ecliptischen pHluorin** dagegen, welches die Mutationen S147D, N149Q, T161I, S202F, Q204T, nicht aber die Mutation S202H enthält, ändert sich die Fluoreszenzintensität proportional zum pH-Wert, nicht jedoch das Fluoreszenzemissionsverhältnis der beiden Peaks zueinander. Unterhalb von pH 6,0 verschwindet die Bande bei 475 nm nahezu vollständig (Abbildung 16c).

In neueren Studien wurde mittlerweile sogar ein **superecliptisches pHluorin** mit den beiden zusätzlichen Punktmutationen F64L und S65T vorgestellt, das eine um den Faktor neun erhöhte Fluoreszenzaktivität bei unverändert hoher pH-Sensitivität zeigt [Sankaranarayanan et al., 2000].

Um verschiedene Fluoreszenzemissionsverhältnisse in pH-Werte zu konvertieren, wurde ratiometrisches pHluorin an der Oberfläche von HeLa-Zellen mit Glycosylphospatidylinositol (GPI) verankert [Miesenbock et al., 1998]. Die Zellen wurden in Puffer mit definierten pH-Werten aufgenommen und daraus eine Kalibrierkurve erstellt (Abbildung 17a).

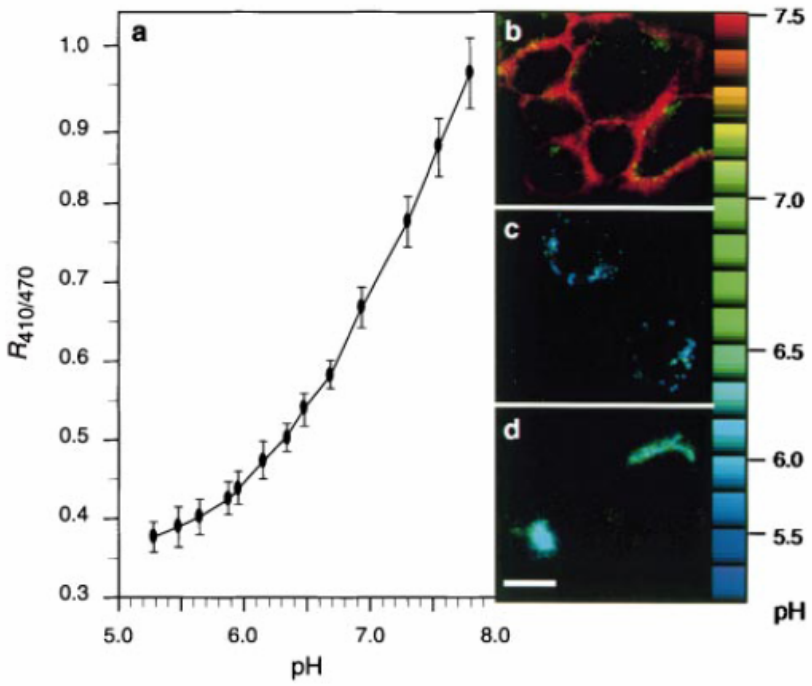


Abbildung 17: pH-Messungen mit ratiometrischem pHluorin an der Oberfläche und verschiedenen subzellulären Kompartimenten von HeLa-Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie.

a Kalibrierkurve des Emissionsverhältnisses $R_{410/470}$ von pHluorin mit verankert mit GPI an der Zelloberfläche bei verschiedenen pH-Werten

b pHluorin verankert mit GPI an der Zelloberfläche (pH 7,4)

c pHluorin an Cellubrevin, einem endosomalen Membranprotein, angelagert

d pHluorin mit dem Membranprotein TGN38 des *trans*-Golgi Netzwerks verbunden

Das eigentliche Interesse für die Entwicklung von pHluorin lag jedoch in der Untersuchung des pH-Werts während der synaptischen Vesikelexocytose [Miesenbock et al., 1998]. Dazu wurde ratiometrisches pHluorin mit dem C-Terminus des vesicle-associated membrane protein (VAMP) verbunden. Dabei konnte gezeigt werden, dass der relativ acide pH in den Vesikeln durch den Exocytoseprozess stark ansteigt.

Durch die Fusion von pHluorin mit Membranproteinen verschiedener anderer Zellkompartimente gelang die Messung der intrazellulären pH-Werte des Cytoplasmas [Karagiannis et al., 2001], der Peroxisomen [Jankowski et al., 2001], der Endosomen und des *trans*-Golginetzwerks [Machen et al., 2003] (Abbildungen 17b-d).

1.4 Regulation des cytoplasmischen pH-Werts in Bakterienzellen

1.4.1 Der intrazelluläre pH-Wert (pH_i)

Bei der Entwicklung eines Nachweissystems für Hydrolaseaktivität, welches auf die Erkennung intrazellullärer pH-Änderungen abzielt, ist eine nähere Betrachtung des pH-Regulationssystems (pH-Homöostase) von Bakterienzellen unerlässlich. In den letzten 20 Jahren wurden viele Studien unternommen, um einen besseren Einblick in die Vorgänge der pH-Homöstase zu bekommen. Schon sehr bald wurde klar, dass kein „magischer" intrazellulärer pH-Wert (pH_i) existiert, den alle Organismen zu erreichen suchen [Booth, 1985]. Man unterscheidet hierbei acidophile (pH_i von 6,5 bis 7,0), neutrophile (pH_i von 7,5 bis 8,0) und alkalophile (pH_i von 8,4 bis 9,0) Organismen. Zwei grundsätzliche Faktoren können das pH_i-Gleichgewicht empfindlich stören: zum einen der passive Protonenfluss durch die Zellmembran und zum anderen die Produktion von Säuren und Basen im Cytoplasma [Raven et al., 1976]. Bei *E. coli*, welches zu den neutrophilen Organismen gehört, kann beispielsweise der pH_i bereits durch Waschen in Phosphatpuffer bei einem bestimmten pH-Wert (pH_{ex}=6.0-8.0) beeinflusst werden [Kroll et al., 1983; Nakamura et al., 1982]. Nach kurzer Zeit jedoch setzen die Mechanismen der Homöostase ein und versuchen, das für einen bestimmten Organismus charakteristische pH_i-Gleichgewicht zu erreichen (Abbildung 18). Die für den pH-Ausgleich verantwortlichen Mechanismen werden im nächsten Kapitel vorgestellt, wobei man hier zwischen passiver und aktiver pH-Homöostase unterscheidet.

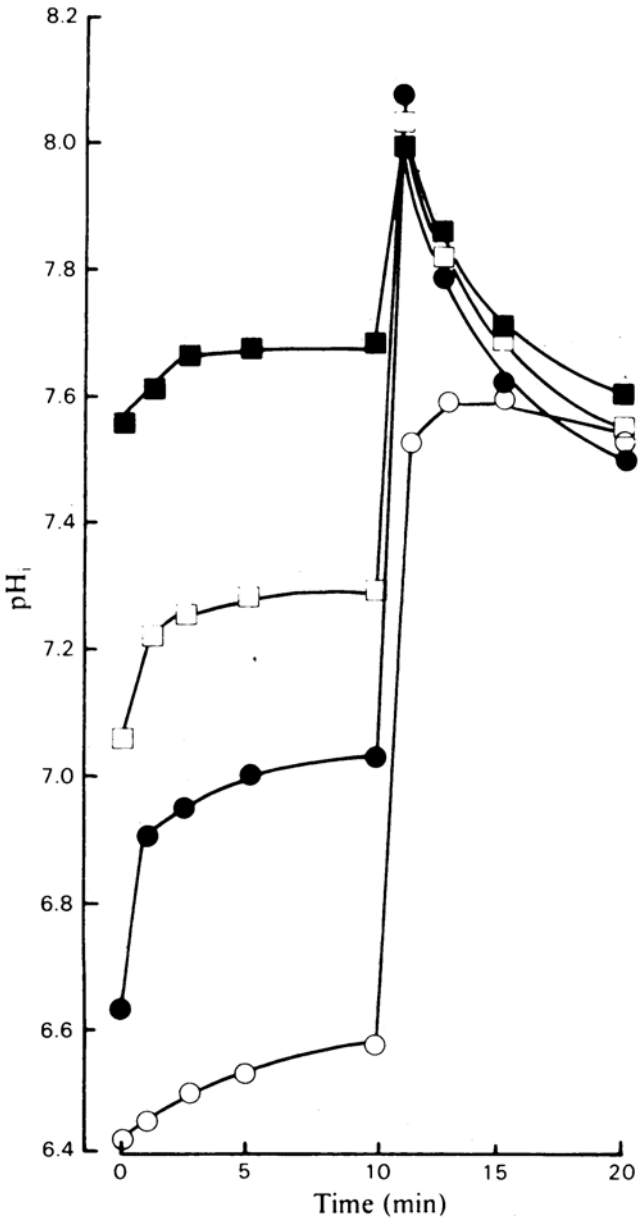


Abbildung 18: Zeitliche Veränderung des pH_i gegenüber extrazellulären pH-Werten aufgrund von pH-Regulationsmechanismen in *E. coli*

1.4.2 Passive pH-Homöostase

Zur passiven Homöostase zählt man unter anderem die Zellmembran selbst, die - abgesehen von membranintegrierten Protonenkanälen mit kontrolliertem Protonenfluss - eine relativ große Impermeabilität gegenüber Protonen aufweist [Mitchell, 1961]. Allerdings nimmt diese Impermeabilität bei niedrigeren pH-Werten aufgrund von Konformationsänderungen in der Lipid-Doppelschicht der Membran immer stärker ab [Haest et al., 1972]. Auch der Einsatz „membranaufweitender“

Agentien (z. B. DMSO) sorgt für eine erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembran für Ionen und Moleküle [Brayton, 1986].

Eine weitere Komponente der passiven Homöostase ist die Pufferkapzität des Cytoplasmas gegenüber pH-Änderung. Diese Pufferkapazität kommt zum einen durch Titration von Phosphat- und Carboxylatgruppen verschiedener Metabolite zustande [Booth, 1985]. Zum anderen sind jedoch auch Glutamat- und Aspartat-Seitenketten von Zellproteinen in der Lage, Protonen abzufangen [Booth, 1985]. Ein bedeutender Beitrag dieser Reste setzt wegen ihres relativ niedrigen pK_a-Werts von 3,9 bis 4,1 erst unterhalb eines pH_i von 5,5 ein. Eine Verbesserung der Pufferkapazität kann durch Konzentrationserhöhung von Anionen erreicht werden. Durch Anreicherung von Zitrat in Mutanten mit fehlender Isozitrat-Dehydrogenaseaktivität konnte die Pufferkapazität im neutralen Bereich aufgrund des höheren pK_a-Werts (4,75) im Vergleich zu Glutamat erhöht werden [Foster et al., 1991].

Die Gesamtpufferaktivität im Cytoplasma im neutralen bis schwach sauren pH-Bereich wird auf 50 bis 100 nmol H^+/pH-Einheit pro mg Zellprotein geschätzt [Booth, 1985].

1.4.3 Aktive pH-Homöostase

Aktive pH-Homöostase ist die Fähigkeit, Veränderungen des pH_i wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Eine besonders wichtige Rolle spielen hierbei die so genannten Antiportersysteme. Diese bestehen im Allgemeinen aus Rezeptorproteinen, Regulatorproteinen und Membrankanälen und sind dadurch in der Lage, im Cytoplasma und anderen Zellkompartimenten toxische Konzentrationen an Ionen und anderen Stoffen zu erkennen und mit der Umgebung auszutauschen.

Mehrere Studien befassten sich mit der Überlebensfähigkeit von pathogenen *E. coli* Stämmen in der aciden Umgebung des Magens. Dabei wurden drei sogenannte *acid resistance* (AR)-Mechanismen entdeckt, welche die Zellen gegenüber einem extrazellulären pH-Wert von 2,0 bis 2,5 schützen können [Castanie-Cornet et al., 1999] (Abbildung 19).

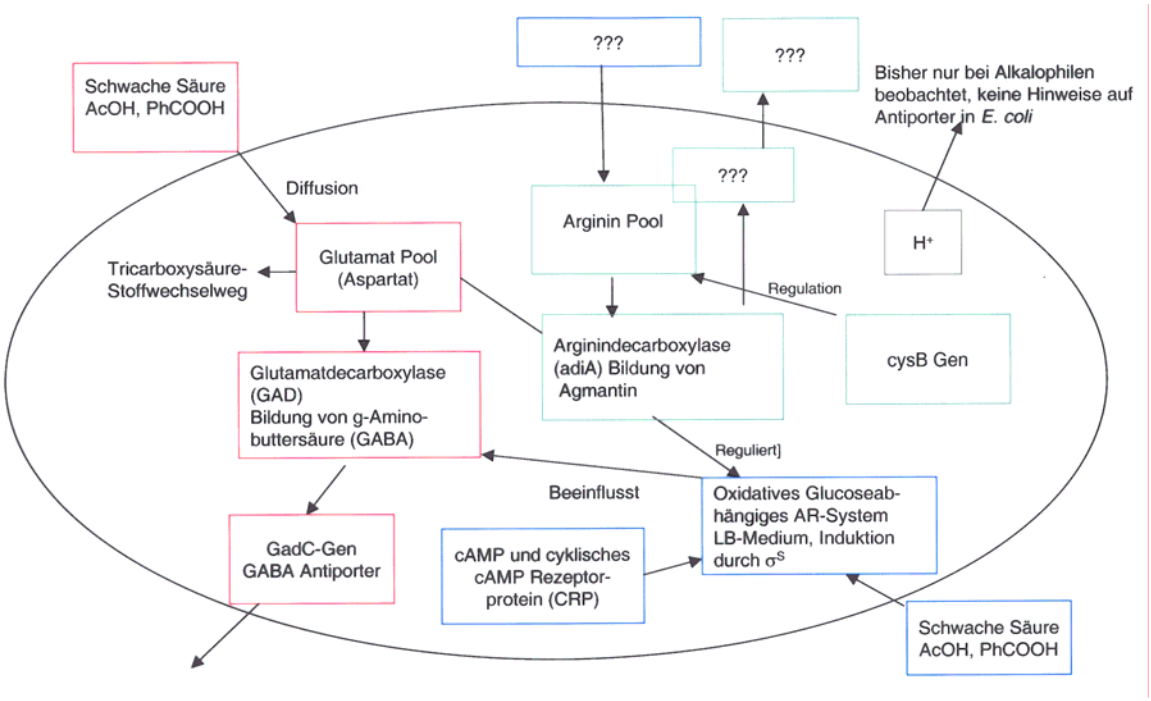


Abbildung 19: pH-Homöostase in pathogenen *E. coli*

Der erste Mechanismus ist ein glucoseabhängiges System, welches in LB-Medium induziert und vom alternativen Faktor σ^S kontrolliert wird [Cheville et al., 1996]. Der durch das Gen *rpoS* kodierte Faktor σ^S ist für die Regulation von ca. 30 Proteinen verantwortlich, die beim Eintritt in die stationäre Phase produziert werden. Wie dieses System die Zelle vor niedrigen pH-Werten in der Umgebung schützt, ist bis jetzt nicht genau bekannt. Man fand jedoch heraus, dass cyclisches AMP (cAMP) sowie das cAMP-Rezeptorprotein (CRP) für die pH-Regulation durch das oxidative glucoseabhängige System benötigt wird. Die beiden anderen AR-Mechanismen greifen nur ein, wenn im Medium mindestens 0,4 % Glucose vorhanden ist [Castanie-Cornet et al., 1999]. Eines der beiden Systeme benötigt Glutaminsäure sowie eine induzierbare Glutamatdecarboxylase (GAD) und wird ebenfalls durch RpoS und einem weiteren unbekannten Regulator reguliert. Das andere System besteht aus einer induzierbaren Arginindecarboxylase, dem Regulatorprotein CysB und benötigt Arginin als Substrat [Hersh et al., 1996; Lin et al., 1995; Lin et al., 1996]. Es wird vermutet, dass beide Systeme bei der Decarboxylierungreaktion von Glutamat bzw. Arginin Protonen verbrauchen und somit eine erhöhte Ansäuerung des Cytoplasmas verhindern. Die durch die Decarboxylierung entstandenen

Produkte – die γ-Aminobuttersäure (GABA) bzw. das Agmatin – werden dann im Austausch mit neuen Substraten mit Hilfe von spezifischen Antiportern (GadC für Glutamat bzw. ein bis jetzt unbekannter Antiporter für Arginin) aus der Zelle transportiert.

Zum Ausgleich von pH-Änderungen im Cytoplasma sind, jedoch ausschließlich bei alkalophilen Bakterien, Kationentransportsysteme wie der Na^+/H^+-Antiporter [Padan et al., 1994] sowie der K^+/H^+-Antiporter [Ferguson et al., 1995] entdeckt worden. Bei pH-Senkungen im Cytoplasma werden durch die Antiportersysteme verstärkt Protonen an die Umgebung ausgeschleust und zum intrazellulären Ladungsausgleich Natrium- und Kaliumionen aufgenommen. Genau das Gegenteil passiert, wenn der pH_i zu stark ins alkalische Milieu abdriftet. Dann werden von den Antiportern Protonen aus dem extrazellulären Bereich aufgenommen und gegen Natrium- und Kaliumionen ausgetauscht.

1.5 Die Durchflusszytometrie

1.5.1 Einführung und Definition der Durchflusszytometrie

Die Zytometrie ist ein Prozess, bei dem die physikalischen und chemischen Eigenschaften aller biologischen und nicht-biologischen Partikel gemessen werden können. In der Durchflusszytometrie – auch als FACS (*fluorescence-activated cell-sorting*) bezeichnet – können Signale von einzelnen Zellen oder anderen Partikeln nach Eintritt in einen Flüssigkeitsstrom detektiert werden. Traditionelle Analysetechniken von Zellpopulationen können für jeden zu untersuchenden Parameter nur einen Mittelwert angeben. Das heißt, jede Zelle wird als ein durchschnittlicher Mikroorganismus behandelt. In der Realität befinden sich jedoch niemals alle Zellen im gleichen metabolischen oder physiologischen Zustand. Die Durchflusszytometrie dagegen erlaubt eine gleichzeitige, quantitative Bestimmung mehrerer physikalischer Parameter (z. B. Fluoreszenzsignalen) von jeder einzelnen Zelle in einer Zellpopulation [Rieseberg et al., 2001]. Diese Daten können für jede einzelne Zelle gespeichert und bei Bedarf später wieder abgerufen werden.

Dazu wurden viele Nachweismethoden entwickelt, mit denen man beispielsweise die Zellgröße, Membranpotentiale, den intrazellulären pH-Wert sowie die Konzentration verschiedener zellulärer Komponenten wie DNA, Proteinen, Oberflächenrezeptoren oder Calcium bestimmen kann.

1.5.2 Aufbau und Wirkungsweise eines Durchflusszytometers

Ein Durchflusszytometer besteht im Allgemeinen aus fünf Komponenten: einer Lichtquelle (Laser), einer Durchflusskammer, optischen Filtereinheiten für die Detektion spezifischer Wellenlängen über einen breiten Spektralbereich, Photodioden sowie Photomultiplier für die Wahrnehmung und Verstärkung der Lichtsignale und einer Einheit zur Datenauswertung (Abbildung 20).
Die zu untersuchende Flüssigkultur wird in einen internen Flüssigkeitsstrom, den sogenannten *sheath fluid stream*, injiziert. Durch Gasdruck werden beide Flüssigkeitsströme in den Bereich ihrer Laminargeschwindigkeit beschleunigt, wobei die *sheath fluid* eine höhere Beschleunigung erfährt als der Zellprobenstrom. Dadurch werden die Zellen im Flüssigkeitsstrom nach und nach voneinander isoliert und passieren somit hintereinander einen Laserstrahl, der die Zellen orthogonal zu ihrer Flussrichtung bestrahlt. Das Licht wird nach Auftreffen auf die Zelle sowohl in Vorwärts- als auch in Seitwärtsrichtung gestreut. Das vorwärts gestreute (*forward-scattered*) Licht gibt Informationen über die Zellgröße wieder. Das seitwärts gestreute (*side-scattered*) Licht ist von mehreren Faktoren wie Granularität, Morphologie wie auch der Größe der untersuchten Zelle abhängig.

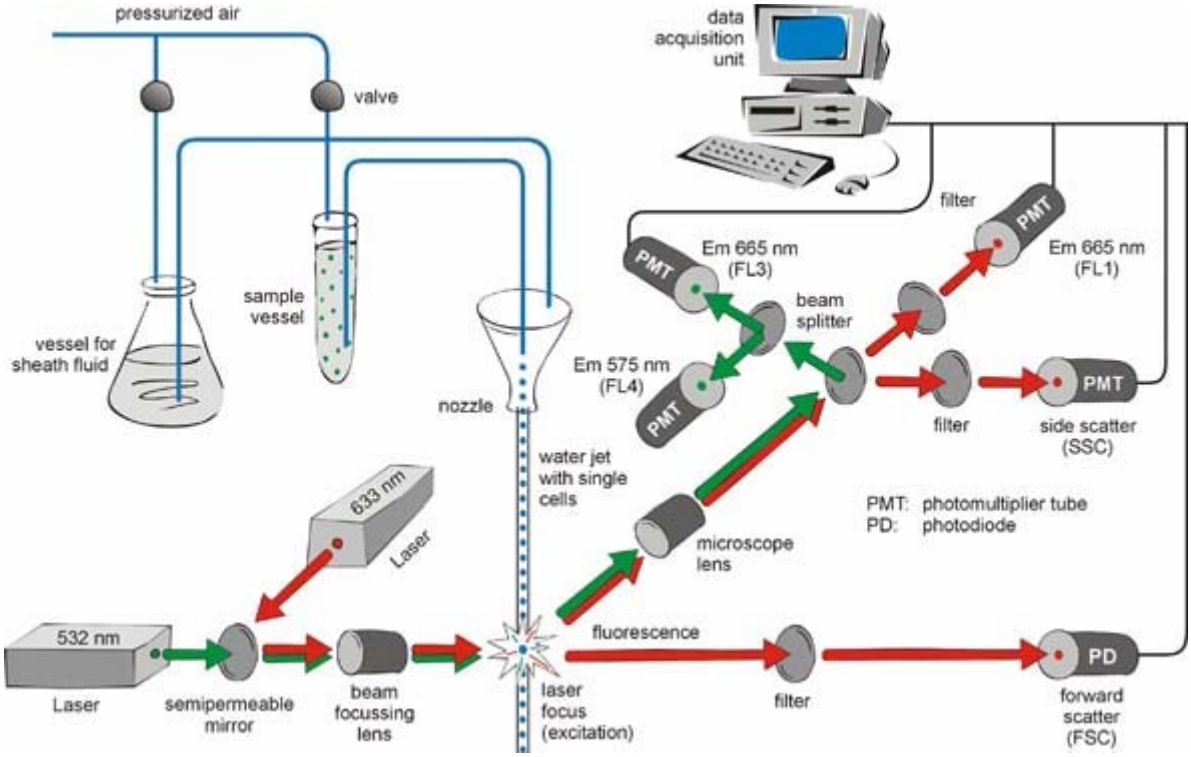


Abbildung 20: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Intrazelluläre Komponenten und Verbindungen, die bei Anregung durch einen Laser mit bestimmter Wellenlänge Fluoreszenzeigenschaften aufweisen, können ebenfalls für eine Zelle als charakteristische Parameter untersucht werden. Das fluoreszierende Licht kann hierbei durch Photomultiplier detektiert und mit Hilfe der Zytometersoftware analysiert werden. Mit modernen Durchflusszytometern ist es sogar möglich, bis zu acht verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zu detektieren.

Des Weiteren können Durchflusszytometer mit Sortiereinheiten kombiniert werden, die neben einer Separation von Subpopulationen sogar Sortierungen auf Einzelzellebene ermöglichen. Die Sortiereinheiten brechen den Flüssigkeitsstrom in winzige Tröpfchen, wobei jedes Tröpfchen im Optimalfall nur jeweils eine Zelle enthält. Vor der Tröpfchenbildung werden die Zellen je nach detektierten Eigenschaften mit elektrischer Ladung unterschiedlicher Intensität behaftet. Die eigentliche Sortierung erfolgt danach in einem zwischen zwei Metallplatten (*deflection plates*) künstlich erzeugten elektrischen Feld, welches die einzelnen Zellen im Tröpfchen je nach Ladungsstärke ablenkt (Abbildung 21). Als

Sammelgefäße für die Zellen können neben einfachen Reagenzgläsern auch Mikrotiter- oder Agarplatten mit festem Nährmedium verwendet werden.

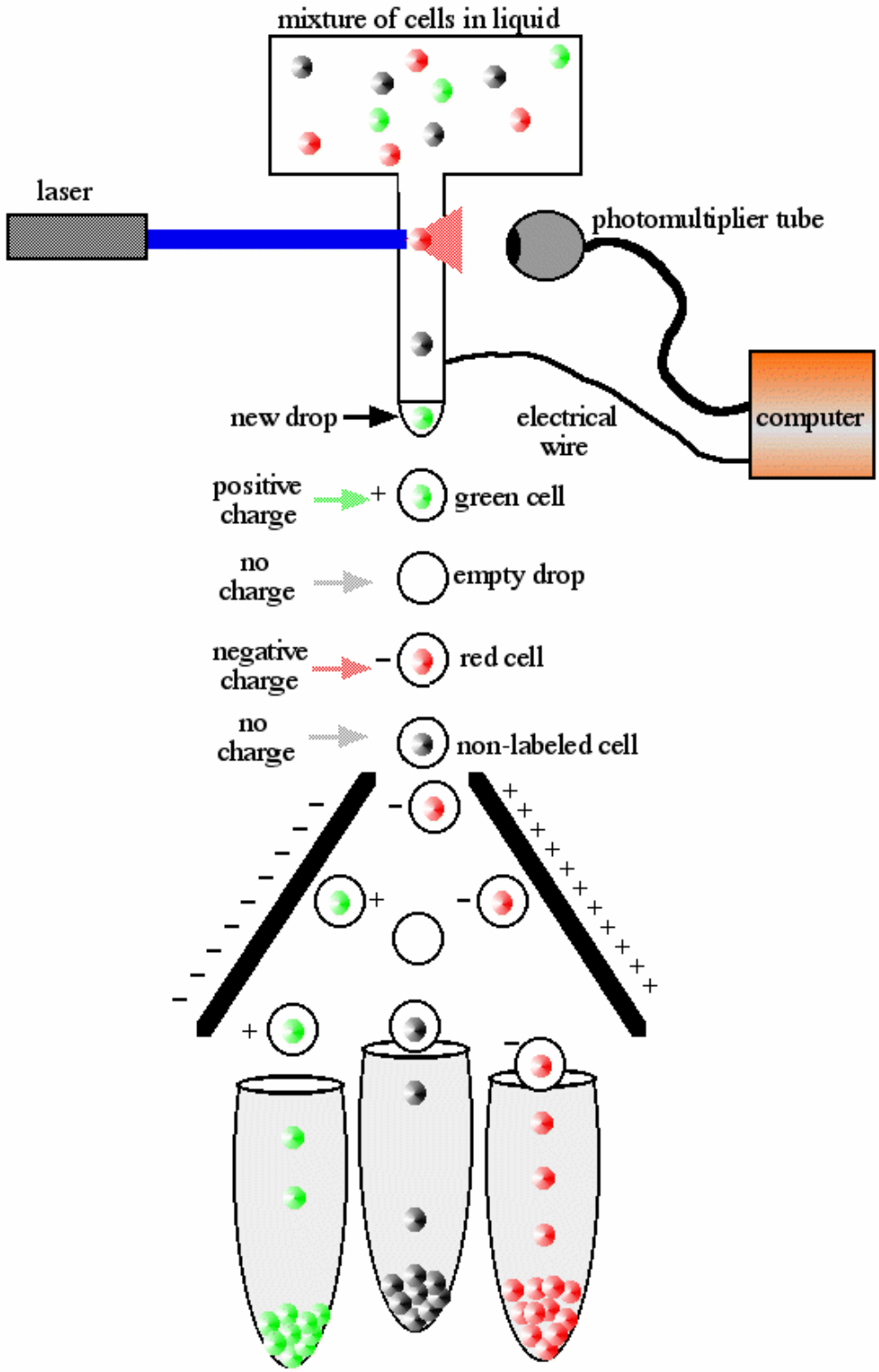


Abbildung 21: Wirkungsprinzip der Sortiereinheit eines Durchflusszytometers

1.5.3 Applikationen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde ursprünglich vor allem in der Onkologie für die Krebsdiagnose sowie zur Bestimmung von chromosomalen Defekten eingesetzt. In den letzten Jahren hat sie jedoch auch auf den Gebieten der Biotechnologie, Pharmakologie, Virologie, Toxikologie, Bakteriologie sowie der Umweltforschung eine herausragende Bedeutung erlangt.

Eine der wichtigsten Anwendungen ist hierbei die Konzentrationsbestimmung von lebenden Zellen in einer Kultur. Die gängigste Variante ist die Untersuchung der Membranintegrität [Kolber et al., 1988]. Bei intakter Membran können große, geladene Fluoreszenzfarbstoffe wie Propidiumiodid oder Ethidiumbromid, die üblicherweise mit DNA und RNA interkalieren, nicht in die Zelle eindringen; kleine, ungeladene Moleküle wie zum Beispiel das Fluoresceindiacetat dagegen schon. Durch zelleigene Esterase- und Lipaseaktivität wird der Ester gespalten. Das freigesetzte Fluorescein, welches die Zelle nicht wieder verlassen kann, verleiht den lebenden Zellen ihre charakteristische Fluoreszenzmarkierung. Sie können somit von den „toten“, propidiumiodid-fluoreszierenden Zellen unterschieden werden. Auch die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika konnte durch Lebend-Tot-Färbung am Durchflusszytometer bestimmt werden [Roth et al., 1997]. Ebenso wurden Assays zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration an Calciumionen sowie deren Wirkungsweise, die Zellen vor wasserstoffperoxid-induzierter Schädigung der Mitochondrien sowie vor Cytotoxizität zu schützen, entwickelt. Des Weiteren wurden Effekte von Schwermetallionen in kontaminiertem Abwasser mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht [Boswell et al., 1998].

Zur Onlineüberwachung von Bioprozessen wurden Durchflusszytometer sogar mit Fließinjektionsanalysesystemen gekoppelt. Damit lassen sich schnell und einfach Aussagen über Dichte, Vitalität und Größenverteilung der Zellen machen. Die Leistungsfähigkeit eines solchen Systems wurde durch Verfolgung der GFP-Produktion in *E. coli* demonstriert [Zhao et al., 1999]. Ein wichtiger Faktor zur Regulation verschiedener Bioprozesse ist der intrazelluläre pH-Wert, der als Indikator für den physiologischen Zustand und Stoffwechselaktivität von großer Bedeutung ist. Für die intrazelluläre pH-Wertbestimmung wurden vor allem fluorogene Esterasesubstrate, wie beispielsweise 2’,7’-Bis-carboxyethy-5,6-carboxyfluorescein (BCECF-AM) [Cherlet et al., 1999], aber auch einige andere pH-sensitive

Fluoreszenzmarker entwickelt [Boyer et al., 1994]. In dieser Dissertation ist die pH-sensitive GFP-Mutante pHluorin als intrazellulärer pH-Indikator am Durchflusszytometer eingesetzt worden.

Eine weitere wichtige Anwendung der Durchflusszytometrie ist die Unterscheidung von Mikroorganismen in gemischten Populationen mit Hilfe der Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung (FISH). Bei dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide eingesetzt, die zu hochspezifischen rRNA-Sequenzen komplementär sind [Hermann et al., 1997].

Die Durchflusszytometrie wurde außerdem bei einer ganzen Reihe von Bakterienstämmen zum Nachweis der Produktionseffizienz intrazellulärer Produkte wie z.B. Polyhydroxybutyrat (PHB) in *Methylobacterium rhodesianum* [Grosse-Uhlmann et al., 1999] und *Ralstonia eutropha* [Gorenflo et al., 1999] eingesetzt. Eine weitere Studie untersuchte die Möglichkeit einer Multifluoreszenzfarbstoffanalyse, bei der Green, Blue und Yellow Fluorescent Protein verwendet wurden. Dieses Verfahren ermöglicht die simultane Verfolgung verschiedener intrazellulärer Produkte in einer Zellpopulation als Funktion von Zeit und Prozessbedingungen [Zhu et al., 1999]. Auch GFP ist als Reporterprotein für Genexpression in der Durchflusszytometrie von großer Bedeutung. Des Weiteren kann es ebenfalls zur Selektion von Zelllinien und zur Qualitätskontrolle eingesetzt werden [Misteli et al., 1997].

Mittlerweile hat die Durchflusszytometrie auch die Brau- und Lebensmittelindustrie erreicht. Dort wurden unter anderem Methoden zur Qualitätskontrolle für Bier [Müller et al., 1999], Milch [Attfield et al., 1999] und Hühnchenfleisch [Wang et al., 1999] entwickelt.

2. Zielsetzung

In den letzten Jahren hat die Bedeutung von Hydrolasen als Biokatalysatoren für industrielle Anwendungen deutlich zugenommen. Die Vorteile gegenüber der klassisch-chemischen Synthese sind unter anderem in ihrer hohen Chemo-, Regio- und Enantioselektivität gegenüber einer Vielzahl von Substraten bei Raumtemperatur sowie neutralem pH-Bereich begründet (Kap. 1.1.1) [Petersen et al., 1999]. Moderne industrielle Prozesse benötigen zur optimalen Wirtschaftlichkeit verbesserte Enzyme mit möglichst hoher Aktivität, Temperaturstabilität sowie Regio- bzw. Enantioselektivität. Bei den Methoden der Gerichteten Evolution wird zunächst eine Mutantenbibliothek mit 10^4 – 10^7 Individuen erzeugt (Kap. 1.2). Um solch umfangreiche Klon-Banken schnell und effektiv auf verbesserte Enzymvarianten durchmustern zu können, ist ein Screening-Verfahren mit weitaus höherem Durchsatz erforderlich als dies mit einem standardisiertem Pick- und Pipettierrobotersystem (bestenfalls ca. 1000 Bestimmungen pro Tag) möglich wäre. Daher wurden bereits einige Screeningverfahren entwickelt, die einen höheren Durchsatz erlauben. So ermöglichte eine Methode unter zu Hilfenahme massenspektrometrischer Analysen von Deuterium-markierten Substraten in Verbindung mit einem Multiplex-Einspritzsystem das Screening von bis zu 10000 Klonen pro Tag [Reetz et al., 2000b]. Weitere Verbesserungen wurden bei Verwendung von Kapillarelektrophorese (ca. 30000 Bestimmungen pro Tag) erzielt [Reetz et al., 2000b]. Allerdings sind diese Screeningmethoden nur für bestimmte Problemstellungen geeignet und daher nicht universell anwendbar.

Eine deutliche Steigerung der Durchsatzgeschwindigkeit im Vergleich zu den bereits erwähnten Methoden kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie erreicht werden (Kap. 1.5). Kombiniert mit einem sensitiven intrazellulären Fluoreszenzassay für das Screening nach Hydrolaseaktivität ist ein moderner Durchflusszytometer mit Sortierfunktion in der Lage, aus einer Zellkultur **bis zu 50000 Zellen pro Sekunde** zu analysieren. Einzelzellen, die mögliche Klone mit gewünschten verbesserten Eigenschaften enthalten, können anschließend auf Festmedium oder in Mikrotiterplatten separiert werden. Ein entscheidender Nachteil ist jedoch der hohe Anschaffungspreis und die Betriebskosten eines Zytometers. Daher sind bis jetzt nur sehr wenige Arbeiten zu Hochdurchsatz-Screeningmethoden auf Basis der Durchflusszytometrie durchgeführt worden. Olsen et al. entwickelten einen FACS-

Assay für Proteine, die an der Oberfläche von *E. coli* präsentiert werden [Olsen et al., 2003]. Bei diesem Verfahren werden Substrate, die aus einer positiv geladenen, fluoreszierenden sowie einer fluoreszenzunterdrückenden (*fluorescence quenching*) Komponente zusammengesetzt sind, von der negativ geladenen Zelloberfläche angezogen. Daraufhin kommt es zur proteinkatalysierten Substratspaltung und somit zur Freisetzung des Fluorophors. Dieses Verfahren ist jedoch auf spezielle Substrate beschränkt. Ein universell einsetzbares Screeningverfahren für Hydrolasen in Verbindung mit der extrem hohen Durchsatzrate eines Durchflusszytometers, welches gleichermaßen auch im Mikrotiterplattenformat anwendbar ist, wäre äußerst wünschenswert.

Grundsätzlich führen hydrolase-katalysierte Substratspaltungen zur Freisetzung von sauren oder basischen Verbindungen, die pH-Änderungen im Reaktionsmedium nach sich ziehen. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von ratiometrischem pHluorin [Miesenbock et al., 1998], einer pH-sensitiven Mutante von GFP, solche pH-Änderungen bei esterase-katalysierten Umsetzungen eines geeigneten Substrats auch in *E. coli* nachweisbar sind [Schuster, 2001]. Aus all diesen Erkenntnissen ergaben sich für die Dissertation folgende Aufgaben:

- Erweiterung des auf pHluorin-basierten intrazellulären Screeningsystems auf andere Hydrolasen und hydrolase-katalysierte Substratumsetzungen.

- Etablierung der Screeningmethode zur Hochdurchsatzerkennung im Mikrotiterplattenformat.

- Assay-Etablierung für die Anwendung am Durchflusszytometer, um eine Einzelzellsortierung mit extrem hohem Durchsatz zu ermöglichen.

- Assay-Validierung durch Anlegen und Screening einer Bibliothek aus Enzymvarianten anhand einer Problemstellung. Charakterisierung der mit Hilfe des Screeningverfahrens gefundenen Mutanten sowie ein Vergleich der verbesserten Eigenschaften mit dem Wildtyp.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung und Koexpression von pHluorin und Hydrolasen

3.1.1 Klonierung der Hydrolasen in das Plasmid pGEX_pH_PFE

Als Ausgangspunkt standen folgende Plasmide zur Verfügung:

- Das Plasmid pGEX_rat_pHluourin [Miesenbock et al., 1998] trägt das Gen für das ratiometrische pHluorin (*rat_pHluorin*), das über die Thrombinschnittstelle *Thr'* mit dem Gen der Gluthation-*S*-Transferase (*GST*) fusioniert wurde. Dieses Fusionsgen steht unter der Kontrolle eines *tac*-Promotors (P_{tac}). Des Weiteren besitzt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen (*Amp*) für die Selektion (Abbildung 22).

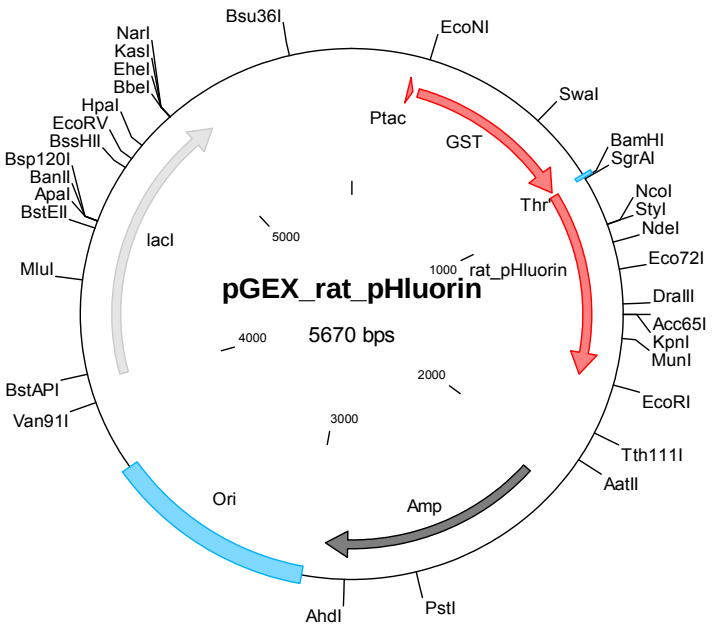


Abbildung 22: Plasmidkarte von pGEX_rat_pHluorin. Neben den im Text bereits erwähnten Genen und Promotoren besitzt das Plasmid noch einen Replikationsursprung (*Ori*) sowie ein internes *lac*-Gen (*lacI*).

- Das Plasmid pGEX_pH_PFE wurde in Vorarbeiten aus den beiden Plasmiden pGEX_rat_pHluorin und pJOE2792.1 konstruiert [Traub, 2000]. Dabei wurde in pGEX_rat_pHluorin direkt nach der *Eco*RI-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende des *GST-rat_pHluorin*-Fusionsgens eine *Hind*III-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Daraufhin wurde der Rhamnose-induzierbare Promotor (P_{rha}) sowie das *pfe*-Gen, welches für die Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* kodiert, durch Restriktionsverdau mit *Eco*RI und *Hind*III aus pJOE2792.1 ausgeschnitten und in pGEX_rat_pHluorin einkloniert. Das neue Plasmid pGEX_pH_PFE trägt somit zusätzlich zu *GST-rat_pHluorin* unter Kontrolle von P_{tac} auch das *pfe*-Gen unter Kontrolle von P_{rha} (Abbildung 23).

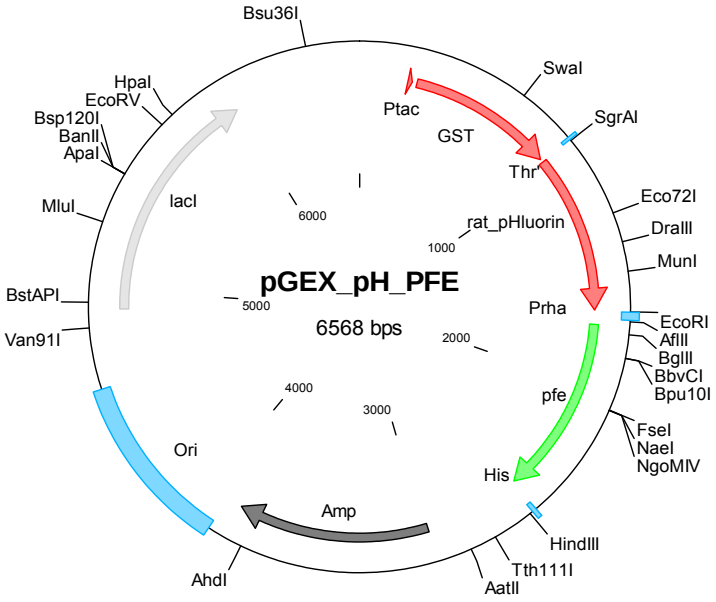


Abbildung 23: Plasmidkarte von pGEX_pH_PFE. Neben den im Text bereits erwähnten Genen und Promotoren besitzt das Plasmid noch einen Replikationsursprung (*Ori*) sowie ein internes *lac*-Gen (*lacI*).

Das Einklonieren anderer Hydrolase-Gene in den Vektor pGEX_pH_PFE erfolgte über die *Eco*RI- und *Hind*III-Restriktionsschnittstellen unter Substitution des *pfe*-Gens. Diese Klonierungsstrategie ist anhand der Einführung des für die Esterase aus *Geobacillus stearothermophilus* kodierenden Gens *bse* in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

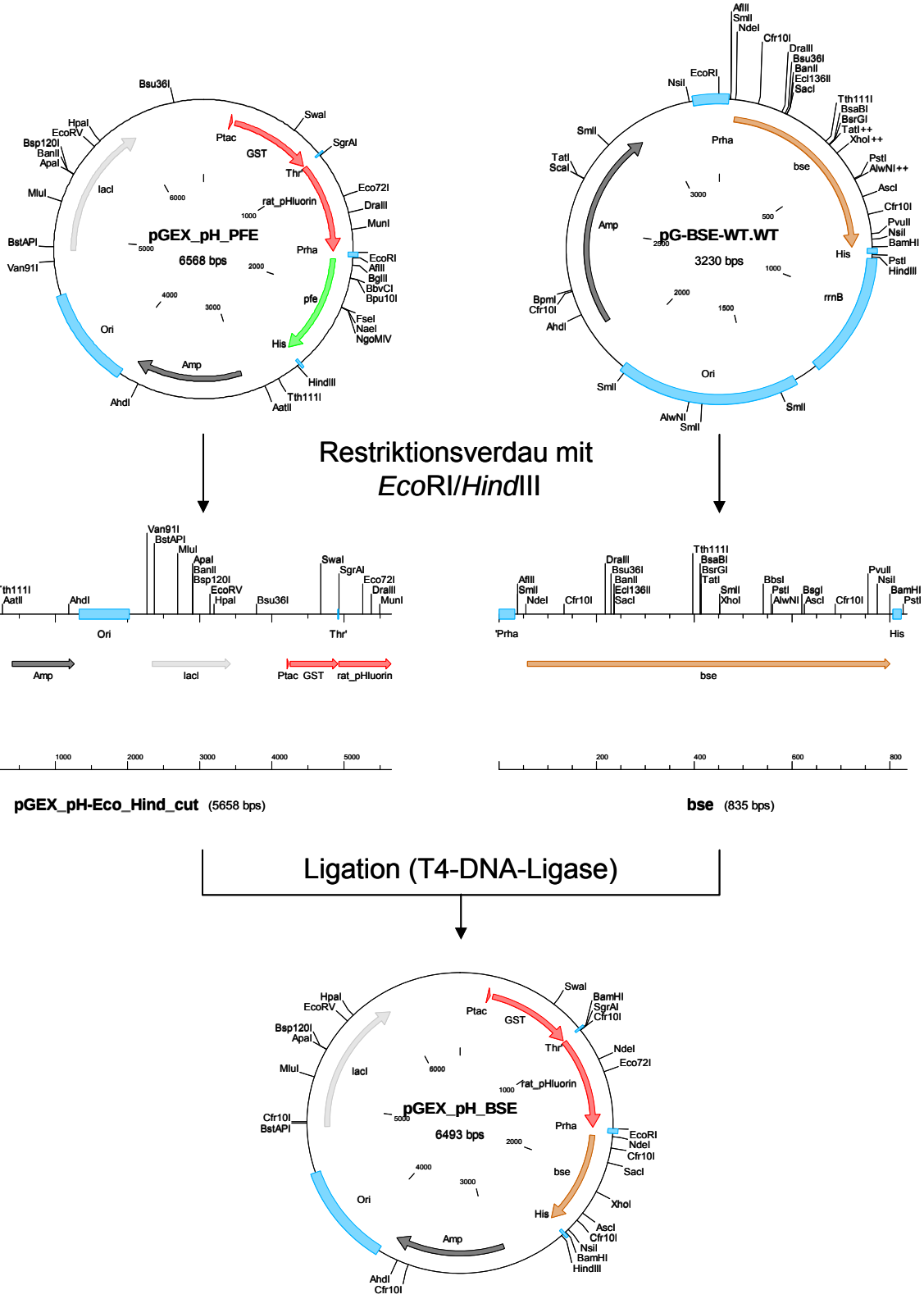
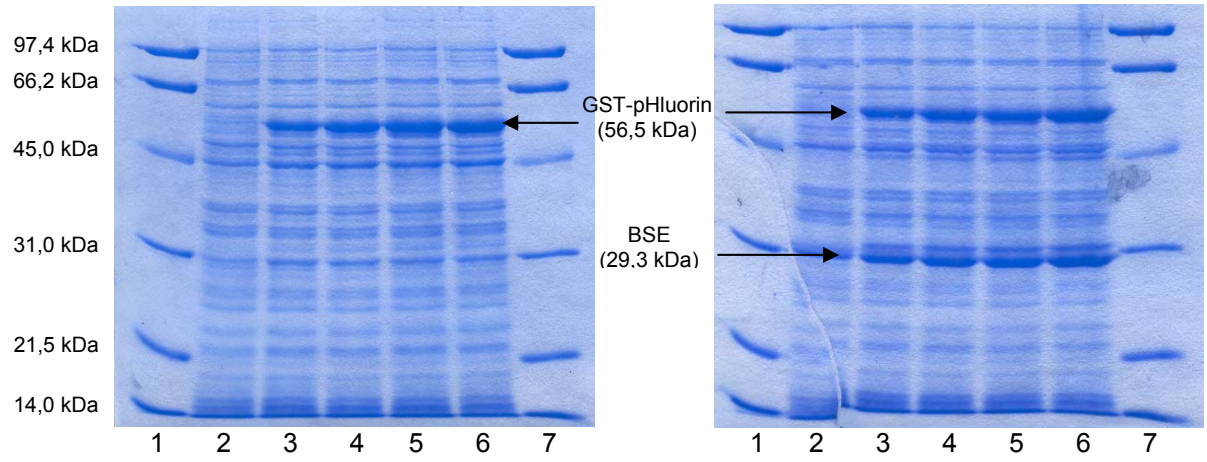


Abbildung 24: Klonierungsstrategie zur Herstellung des Plasmids pGEX_pH_BSE

Mit Hilfe dieser Klonierungsstrategie wurden neben dem Plasmid pGEX_pH_BSE (mit dem Gen der Esterase aus *Geobacillus stearothermophilus*) auch die Plasmide pGEX_pH_BsubpNBE (mit der *p*-Nitrobenzylesterase aus *Bacillus subtilis*) und pGEX_pH_ACH (mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes*) konstruiert.

3.1.3 Koexpression von pHluorin und Hydrolasen

Die Transformation von *E. coli* DH5α mit dem Vektor pGEX sowie die Koexpression von pHluorin und verschiedener Hydrolasen erfolgte nach dem Standardprotokoll in 100 ml LB-Amp-Medium (100 µg/ml Ampicillin) (Kap. 5.7.4). Nach Induktion mit Rhamnose (12,2 mmol) bzw. IPTG (1,0 mmol) wurde stündlich ein Milliliter der Zellkultur entnommen und über SDS-PAGE (Kap. 5.9.1) analysiert. Abbildung 25 zeigt die Expression von pHluorin (links) bzw. die Koexpression von pHluorin und Esterase aus *Geobacillus stearothermophilus* (BSE) als Modellhydrolase in Abhängigkeit von der Zeit.



Spur: 1 & 7: *Low-molecular-weight*-Standard
Spur 2: 10 µl Zellkultur vor Induktion
Spur 3: 10 µl Zellkultur nach 1 h
Spur 4: 10 µl Zellkultur nach 2 h
Spur 5: 10 µl Zellkultur nach 3 h
Spur 6: 10 µl Zellkultur nach 4 h

Abbildung 25: Analyse der Expression von pHluorin (links) bzw. der Koexpression von pHluorin und Esterase von *Geobacillus stearothermophilus* (BSE) (rechts)

Nach vier Stunden war sowohl bei den Zellen mit pHluorin- (linke Seite) als auch bei den Zellen mit pHluorin- und Esteraseaktivität (rechte Seite) eine deutliche Überexpression des GST-pHluorin-Fusionsproteins bei 56,5 kDa erkennbar. Darüber hinaus zeigten die Zellen mit Esteraseaktivität eine zusätzliche Bande bei 29,3 kDa, was dem Molekulargewicht der Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* entspricht. Die Überexpression der *p*-Nitrobenzylesterase aus *Bacillus subtilis* (BsubpNBE) bzw. der Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* (ACH) zeigten zusätzliche Banden bei 54 kDa bzw. 64 kDa (nicht gezeigt). Nach Zellaufschluss mittels Ultraschall wurden außerdem Aktivitätsbestimmungen aus dem Rohextrakt durchgeführt. So zeigten die BSE sowie die BsubpNBE gegenüber pNPA (Kap. 5.9.3.1) eine spezifische Aktivität von 58 U/mg bzw. 77 U/mg. Die spezifische Aktivität der Hydantoinase gegenüber Hydantoin wurde am pH-Stat auf 294 U/mg bestimmt.

3.2 Assay-Entwicklung

3.2.1 Prinzip des Assays

Hydrolase-katalysierte Umsetzungen sind im Allgemeinen mit pH-Änderungen im Reaktionsmedium verbunden. Das Ausmaß dieser pH-Änderungen ist vor allem von der Konzentration und der Säurestärke der freigesetzten Reaktionsprodukte abhängig. In Abbildung 26 ist ein allgemeines Reaktionsschema für eine Esterase-katalysierte Substratspaltung dargestellt.

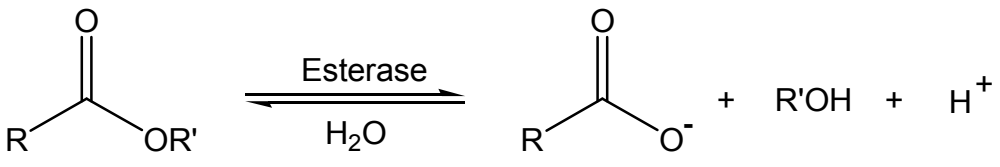


Abbildung 26: Allgemeines Reaktionsschema für die Hydrolyse eines Esters, katalysiert durch eine Esterase.

Der Ester wird hierbei in die korrespondierende Carbonsäure und den Alkohol umgewandelt. Dabei kommt es zur Freisetzung von Protonen verbunden mit einer pH-Erniedrigung. Basierend auf dieser Eigenschaft sollte ein Nachweissystem zur Detektion von hydrolytischer Aktivität in *E. coli* etabliert werden. Diese pH-Änderungen sollten mit Hilfe von pHluorin, einer pH-sensitiven Mutante von GFP detektiert werden [Miesenbock et al., 1998]. In seinem Anregungsspektrum besitzt pHluorin in einem pH-Bereich von 8,0 bis 5,5 zwei pH-abhängige Peaks bei 395 bzw. 475 nm mit einer maximalen Fluoreszenzemission bei 508 nm. Ausgehend von pH 8,0 ist bei sinkendem pH eine Abnahme des Maximums bei 395 nm bei gleichzeitiger Zunahme des Peaks bei 475 nm zu beobachten. Die Änderung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses $R_{475/395}$ der beiden Maxima kann daher als pH-Indikator fungieren. Bei der Assayentwicklung wurde jedoch das Fluoreszenzemissionsverhältnis aus den beiden Anregungswellenlängen 390 bzw. 485 nm bestimmt.

3.2.2 Zusammenhang zwischen intrazellulärer pH-Änderung und dem Fluoreszenzemissionsverhältnis von pHluorin

Um die Korrelation zwischen intrazellulären pH-Änderungen und dem Fluoreszenzemissionsverhältnis zu untersuchen, wurden *E. coli* DH5α Zellen mit aktiv exprimiertem pHluorin in Kaliumphosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses $R_{485/390}$ am Fluoreszenzspektrometer (Abbildung 27).

Die Zellen zeigten bei einer pH-Erniedrigung von pH 8,0 (0,98) über pH 7,0 (1,38) bis hin zu pH 6,0 (1,95) nahezu eine Verdopplung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses $R_{485/390}$.

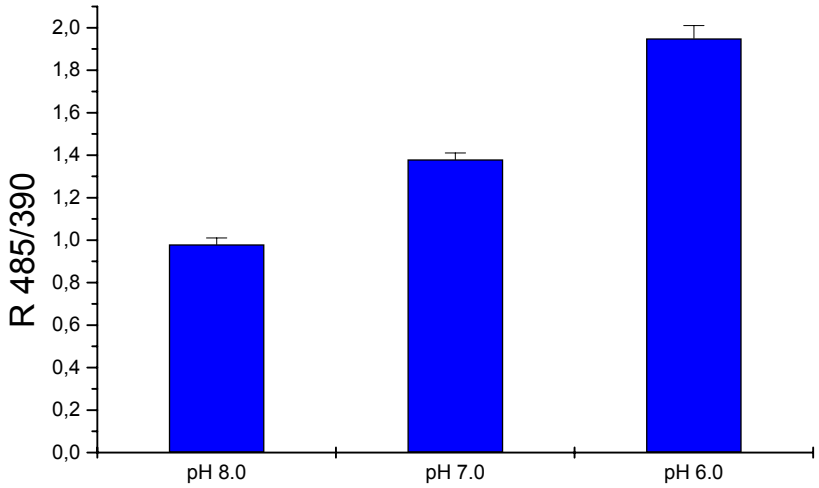


Abbildung 27: Veränderung des Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ von pHluorin-markierten *E. coli* in Abhängigkei vom pH-Wert

Als ergänzendes Experiment wurden *E. coli* Zellen mit pHluorin-Aktivität in Phosphatpuffer in Gegenwart des Bakteriocins Nisin (5 µg/ml) aus *Lactococcus lactis* inkubiert und $R_{485/390}$ bestimmt (Tabelle 4). Bacteriocine bilden Poren in der Zellmembran, was zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials sowie dem Ausfall der protonenabhängigen Membranpumpen führt [Bruno et al., 1992; Budde et al., 2000]. Letztendlich passt sich also der pH_i- dem pH_{ex}-Wert an.

Tabelle 4: Verhalten des Fluoreszenzemissionsverhältnisses $R_{485/390}$ bei verschiedenen pH-Werten in Gegenwart von Nisin

pH-Wert	Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ ohne Nisin	Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ mit Nisin
8,0	0,98	0,96
7,0	1,38	1,38
6,0	1,95	1,96

In Gegenwart von Nisin zeigten Zellen mit pHluorin-Aktivität nahezu identische $R_{485/390}$-Werte wie in dessen Abwesenheit. Diese Ergebnisse unterstreichen die starke pH-Abhängigkeit von pHluorin in *E. coli* innerhalb des Bereichs von pH 8,0 bis pH 6,0. Bei hydrolytischer Substratspaltung mit resultierender pH-Erniedrigung wurde pH 8,0 als Startpunkt für alle weiteren Untersuchungen gewählt.

3.2.3 Assayvalidierung anhand einer Modellhydrolase bei Umsatz verschiedener Substrate

Das in Kap. 3.2.1 beschriebene Prinzip sollte anhand einer Modellhydrolase bewiesen werden. Hierbei sollte gezeigt werden, dass intrazelluläre pH-Änderungen, hervorgerufen durch Hydrolase-katalysierte Substratumsetzungen, mit Hilfe von pHluorin detektierbar sind. Dazu wurde das Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ von *E. coli* DH5α-Zellen, die neben pHluorin auch die Esterase aus *Geobacillus stearothermophilus* (BSE) aktiv exprimierten, bei Umsatz mit verschiedenen Substraten in Gegenwart von DMSO als Lösevermittler bestimmt (Kap. 5.10.1.2). Als Referenz diente dabei das Fluoreszenzemissionsverhältnis bei pH 8,0 von *E. coli* DH5α-Zellen, die pHluorin aber keine Esterase produzierten (Abbildung 28).

Eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzemissionsverhältnisses war nur in Gegenwart von Tributyrin (~2,15) und Methylcaproat (~1,89) zu beobachten. Für diese beiden Substrate kam es nahezu zu einer Verdopplung gegenüber den Referenzansätzen (~1,0 bis 1,3). Bei Butylacetat (~1,25) und Tricaprylin (~1,15) dagegen zeigte das Fluoreszenzemissionsverhältnis lediglich minimale Veränderungen.

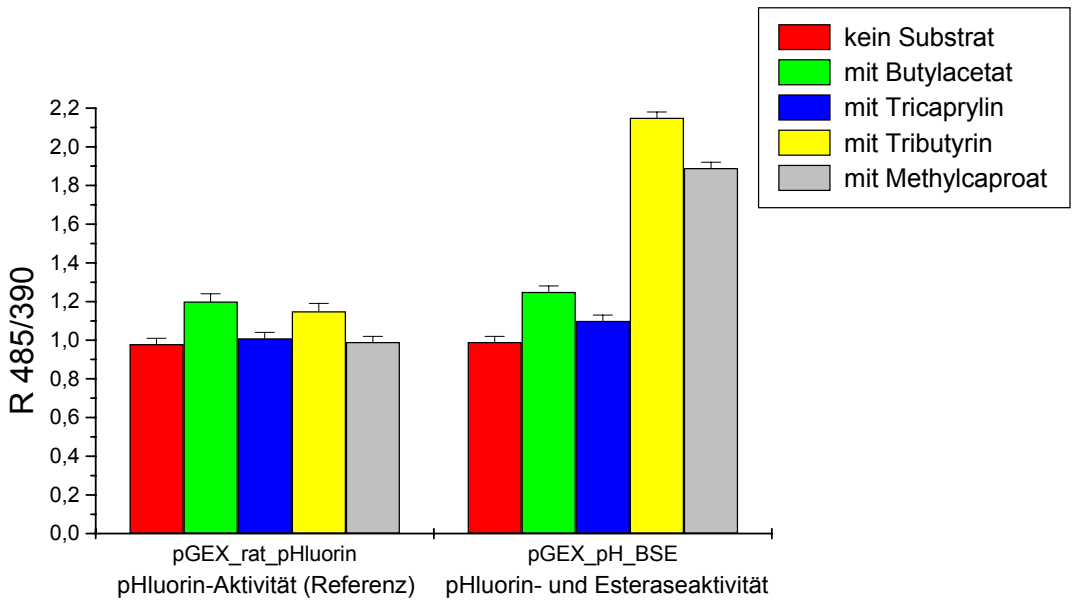


Abbildung 28: Das Fluoreszenzemissionverhältnis $R_{485/390}$ bei Umsatz verschiedener Substrate von *E. coli* ohne (links) bzw. mit Esterase-Aktivität (rechts)

Durch *in vitro* Experimente mit Hilfe des pH-Stat Assays (Kap. 5.9.3.2) konnten diese Ergebnisse genauer untersucht werden (Tabelle 5). Hierzu wurden Zellrohextrakte der pGEX_rat_pHluorin- bzw. pGEX_pH_BSE-Zellen eingesetzt.

Tabelle 5: *In vitro* Aktivitäten der *Geobacillus stearothermophilus* Esterase (BSE) gegenüber verschiedenen Substraten sowie deren autohydrolytischer Umsatz gemessen am pH-Stat

Substrat	**Relative Aktivität [%]**	**Autohydrolyse bei 37°C [µmol/min]**
Tributyrin	100	5,9
Methylcaproat	84	k. A.
Tricaprylin	10	k. A.
Butylacetat	4	5,6

Es zeigte sich, dass BSE von den untersuchten Substraten gegenüber Tributyrin seine größte hydrolytische Aktivität aufweist. Diese Beobachtung bestätigte das Ergebnis der *in vivo* Experimente, wonach pHluorin-markierte *E. coli* Zellen mit Esteraseaktivität das größte Fluoreszenzemissionsverhältnis in Gegenwart von Tributyrin aufweisen (Abbildung 28). Tributyrin wurde daraufhin als Standard für den Vergleich der Esteraseaktivität gegenüber den anderen Substraten verwendet. Die relative Esteraseaktivität gegenüber Methylcaproat war im Vergleich zu Tributyrin am pH-Stat um ca. 16 % geringer, was auch das etwas niedrigere Fluoreszenzemissionsverhältnis bei Umsatz mit ganzen Zellen erklärt (Abbildung 28). Dagegen zeigten Tricaprylin und Butylacetat einen deutlich niedrigeren Esterase-katalysierten Umsatz, was sich auch in den geringeren Änderungen des Fluoreszenzemissionsverhältnisses gegenüber den Referenzzellen ohne Esteraseaktivität zeigte (Abbildung 28).

Neben der Aktivität einer Hydrolase gegenüber den Substraten und der damit verbundenen mehr oder weniger starken pH-Änderung kann jedoch auch die Autohydrolyse der Substrate selbst einen Einfluss auf das Fluoreszenzemissionsverhältnis von pHluorin haben. So konnten am pH-Stat bei 37°C in 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 8,0 autohydrolytische Aktivität von Tributyrin (~5,9 µmol/min) und Butylacetat (~5,6 µmol/min) detektiert werden (Tabelle 5), was sich auch an einem leicht erhöhten Fluoreszenzemissionsverhältnis der Referenzzellen in Gegenwart beider Substrate bemerkbar machte (Abbildung 28).

Bei Methylcaproat und Tricaprylin dagegen kam es aufgrund fehlender autohydrolytischer Aktivität zu keiner Veränderung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses gegenüber dem Ansatz ohne Substrat (Abbildung 28).

3.2.5 Einfluss des Lösevermittlers auf das Fluoreszenzemissions-verhältnis von pHluorin

Für den pHluorin-Assay wurden verschiedene Lösevermittler und deren Einfluss auf die Fluoreszenzaktivität bzw. das Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ von pHluorin untersucht. Dazu wurde $R_{485/390}$ von *E. coli* DH5α-Zellen, die neben pHluorin- auch BSE aktiv exprimierten, in Gegenwart von 2% (v/v) Substrat (Tributyrin bzw. Methylcaproat) sowie verschiedenen Lösevermittlern (3 % v/v bzw. 3 % m/v bei Gum arabic) bestimmt (Abbildung 29)

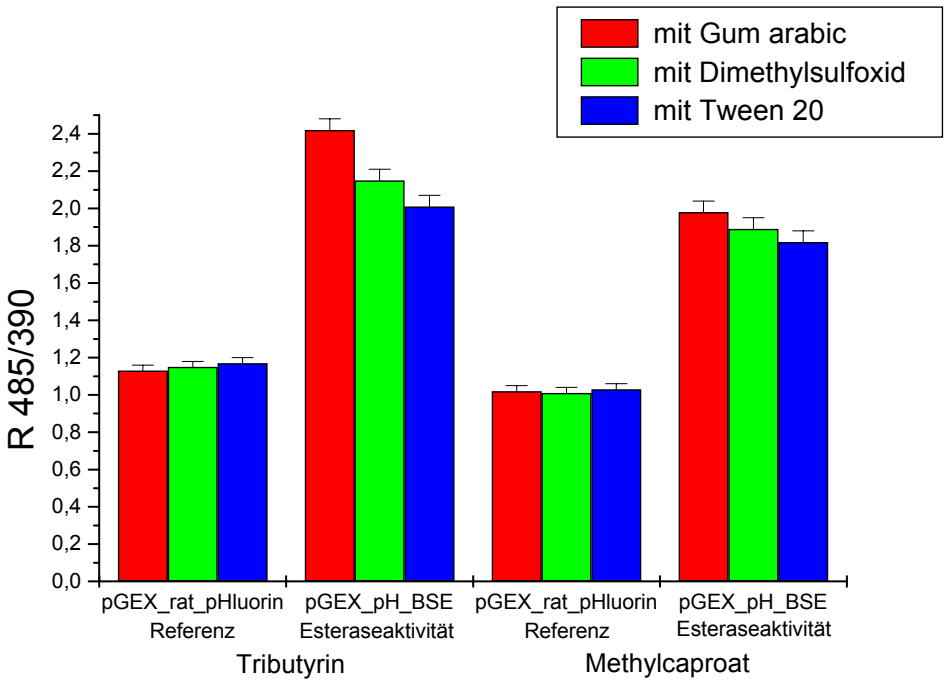


Abbildung 29: Vergleich der Fluoreszenzemissionsverhältnisse $R_{485/390}$ bei Verwendung verschiedener Lösevermittler

Das größte Fluoreszenzemissionsverhältnis während der Hydrolyse von Tributyrin bzw. Methylcaproat wurde in Gegenwart von Gum arabic (~2,42 bzw. 1,98) beobachtet. Allerdings zeigte eine frühere Studie [Schuster, 2001], dass Gum arabic für den Einsatz des Assays in der Durchflusszytometrie (Kap. 3.5) einen entscheidenden Nachteil hat. In einer Reaktionsemulsion, bestehend aus wasserunlöslichem Substrat und Kaliumphosphatpuffer, bindeten sich *E. coli* Zellen an die dispergierten Gum arabic-Partikel, was eine Analyse und vor allem eine Sortierung deutlich erschwert. Das niedrigste Fluoreszenzemissionsverhältnis für beide Substrate wurde in Gegenwart von Tween 20 (~2,01 bzw. 1,82) als Lösevermittler gemessen. Als bester Kompromiss im Hinblick auf eine erfolgreiche Übertragung des pHluorin-Assays auf FACS-basierte Systeme (Kap. 3.5) in Verbindung mit der größtmöglichen Differenz im Fluoreszenzemissionsverhältnis gegenüber der Referenz hat sich daher der Einsatz von Dimethylsulfoxid (~2,15 bzw. 1,89) erwiesen.

3.2.6 Einfluss der Kaliumphosphatpufferkonzentration auf die Fluoreszenzintensität und das Fluoreszenzemissions-verhältnis von pHluorin

In vitro Experimente am pH-Stat zeigten eine höhere relative Aktivität der Esterase aus *Geobacillus stearothermophilus* (BSE) gegenüber Phenylacetat (~107%) im Vergleich zu Tributyrin (~100%). Allerdings wurde bei *E. coli* Zellen, die neben pHluorin- auch Esterase-Aktivität (BSE) besitzen, in Gegenwart von Phenylacetat als Substrat ein äußerst schwaches Fluoreszenzsignal beobachtet, vergleichbar mit dem vom *E. coli* Wildtyp (Tabelle 6). Dies erschwert eine Bestimmung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses, dass theoretisch größer sein sollte als das in Gegenwart von Tributyrin. Vor allem im Hinblick auf die Anwendung des Assays am FACS ist die Unterscheidung zwischen nicht- und pHluorin-markierten Zellen unerlässlich (Kap. 3.5).

Tabelle 6: Vergleich von Kaliumphosphatpufferkonzentrationen und Fluoreszenzintensitäten von nicht- bzw. pHluorin-markierten *E. coli* Zellen bei Umsatz von Phenylacetat (2 % v/v)

Zelltyp	Assaylösung	Pufferkonzentration [mM]	Intensität 390 nm	Intensität 485 nm	Fluoreszenzmissionsverhältnis $R_{485/390}$
***E.coli* DH5α**	Puffer, pH 8,0	50	96	148	-
	Puffer, pH 8,0 Phenylacetat	50	110	181	-
***E.coli* DH5α + pHluorin**	Puffer, pH 8,0	50	755	747	0,99
	Puffer, pH 8,0 Phenylacetat	50	592	722	1,22
***E.coli* DH5α + pHluorin + Esterase**	Puffer, pH 8,0	50	601	606	1,00
	Puffer, pH 8,0 Phenylacetat	50	74	166	2,24
	Puffer, pH 8,0 Phenylacetat	100	98	210	2,14
	Puffer, pH 8,0 Phenylacetat	500	284	597	2,10
	Puffer, pH 8,0 Phenylacetat	1000	330	656	1,99

Bei Erhöhung der Pufferkonzentration nahm auch die Fluoreszenzintensität von pHluorin deutlich zu. Bei 500 mM Kaliumphosphatpuffer kam es ungefähr zu einer vierfachen Steigerung des Fluoreszenzsignals (Tabelle 6). Allerdings zeigte sich bei erhöhter Pufferung der Reaktion auch eine zunehmende Verminderung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses von 2,24 (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer) auf 1,99 (in 1 M Kaliumphosphatpuffer).

Bei der Hydrolyse von Phenylacetat kommt es zur Freisetzung der beiden relativ aciden Komponenten Essigsäure und Phenol. Die Inkubation von Zellen mit pHluorin und Esteraseaktivität in Gegenwart der beiden Produkte zeigte, dass Essigsäure die Fluoreszenzaktivität von pHluorin extrem beeinträchtigte (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von pHluorin-markierten *E. coli* Zellen in Gegenwart von Phenol und Essigsäure

Zelltyp	Assaylösung	Intensität 390 nm	Intensität 485 nm
***E.coli* DH5α + pHluorin + Esterase**	Puffer (50 mM, pH 8,0) Phenol (2% v/v))	766	762
	Puffer, (50 mM, pH 8,0) Essigsäure (2% v/v))	148	165
	Puffer (50 mM, pH 8,0) Essigsäure (2% v/v)) Phenol (2% v/v))	65	143

3.3 Assay-Erweiterung auf weitere Hydrolasen und hydrolytische Umsetzungen

Unter Kapitel 3.2 konnte bewiesen werden, dass der Assay in der Lage ist, Esterase-katalysierte Hydrolysereaktionen und vor allem Aktivitätsunterschiede der Esterase gegenüber bestimmten Substraten zu detektieren. Der nächste wichtige Schritt war die Erweiterung des Assays für den Nachweis anderer hydrolytischer Umsetzungen neben der Esterspaltung. Dazu wurden zwei Modellreaktionen auf Anwendbarkeit des Assays hin untersucht.

Bei der ersten Umsetzung handelte es sich um die Hydrolyse von Hydantoin zu *N*-Carbamoylglycin, katalysiert durch die rekombinante Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* (ACH) (Abbildung 30).

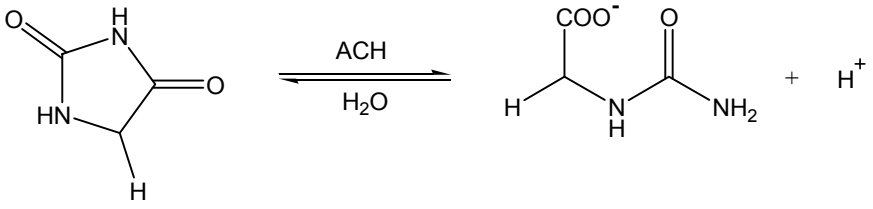


Abbildung 30: Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse von Hydantoin zu *N*-Carbamoylglycin

Für die Expression der Hydantoinase wurde bei der Induktion neben IPTG und Rhamnose auch 1 mM Zink(II)-sulfat zur korrekten Faltung des Enzyms und als katalytischer Faktor zugesetzt. Anschließend wurde wiederum das Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ der Zellen mit pHluorin- und Hydantoinaseaktivität bei Umsatz von Hydantoin bestimmt (Abbildung 31).

Das Fluoreszenzemissionsverhältnis von *E. coli* Zellen, die pHluorin und die rekombinante Hydantoinase exprimieren, war mit einem Wert von ungefähr 2,25 nahezu doppelt so groß gegenüber der Referenz (~1,37). Diese Werte liegen in einer ähnlichen Größenordnung (~2,0 bis 2,3) wie die für die Umsetzung von Tributyrin mit esteraseaktiven Zellen (Kap. 3.2.3)

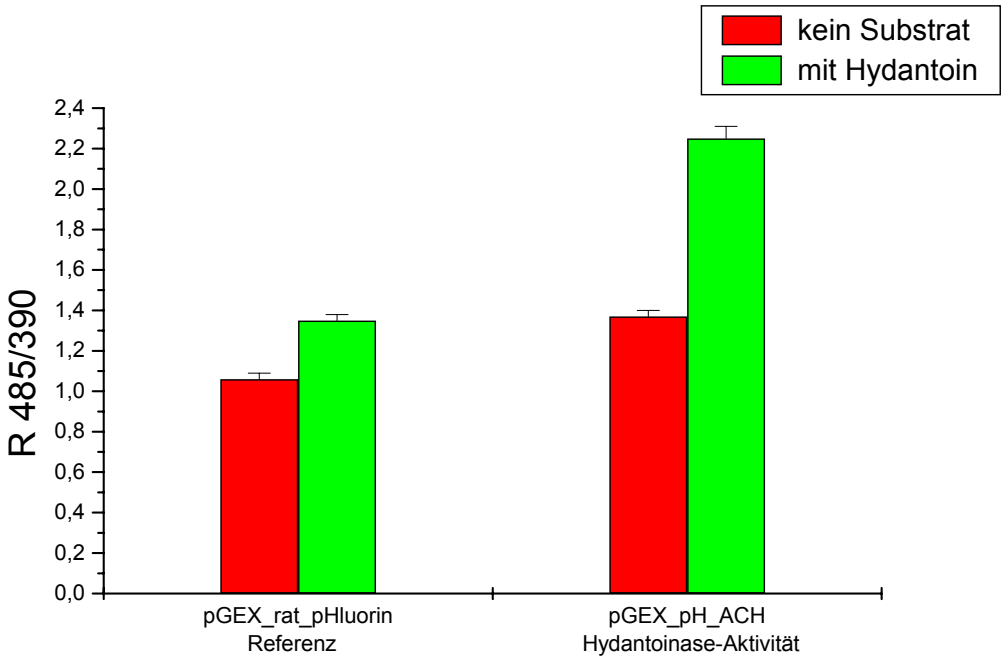


Abbildung 31: Fluoreszenzemissionsverhältnis von *E. coli* Zellen mit Hydantoinaseaktivität bei der Hydrolyse von Hydantoin

Als zweite Modellreaktion wurde die Hydrolyse von Carboxylsäureamiden untersucht. Bei dieser Reaktion kommt es neben der Freisetzung von Carboxylsäure auch zur Bildung von Aminen (Abbildung 32).

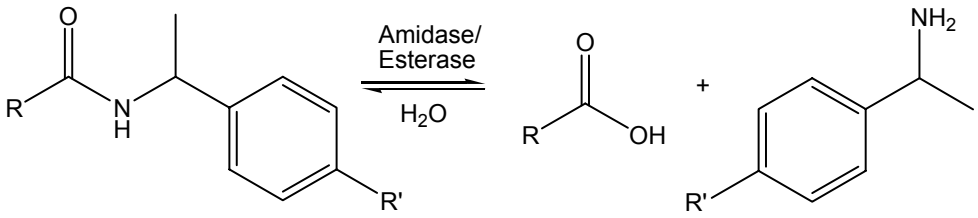


Abbildung 32: Amidase/Esterase-katalysierte Spaltung von Carboxylsäureamiden

Als Biokatalysator für die hydrolytische Umsetzung von *N*-(1-*p*-Tolylethyl)octylamid zu Caprylsäure und 1-*p*-Tolylethylamin wurden Zellen eingesetzt, die die *p*-Nitrobenzylesterase aus *Bacillus subtilis* (BsubpNBE) aktiv exprimierten.

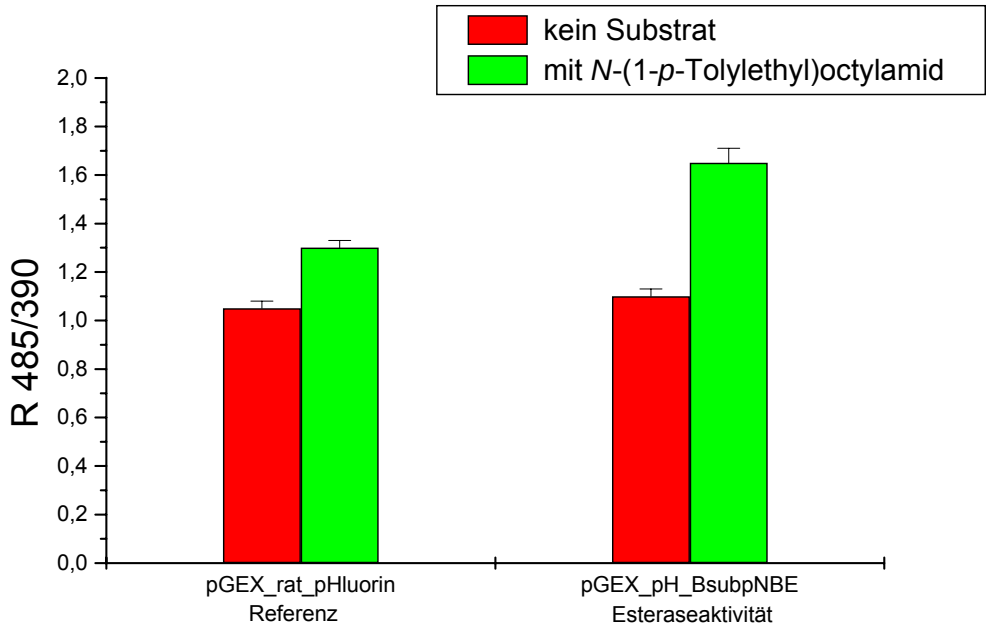


Abbildung 33: Das Fluoreszenzemissionsverhältnis von *E. coli* Zellen mit *p*-Nitrobenzylesterase bei der Hydrolyse von *N*-(1-*p*-Tolylethyl)octylamid

Abbildung 33 zeigt, dass die Änderung des Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ (~1,65) bei der Amidspaltung gegenüber der Referenz kleiner ausfiel als dies bei der Hydrolyse von Hydantoin der Fall war (Abbildung 31).

Um zu zeigen, dass der Assay in der Lage ist, auch zunehmende pH-Werte während einer Hydrolysereaktion zu detektieren, wurde die Amidspaltung in einem weiteren

Experiment in Abweichung der üblichen Vorgehensweise bei pH 6,0 anstatt bei pH 8,0 gestartet. In diesem Fall wurden Zellen ohne Esteraseaktivität, die bei pH 6,0 inkubiert wurden, als Referenz eingesetzt (Abbildung 34).

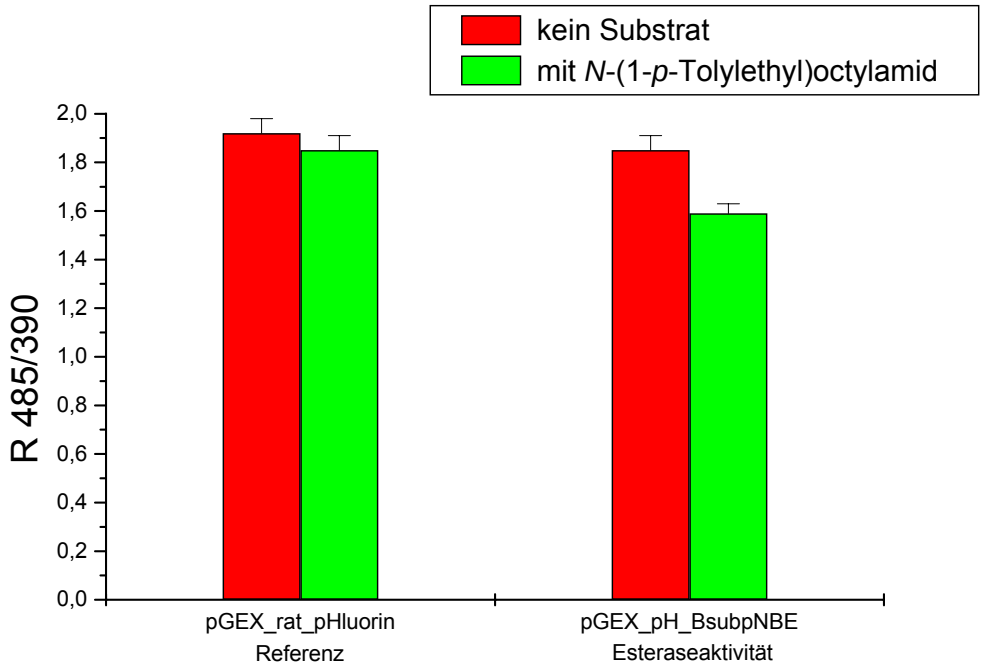


Abbildung 34: Fluoreszenzemissionsverhältnis von *E. coli* Zellen mit *p*-Nitrobenzylesterase bei der Hydrolyse von *N*-(1-*p*-Tolylethyl)octylamide ausgehend von pH 6,0

Das Fluoreszenzemissionsverhältnis von Zellen mit Esteraseaktivität war wie erwartet kleiner (~1,59) als bei der Referenz (~1,85). Dieses Ergebnis zeigt, daß ebenso eine pH-Zunahme während einer hydrolytischen Reaktion von pHluorin registriert werden kann.

3.4 Etablierung des pHluorin-Assays im Mikrotiter-platten-Maßstab

Für die Etablierung des Assays im Mikrotiterplattenformat wurden je acht *E. coli* Einzelkolonien mit dem Wildtyp bzw. einer korrespondierenden inaktiven Mutante [Schuster, 2001] der Esterase aus *Geobacillus stearothermophilus* (BSE) kultiviert (Kap. 5.7.5). Anschließend wurde der Assay in 250 µl Kaliumphosphatpuffer mit 3% (v/v) DMSO als Lösevermittler sowie 2% (v/v) Tributyrin als Substrat durchgeführt (Kap. 5.10.1.2). Das Fluoreszenzemissionsverhältnis von acht *E. coli*-Kulturen, die nur pHluorin aktiv produzierten, dienten als Referenz (Abbildung 35).

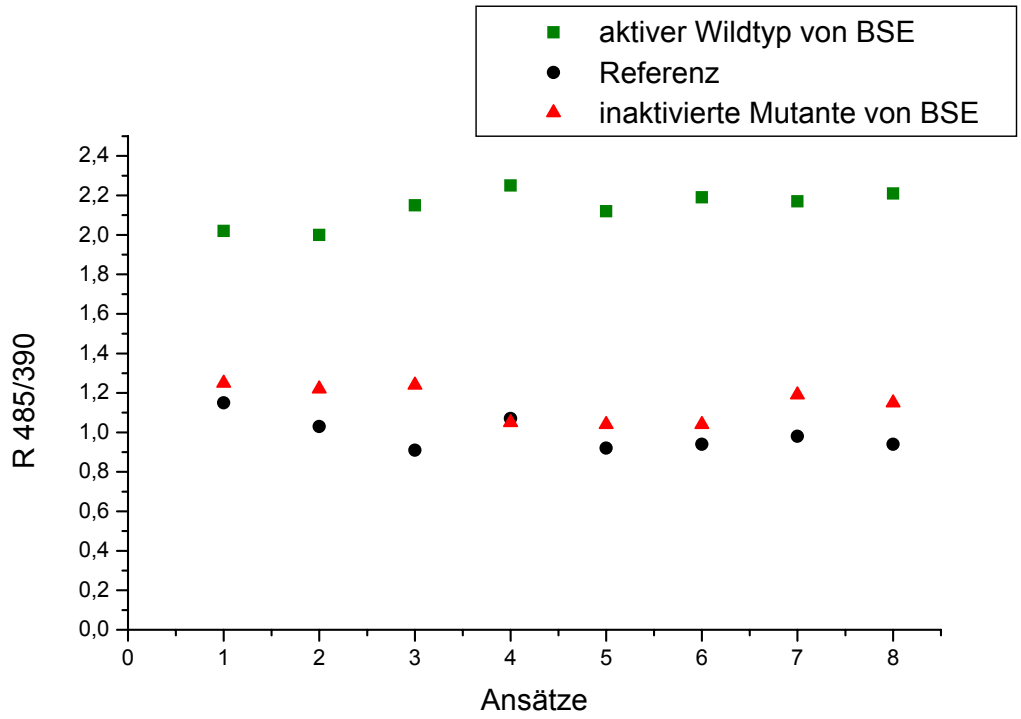


Abbildung 35: Die Fluoreszenzemissionsverhältnisse $R_{485/390}$ von je acht *E. coli* Kulturen mit aktiv exprimiertem Wildtyp bzw. inaktivierten Mutanten der *Geobacillus stearothermophilus* Esterase (BSE) bei der Hydrolyse von Tributyrin im Mikrotiterplattenformat

Abbildung 35 verdeutlicht, dass Zellen mit Esteraseaktivität ein höheres Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ in Gegenwart von Tributyrin nach 45 min Inkubation zeigten (~2,0 bis 2,3) als Zellen mit der inaktivierten Mutante bzw. Referenzzellen (~0,9 bis 1,3). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten der Experimente im Schüttelkolben (Kap 3.2.3) und demonstrieren die Möglichkeit einer

Anwendung von pHluorin als Sensor von intrazellulären pH-Änderungen im Mikrotiterplattenformat.

3.5 Möglichkeiten einer Assay-Applikation in der Durchflusszytometrie

3.5.1 Analyse von *E. coli* Zellen

Zunächst wurden *E. coli* DH5α Zellen ohne pHluorin- oder Hydrolaseaktivität nach Inkubation in Gegenwart von DMSO und Tributyrin am LSR II (ein Analysiergerät ohne Sortierfunktion) analysiert. Die in Abbildungen und Text auftretenden Parameter sind in Kap. 5.10.2 ausführlich beschrieben.

Von den jeweils 10^6 gemessenen Zellen wurden in den *Plots* insgesamt 50000 gleichzeitig dargestellt. Im *Side Scatter* (SSC) gegen *Forward Scatter* (FSC)-*Plot* (Abbildung 36 links oben) wurde die Granularitäts- bzw. Partikelgrößeverteilung der Zellsuspension aufgenommen. Die Region P1 wurde als spezifischer Bereich für das Auftreten von *E. coli* Einzelzellen festgelegt und beruht auf Erfahrungswerten. Innerhalb von P1 befanden sich mit 26618 *Events* ca. 53,2 % der hier dargestellten Gesamtpopulation (Abbildung 36 rechts oben). Bei den *Events* außerhalb der Region P1 handelt es sich hauptsächlich um Zellagglomerate, Zelltrümmer oder sonstige Verunreinigungen. Die beiden unteren Schaubilder zeigen das Verhalten der Population nach Anregung mit dem blauen Argonlaser bei 488 nm (GFP exc. 488 nm) bzw. nach Anregung mit dem violetten Diodenlaser bei 405 nm (GFP exc. 405 nm) mit einer Fluoreszenzemission bei 530 nm. Beide Parameter wurden gegen FSC aufgetragen. Zur Eingrenzung von Populationen und zur besseren Darstellung von Populationsverschiebungen wurden hier sogenannte Quadrantenregionen Q1 bis Q4 bzw. Q1-2 bis Q1-4 gesetzt. Die *Events*, die sich bereits im SSC gegen FSC-*Plot* innerhalb der Region P1 befanden, sind auch in diesen beiden Auftragungen (Abbildung 36 unten) als rote Farbpixel dargestellt.

Die farblosen *E. coli* Zellen zeigten wie zu erwarten ein äußerst schwaches Fluoreszenzsignal (< 10^3 Fluoreszenzeinheiten).

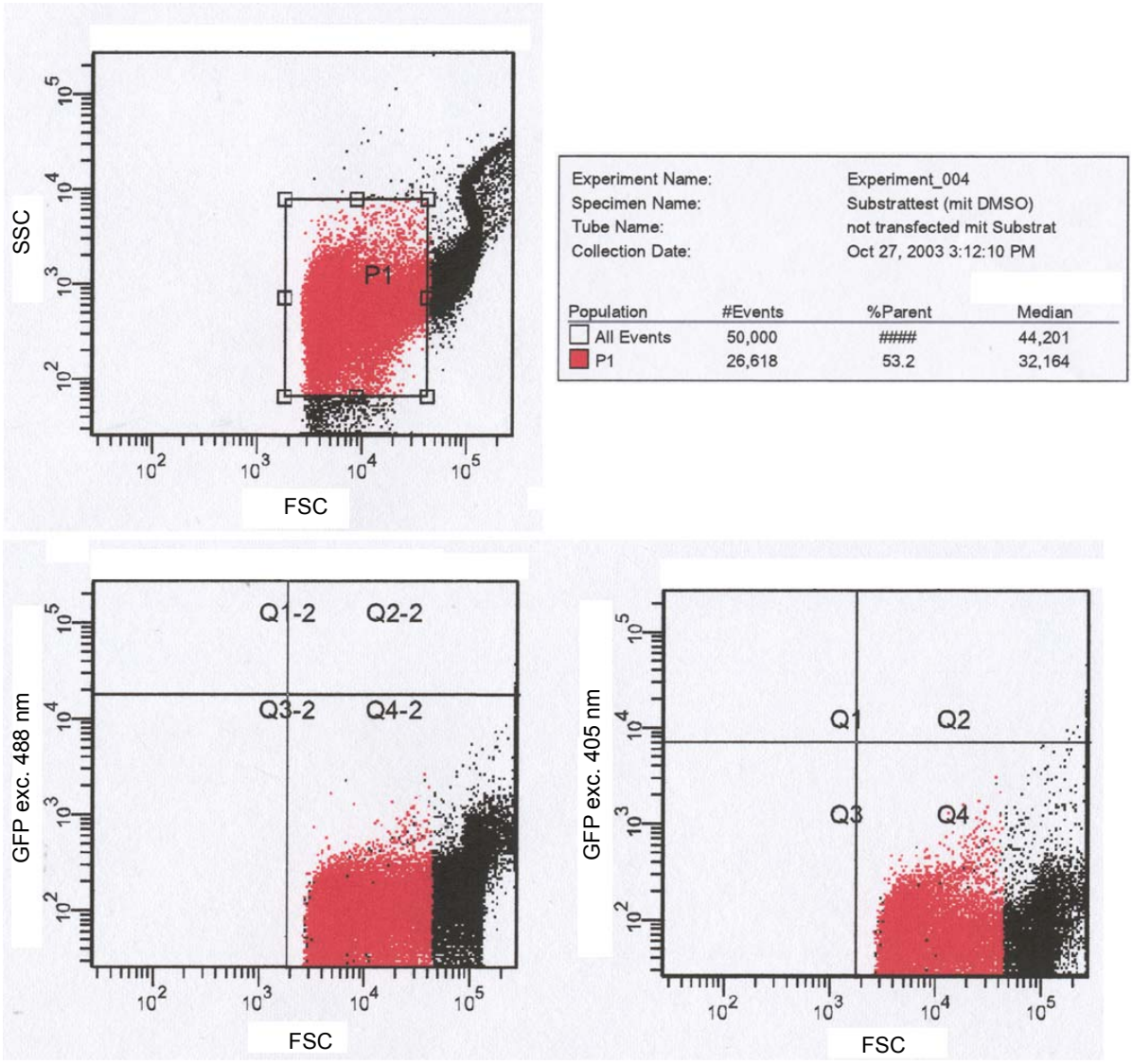


Abbildung 36: FACS-Analyse von *E.* coli Zellen ohne pHluorin- bzw. Esteraseaktivität in Gegenwart von DMSO und Tributyrin

3.5.2 Analyse von Zellen mit pHluorin-Aktivität

Um die pH-Abhängigkeit des Fluoreszenzemissionsverhältnisses der Zellen mit pHluorin-Aktivität zu demonstrieren, wurde in Übereinstimmung mit den Experimenten im Schüttelkolben- (Kap. 3.2.2) und im Mikrotiterplattenformat (Kap. 3.4) *E. coli* DH5α Zellen mit funktionell exprimiertem pHluorin in

Kaliumphosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 37).

Die Darstellung der analysierten Zellen erfolgte in sogenannten *Density Plots* durch Auftragung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses (Ratio exc. 488 nm/exc. 405 nm) gegen FSC (linke Seite) sowie des reziproken Fluoreszenzemissionsverhältnisses (Ratio exc. 405 nm/exc. 488 nm) gegen FSC. Bereiche mit unterschiedlicher Dichte an Events wurden durch Höhenlinien bzw. Farbvariationen wiedergegeben. Je heller der Farbton, desto höher ist die Dichte an *Events* in einem bestimmten Bereich. Um Populationsverschiebungen der Zellen bei verschiedenen pH-Werten besser sichtbar zu machen, wurden Quadrantregionen gesetzt, deren horizontale Begrenzungslinie direkt durch den Bereich der höchsten Zelldichte (weißer Bereich) der Population bei pH 8,0 geht (Abbildung 37, oben).

Bei pH-Abnahme von pH 8,0 (oben) über pH 7,0 (Mitte) nach pH 6,0 (unten) ist eine deutliche Verschiebung des Bereichs höchster Zelldichte zu einem höherem Fluoreszenzemissionsverhältnis (Abbildung 37, linke Seite) erkennbar. Im Gegenzug verschiebt sich die Zellpopulation bei pH-Erniedrigung zu kleineren Werten für das reziproke Fluoreszenzemissionsverhältnis (Abbildung 37, rechte Seite).

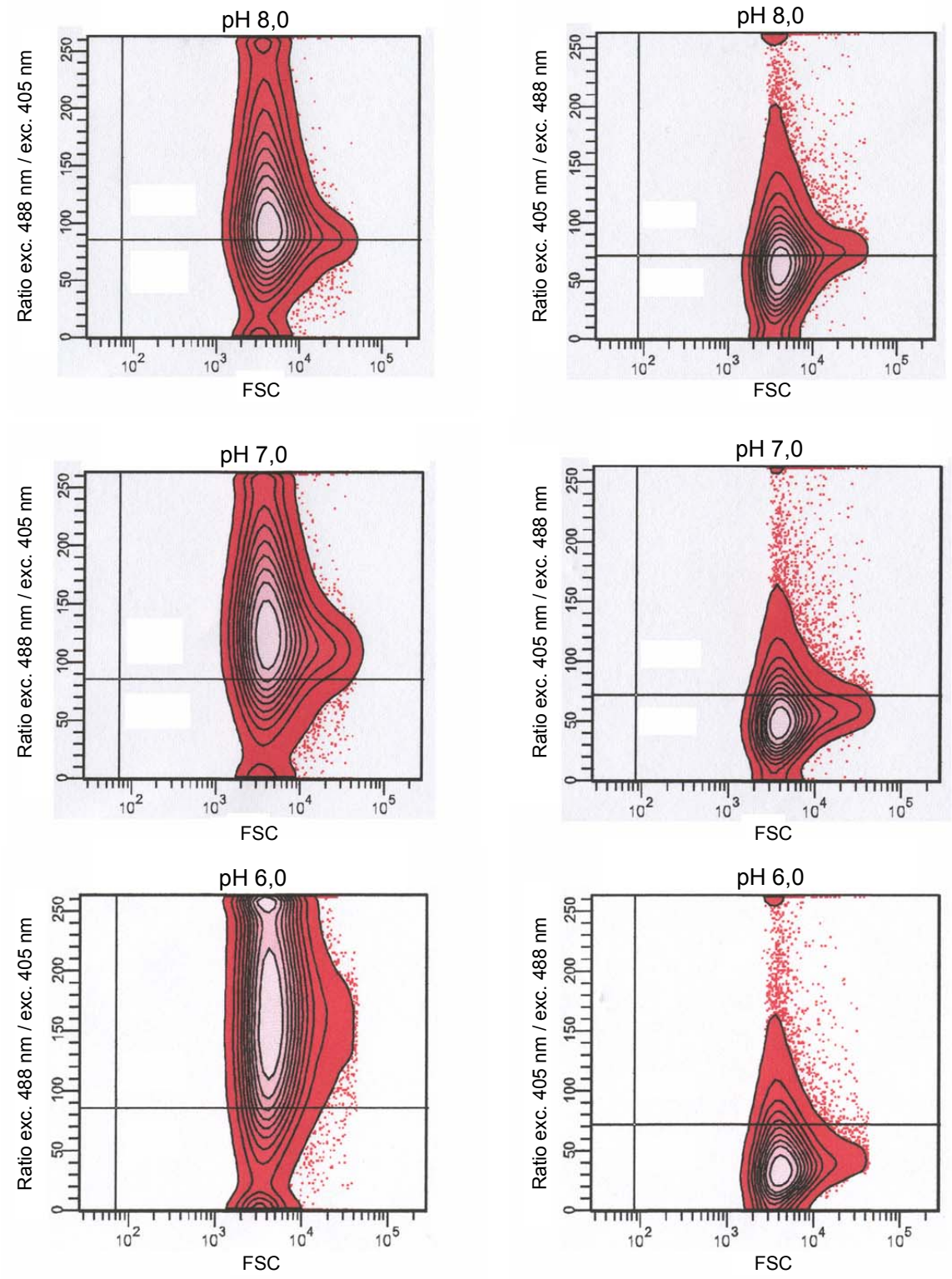


Abbildung 37: Darstellung von Populationsverschiebungen anhand der Auftragung von Ratio exc. 488 nm/exc. 405 nm gegen FSC (links) bzw. Ratio exc. 405 nm/exc. 488 nm gegen FSC (rechts) von *E.* coli Zellen mit pHluorin-Aktivität in Phosphatpuffer bei abnehmenden pH-Werten (von oben nach unten)

Ausserdem wurden die Zellen mit pHluorin-Aktivität in Gegenwart von DMSO und Tributyrin untersucht (Abbildung 38). In den Schaubildern wurden dieselben Quadrantregionen (Q1 bis Q4 bzw. Q1-2 bis Q4-2) gesetzt wie auch schon zuvor bei der Analyse von farblosen *E. coli* (Kap. 3.5.1).

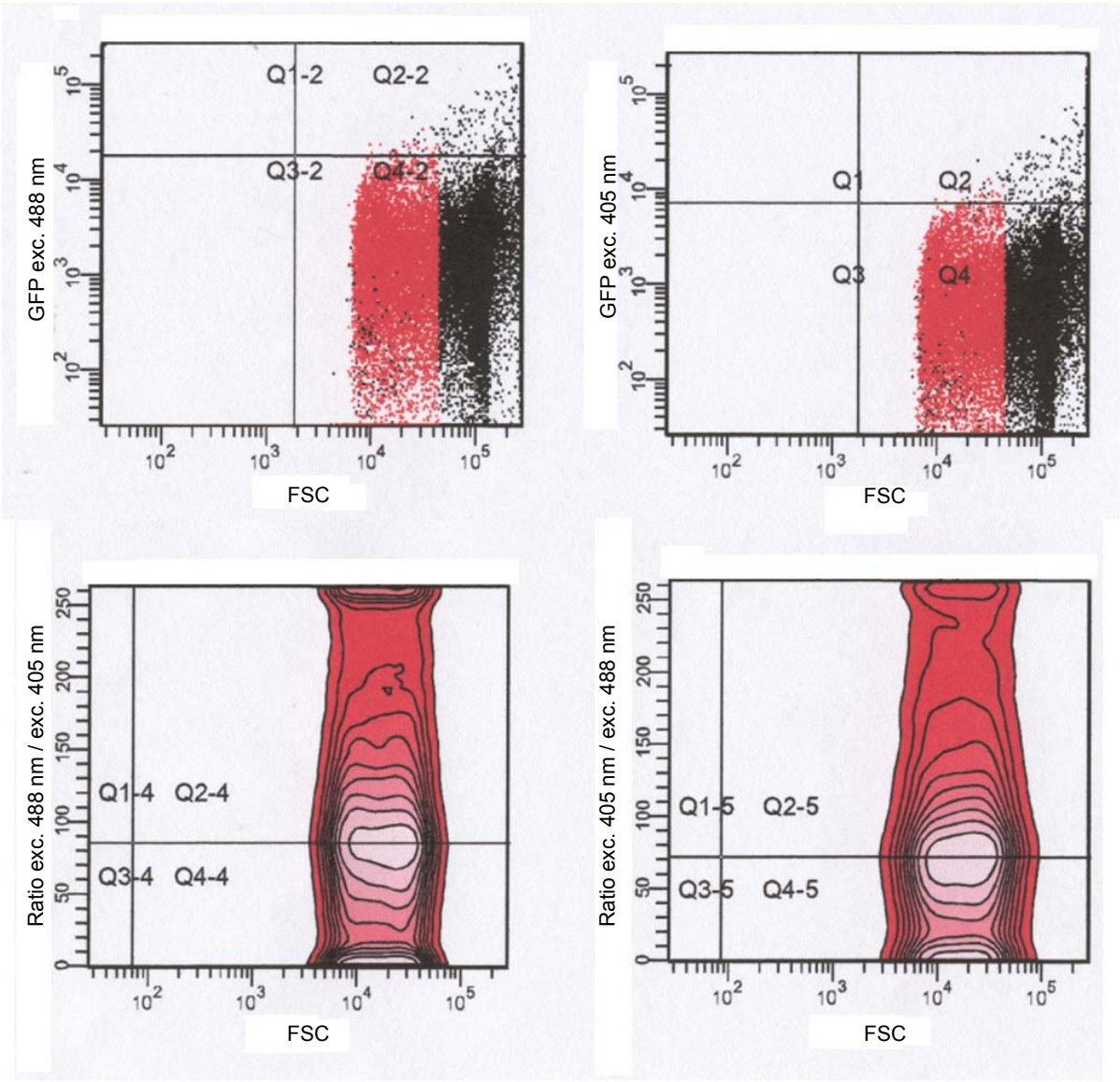


Abbildung 38: FACS-Analyse von *E.* coli Zellen mit pHluorin-Aktivität in Gegenwart von DMSO und Tributyrin

Zellpopulationen mit pHluorin-Aktivität zeigten gegenüber dem *E. coli* Wildtyp (Kap. 3.5.1, Abbildung 36) eine deutliche Verschiebungen zu höherem Fluoreszenzsignal (~10^3 bis 10^4 Fluoreszenzeinheiten) durch Anregung bei 488 nm (GFP exc. 488 nm) bzw. bei 405 nm (GFP exc. 405 nm) (Abbildung 38 oben). Des Weiteren wurden Schaubilder mit dem Fluoreszenzemissionsverhältnis gegen FSC (links unten) bzw.

dem reziproken Fluoreszenzemissionsverhältnis gegen FSC aufgenommen (rechts unten). Diese beiden Darstellungen wurden wiederum als Referenz gegenüber durch Substratumsatz hervorgerufenen Populationsverschiebungen von Zellen mit pHluorin- und Esteraseaktivität aufgenommen (Kap. 3.5.3).

3.5.3 Analyse von Zellen mit pHluorin- und Esteraseaktivität bei Substratumsatz

Um das Assaykonzept (Kap. 3.2.1) in die Durchflusszytometrie für eine mögliche Anwendung zu übertragen, wurde als Modellreaktion wie bei der Assayentwicklung im Schüttelkolben- (Kap. 3.2.2) sowie im Mikrotiterplattenformat (Kap. 3.4) die Esterase-katalysierte Hydrolyse von Tributyrin verwendet. Dazu wurden *E. coli* Zellen, die neben pHluorin auch die Esterase aus *Geobacillus stearothermophilus* (BSE) aktiv exprimierten, in Gegenwart von Tributyrin und DMSO für 45 min inkubiert und dann am Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 39).

Während es nach Anregung bei 488 nm (GFP exc. 488 nm) zu keiner nennenswerten Populationsverschiebung gegenüber der Referenz ohne Esteraseaktivität (Kap. 3.5.2, Abbildung 38) kam (Abbildung 39, oben links), zeichnete sich doch im GFP exc. 405 nm gegen FSC-*Plot* eine erkennbare Abnahme des Fluoreszenzsignals ab (Abbildung 39, oben rechts). Bei Auftragung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses (Abbildung 39, unten links) bzw. des reziproken Fluoreszenzemissionsverhältnisses gegen FSC (Abbildung 39, unten rechts) war die Änderung wesentlich deutlicher zu sehen. Die Zellen mit Esteraseaktivität zeigten gegenüber der Referenz eine signifikante Populationsverschiebung, weg von der horizontalen Begrenzungslinie der Quadrantregionen hin zu einem höheren Fluoreszenzemissionsverhältnis. Wie zu erwarten kam es zu einer gleichzeitigen Verschiebung der Zellen zu niedrigeren Werten für das reziproke Emissionsverhältnis.

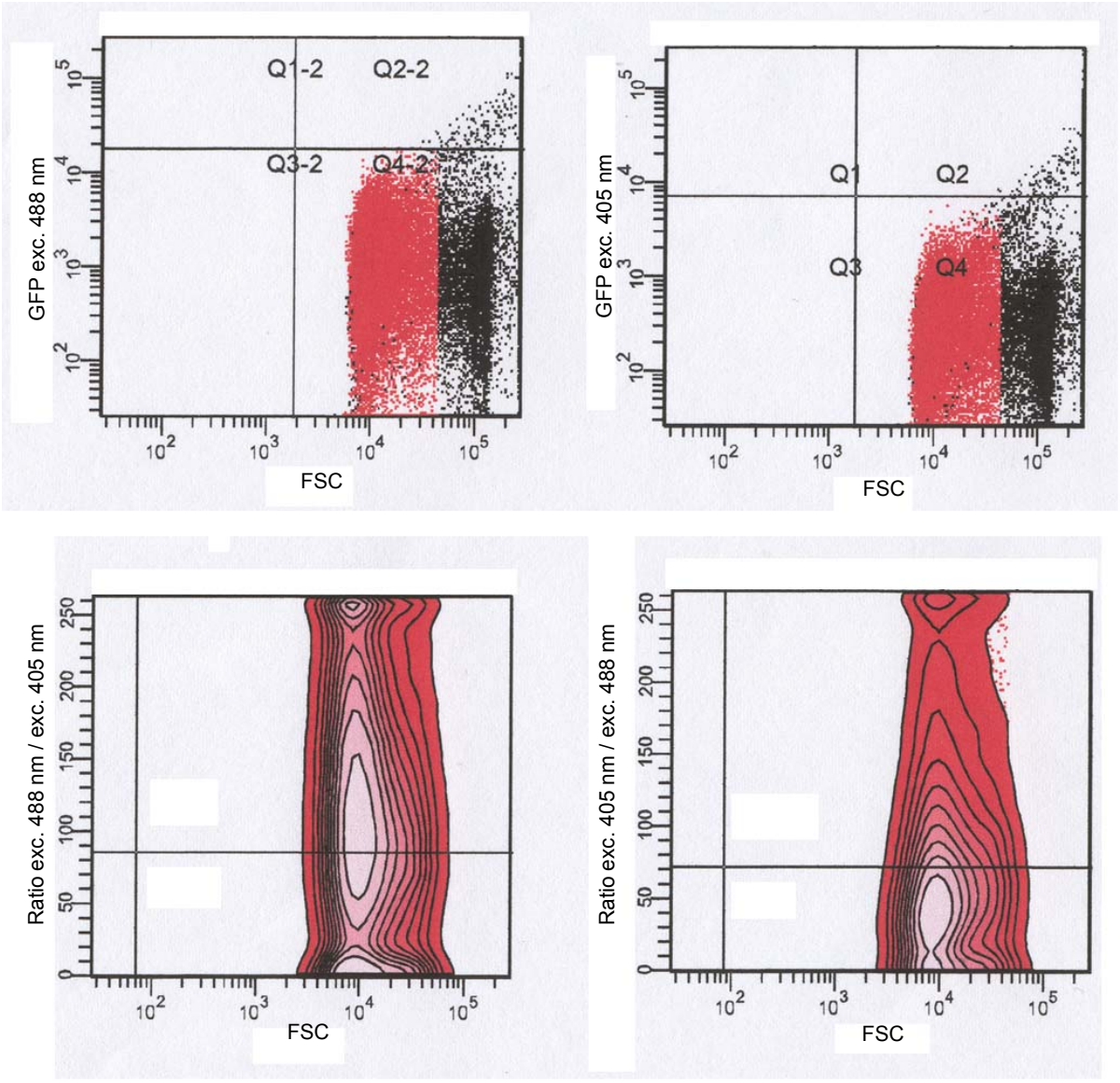


Abbildung 39: FACS-Analyse von *E.* coli Zellen mit pHluorin- und Esteraseaktivität in Gegenwart von DMSO und Tributyrin

Zusätzlich wurde der Einfluss von DMSO als Lösevermittler genauer untersucht. Abbildung 40 zeigt eine Gegenüberstellung von Referenz und Zellen mit Esteraseaktivität ohne (oben) bzw. mit DMSO (unten). In Gegenwart von DMSO fiel die Populationsverschiebung von Zellen mit Esteraseaktivität zu höherem Fluoreszenzemissionverhältnis gegenüber der Referenz wesentlich signifikanter aus.

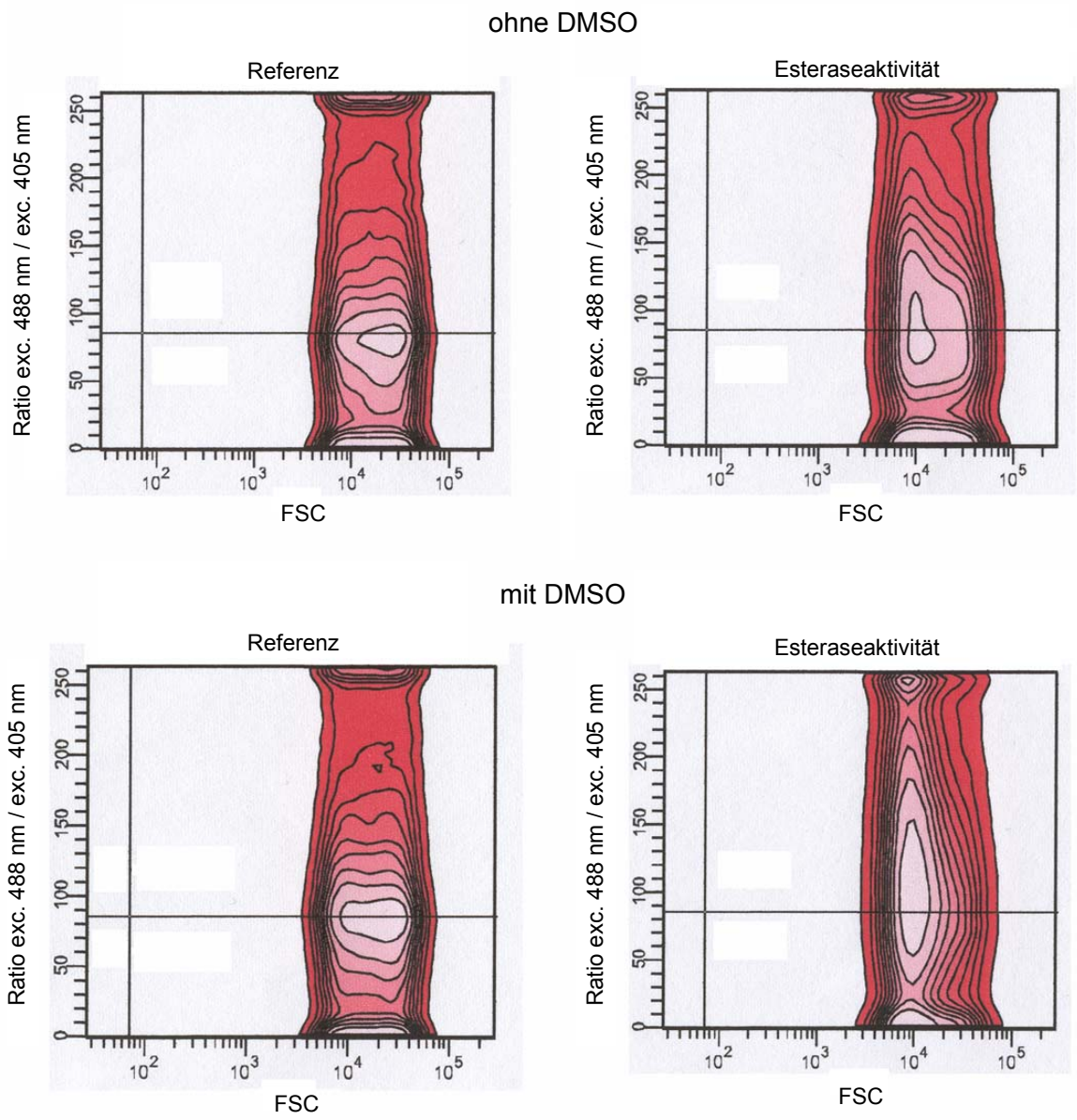


Abbildung 40: Einfluss von DMSO auf die Populationsverschiebung von Zellen mit Esteraseaktivität gegenüber der Referenz bei Hydrolyse von Tributyrin

Als finales Experiment zur Assayentwicklung für durchflusszytometrische Systeme wurden Zellen mit pHluorin- (Referenz) sowie pHluorin- und Esteraseaktivität am FACSDiVa mit einer Sortiereinheit auf Agarplatten sortiert. Allerdings hatte dieser Durchflusszytometer jedoch, im Gegensatz zu LSR II, keine geeignete Anregungsquelle für pHluorin-markierte Zellen bei 395 nm, so daß die Analyse und Sortierung über das Fluoreszenzsignal nur bei einer Anregung mit dem Argonlaser bei 488 nm möglich war. Nach erneuter Kultivierung im Mikrotiterplattenformat

wurden die Zellen in Gegenwart von Tributyrin und DMSO inkubiert und das Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ am Fluoreszenzspektrometer bestimmt.
Wie erwartet, wurde in Übereinstimmung mit den Schüttelkolbenansätzen (Kap. 3.2.3) für die Referenzzellen Werte für $R_{485/390}$ im Bereich von 1,0 bis 1,3 gegenüber Werten von 2,0 bis 2,3 für Zellen mit Esteraseaktivität erhalten.

3.6 Assayanwendung für die Gerichtete Evolution

Anhand eines Beispielproblems sollte demonstriert werden, dass das in dieser Arbeit entwickelte Nachweisverfahren erfolgreich für das *in vivo* Screening von Hydrolasebibliotheken eingesetzt werden kann. Dazu sollte mit Hilfe des pHluorin-Assays eine Mutante mit verbesserter katalytischer Aktivität gegenüber dem Wildtyp der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* bei der Hydrolyse von γ-Butyrolacton (GBL) zu γ-Hydroxybutyrat (GHB) gefunden werden. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer für Hydrolase-katalysierte Reaktionen typischen pH-Erniedrigung, die von pHluorin detektierbar sein sollte.

3.6.1 Gerichtete Evolution der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE I) mittels *error-prone* PCR

Für die Erzeugung einer Enzymbibliothek wurde die klassische Methode der gerichteten Evolution durch *error-prone* PCR (*ep*PCR) gewählt. Die Einführung von Mutationen erfolgt dabei durch Einstellung nicht-optimaler Reaktionsbedingungen im Verlauf der Amplifikation des Wildtyp- bzw. des Parentalgens (Kap. 5.8.8.3) [Vartanian et al., 1996]. Diese werden durch Verwendung eines der vier Desoxynukleotide im Unterschuss und Variation der Mangan- und Magnesiumionenkonzentration erreicht. So kann die Fehlerrate der bei der PCR eingesetzten *Taq*-DNA-Polymerase von 0,001-0,02% unter Standardbedingungen auf über 1% gesteigert werden. In Abbildung 40 ist die gewählte Strategie für die *ep*PCR aufgezeigt.

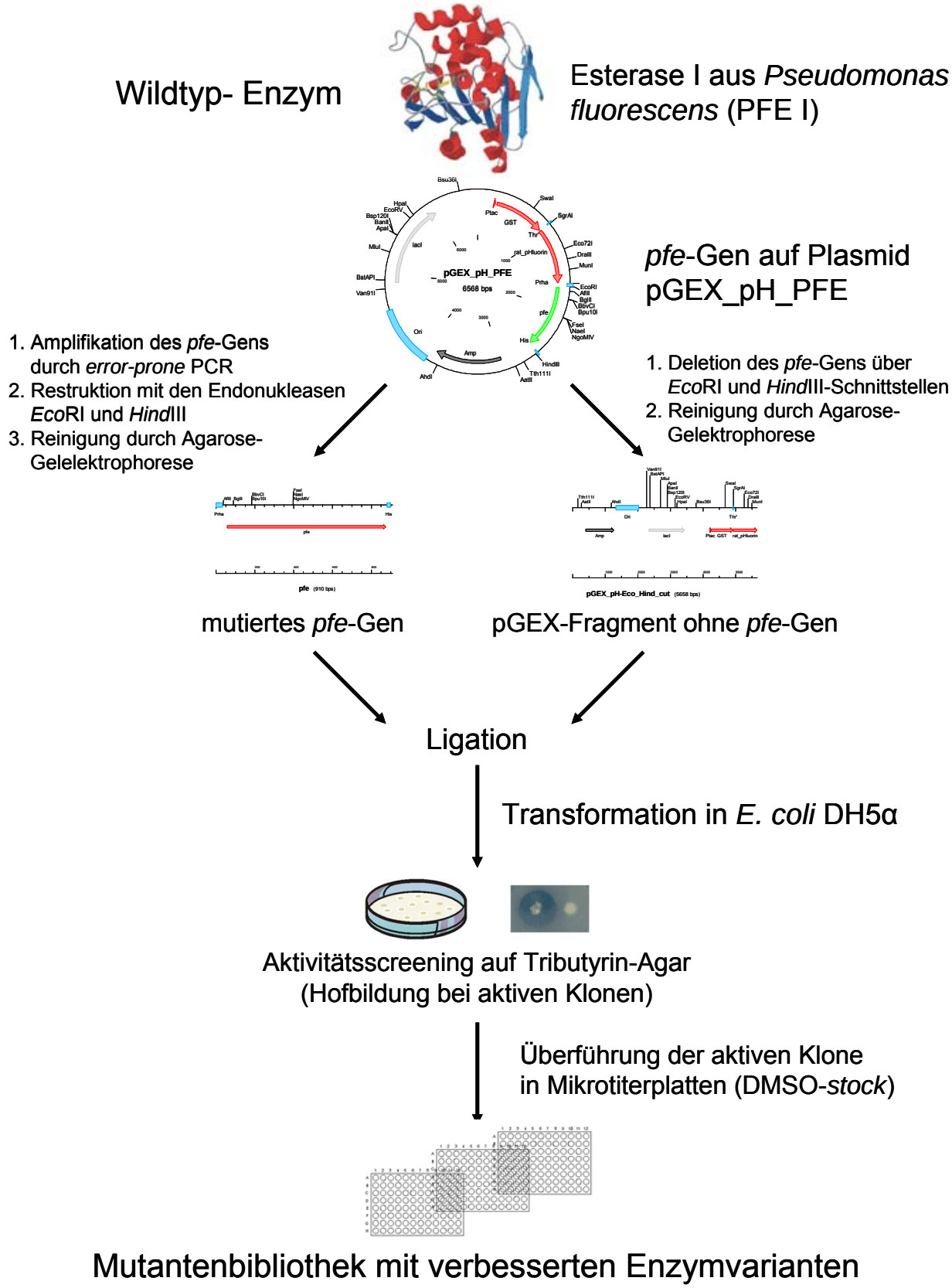


Abbildung 40: Strategie für die Erstellung einer Mutantenbibliothek durch *error-prone* PCR mit verbesserten Varianten der PFE I

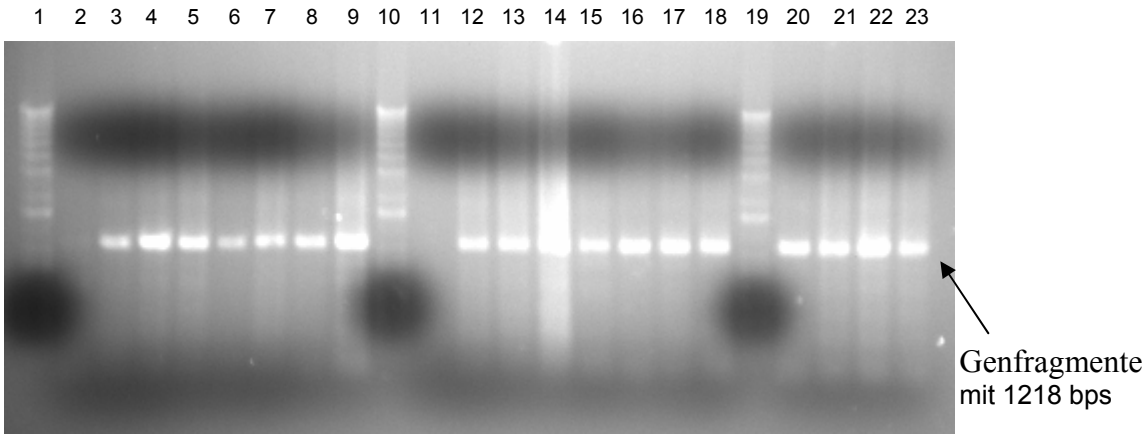
Zur Vervielfältigung des *pfe*-Gens aus dem Plasmid pGEX_pH_PFE wurden je vier parallele Ansätze (im 50 µL Maßstab) durchgeführt, bei denen jeweils ein NuKleotid im Unterschuss (Konzentrationsverhältnis von 1:5 gegenüber den anderen Nukleotiden) vorlag. Des Weiteren wurde jeder Ansatz bei fünf verschiedenen Mangan(II)-chlorid-Konzentrationen (0,0 bis 0,2 mM) und mit einer, gegenüber den Standard-*error-prone*-Bedingungen (Kap. 5.8.8.3) deutlich erhöhten Magnesiumchlorid-Konzentration durchgeführt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Zusammensetzung der *error-prone* PCR-Ansätze

Komponente (Konz.)	**Menge (Endkonzentration)**
10 x *Taq*-Puffer	5,0 µl
Primer PFE-EPf (100 µmol/µl)	0,5 µl (0,5 µM)
Primer PFE-EPr (100 µmol/µl)	0,5 µl (0,5 µM)
DNA-Matrize (0,1 µg)	1,0 µl
Desoxynukleotid-Mischung (je eines im fünfachen Unterschuss von 2:10 mM)	5,0 µl
Magnesiumchlorid (25 mM)	11,5 µl (5,75 mM)
Manganchlorid (5 mM)	0,0 bis 2,0 µl (0,0 bis 0,2 mM)
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	1,0 µl
ddH_2O	ad 50 µl

Insgesamt wurden also 25 unterschiedliche *error-prone*-PCR-Ansätze untersucht. Die Amplifikation mit den Primern PFE-EPf und PFE-EPr führte dabei zu einem Genfragment mit einer Größe von insgesamt 1218 bps (Abbildung 41).

Es zeigte sich, dass das *ep*PCR-Produkt nicht in allen Ansätzen in gleichem Umfang gebildet wurde. Im Fall von Ansatz 2 (dATP im Unterschuss ohne $MnCl_2$) sowie Ansatz 11 (ebenfalls dATP im Unterschuß und 0,05 mM $MnCl_2$) waren nahezu keine Banden nach Auftragung im Agarosegel sichtbar.



Spur 1, 10 & 19: 1 KB-*ladder* (Standard)
Spur 2 - 5: je ein Nukleotid im Unterschuss, kein $MnCl_2$
Spur 6 - 9: je ein Nukleotid im Unterschuss, 0,025 mM $MnCl_2$
Spur 11 - 14: je ein Nukleotid im Unterschuss, 0,05 mM $MnCl_2$
Spur 15 – 18: je ein Nukleotid im Unterschuss, 1,0 mM $MnCl_2$
Spur 20 – 23: je ein Nukleotid im Unterschuss, 2,0 mM $MnCl_2$

Abbildung 41: 1 %ige Agarosegelelektrophorese der durch *error-prone* PCR amplifizierten Genfragmente mit einer Größe von 1218 bps

Nach Extraktion der *ep*PCR-Produkte aus dem Agarosegel und Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *Eco*RI und *Hind*III wurden die Genfragmente (mutiertes *pfe*-Gen) wieder in das ursprüngliche Plasmid (pGEX) ligiert und in *E. coli* DH5α eingebracht (Abbildung 40). Durch Ausplattieren auf Tributyrin-Rhamnose-Agar-Platten ließ sich dabei die Hydrolaseaktivität (Aktivitäts-Screening) kontrollieren (Tabelle 9).

Tabelle 9: Transformations- und Inaktivierungsrate in Abhängigkeit der $MnCl_2$-Konzentration pro Agarplatte

$MnCl_2$-Konzentration [mM]	**Gesamtzahl an Klonen pro Agarplatte**	**Zahl an inaktiven Klonen**	**Zahl an aktiven Klonen**
0,0	278	86	192 (69 %)
0,025	243	126	117 (48 %)
0,05	206	145	61 (30 %)
0,1	231	176	55 (23 %)
0,2	151	128	23 (15 %)

Mit zunehmender Manganionenkonzentration kam es zu einer deutlichen Abnahme der Gesamtzahl an Klonen auf der Agarplatte bei gleichzeitiger Zunahme der Zahl an inaktiven Mutanten. Um eine gute Transformationsrate bei relativ hoher Mutationsfrequenz zu erreichen, wurde für die *error-prone* PCR zur Herstellung der Mutantenbibliothek eine $MnCl_2$-Konzentration von 0,05 mM mit einem Anteil an aktiven Klonen von ca. 30 % bei insgesamt 206 Transformanten gewählt. Auf diese Weise wurde eine Mutantenbibliothek von insgesamt 3200 Klonen erzeugt.
Die Mutanten wurden anschließend mit Hilfe eines Pick-Roboters in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) abgelegt (Abbildung 42).

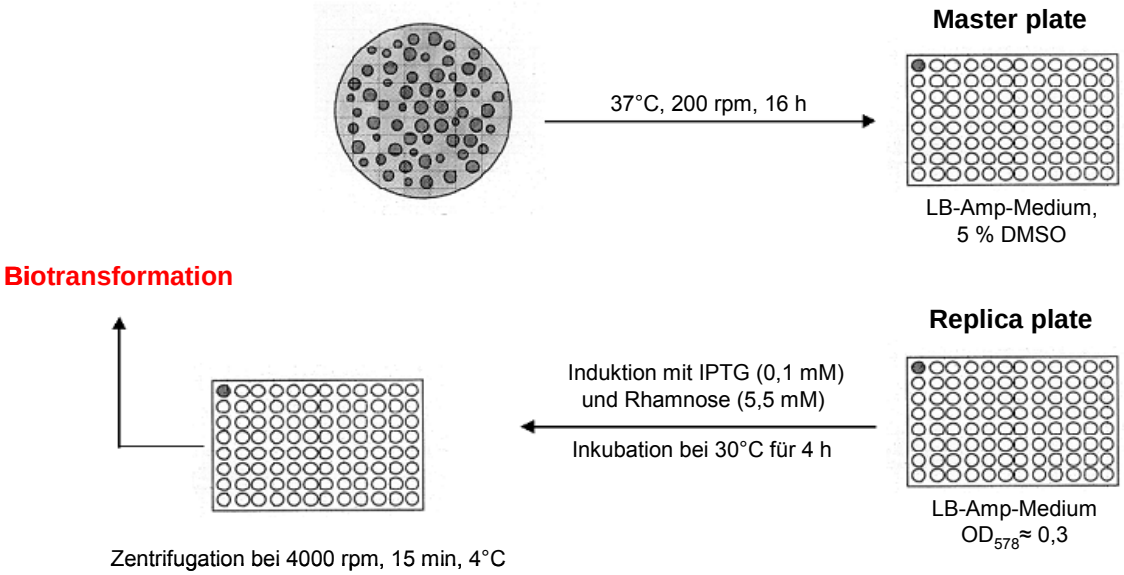


Abbildung 42: Schema zur Stammhaltung und Expression der Klone der Mutantenbibliothek

Die Stammhaltung erfolgte in sogenannten *master plates*, d.h. nach Kultivierung (37°C, 200 rpm, 16h) in einem DMSO-haltigen Flüssigmedium (LB-Amp mit 5 % DMSO; v/v) wurden die Mutanten bei –80°C eingefroren (Kap), so dass eine Lagerung über einen längeren Zeitraum möglich war. Diese Methode bietet mehrere Vorteile gegenüber der Verwendung von Glycerin-Mischungen [Henke, 2001; Mühlhardt, 2000]. *E. coli* DH5α ist in einem Flüssigmedium bis zu einer DMSO-Konzentration von 10 % (v/v) kultivierbar, wohingegen ein Zusatz von Glycerin erst nach Anzucht der Zellen bis zu einer bestimmten optischen Dichte erfolgen kann [Sambrook et al., 1989], d.h. es ist ein zusätzlicher Pipettierschritt erforderlich. Bei der Arbeit mit Mikrokulturen ist dies aber im Hinblick auf die Gefahr von

Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Die nachträgliche Zugabe einer Glycerin-Wasser-Lösung wird zudem durch die hohe Viskosität erschwert.

3.6.2 Screening der Mutantenbibliothek mit Hilfe des pHluorin-Assays

Für die Durchmusterung der Mutanten nach Enzymvarianten mit verbesserter Hydrolaseaktivität gegenüber γ-Butyrolacton wurde zunächst von den *master plates* auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen überimpft (*replica plates*), so dass für die weiteren Untersuchungen eine Kopie der Bibliothek zur Verfügung stand (Abbildung 42). Nach Anzucht der Klone (Kultivierung) im LB-Flüssigmedium (200 µL je Vertiefung) und Expression von pHluorin und PFE durch Induktion mit IPTG (0,1 mM) bzw. Rhamnose (5,5 mM) wurden die *E. coli* DH5α-Zellen zentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 15 min.) und in 250 µl Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) mit 2 % (v/v) γ-Butyrolacton und 3 % (v/v) DMSO resuspendiert (Abbildung 43). Nach Inkubation (37°C, 220 rpm, 45 min.) wurden die Ansätze in schwarze Mikrotiterplatten überführt und das Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ am Fluoreszenzspektrometer bestimmt.

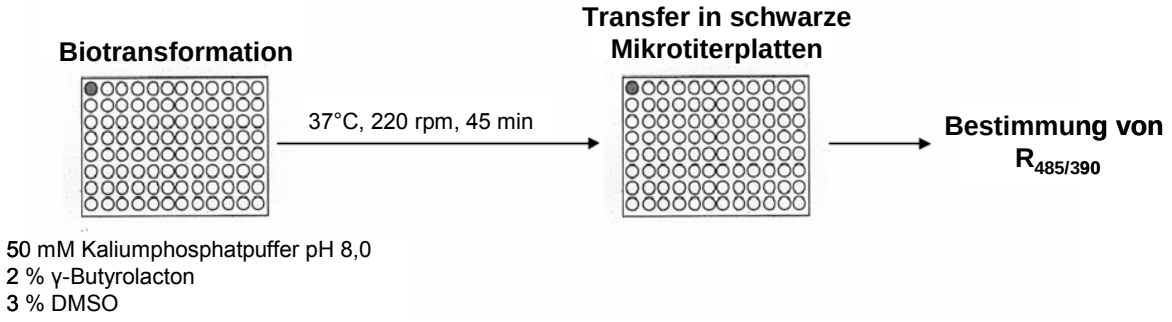


Abbildung 43: Biotransformation und Screening nach verbesserten Enzymvarianten

Insgesamt wurden 51 Klone mit größerem $R_{485/390}$-Wert (~1,1 bis 1,4) gegenüber dem Wildtyp (~1,0) gefunden (Tabelle 10). Die zwölf vielversprechendsten Klone mit $R_{485/390}$> 1,3 wurden zur näheren Charakterisierung herangezogen (Kap. 3.6.3).

Tabelle 10: Ergebnisse des Screenings einer Mutantenbibliothek von 3200 Klonen mit Hilfe des pHluorin-Assays

Bereich des Fluoreszenz-emissionsverhältnisses $R_{485/390}$	Anzahl möglicher verbesserter Klone
1,1 bis 1,2	32
1,2 bis 1,3	7
1,3 bis 1,4	9
mehr als 1,4	3

Wildtyp $R_{485/390} \approx 1,0$

3.6.3 Charakterisierung der durch das Screening erhaltenen Mutanten

Zur Charakterisierung der mit Hilfe des pHluorin-Assays ausgewählten Mutanten (Kap. 3.6.2) wurde eine erneute Kultivierung im Schüttelkolben mit 200 ml LB-Amp-Medium durchgeführt. Dabei stellten sich zwei der insgesamt zwölf Mutanten als nicht kultivierbar heraus.

3.6.3.1 Sequenzierung der Mutanten

Die verbliebenen zehn Klone, die mit dem pHluorin-Assay im Vergleich zum Wildtyp verbesserte Aktivitäten zeigten, wurden nach der Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli* mit geeigneten Primern (ssc_Hydrolase-SQF und ssc_Hydrolase-SQR) sequenziert (Tabelle 11).

Die Klone zeigten bis zu neun veränderte Positionen in ihrer Aminosäuresequenz gegenüber dem Wildtyp. Da unter den sequenzierten Klonen niemals dieselbe Mutation zweimal auftrat, konnte keine Korrelation zwischen veränderter Proteinstruktur und Aktivität der Mutanten gefunden werden

Tabelle 11: Lokalisierung der Mutationen nach Sequenzierung

Bezeichnung des Klons	Mutationsstellen und –häufigkeit gegenüber dem Wildtyp
11D4	Met96Ile, Ala161Gly, Val176Glu, Ala198Thr, Ala250Thr, Val256Glu **(6 x Mut.)**
29C3	Thr3Ala, Phe58Ser, Trp65Pro, Thr146Val **(4 x Mut.)**
29C5	Tyr13Cys, His27Arg, Asp76Gly, Leu148Gln, Lys240Glu **(5 x Mut.)**
29D1	Gln63Leu, Phe141Leu, Thr146Ala, Val172Ala, Leu181Gln, Leu185Pro, Phe228Tyr, Tyr247Cys **(8 x Mut.)**
29D5	Ser26Arg, Tyr42Cys, Arg55Cys, Tyr70Cys **(4 x Mut.)**
29D8	Phe83Cys, Asn160Asp, Lys210Met, Leu262Ser **(5 x Mut.)**
29F2	Arg56Ser, Thr197Ile, His219Leu, Ala264Thr **(4 x Mut.)**
29F5	Trp65Gly, Ser95Pro, Gly98Cys, Tyr146Asp, Val172Asp, Ser173Pro, Gln179Arg, Thr197Ala, Phe204Ser **(9 x Mut.)**
31G7	Asp207Gly **(1 x Mut.)**
32C8	Met40Val, Tyr42Phe, Tyr70Asp, Lys150Arg, Asp212Gly, Tyr247Asp **(6 x Mut.)**

3.6.3.2 Aktivitätsuntersuchungen der Mutanten

Für die Aktivitätsuntersuchungen wurden alle zehn Mutanten im Schüttelkolben kultiviert. Die Expression wurde durch den Zusatz von Rhamnose induziert.
Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt.
Die Aktivität des Zelllysats wurde mit Hilfe des pNPA-Assays bei 410 nm (Kap. 5.9.3.1) sowie am pH-Stat (Kap. 5.9.3.2) gegenüber Tributyrin und γ-Butyrolacton gemessen (Tabelle 12).
Von den insgesamt zehn in *E. coli* exprimierten Mutanten zeigten nur drei Hydrolaseaktivität. Dabei handelte es sich um die Mutanten 29C3 (4 x Mut.), 29C5 (5 x Mut.) und 31G7 (1 x Mut.). Während alle drei aktiven Klone im Vergleich zum Wildtyp gegen pNPA eine geringere Aktivität aufwiesen, zeigte der Klon 31G7 gegen Tributyrin eine um ca. 20 % erhöhte Aktivität. Bei der Mutante 29C5 konnte eine etwa um das Fünffache gesteigerte Aktivität gegen γ-Butyrolacton im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Alle anderen Mutanten zeigten dagegen keinen erhöhten Umsatz von γ-Butyrolacton.

Tabelle 12: Aktivitätsuntersuchungen der Mutanten mit dem pNPA-Assay sowie am pH-Stat gegen Tributyrin und γ-Butyrolacton (GBL)

Bezeichnung	Fluoreszenzemissions-verhältnis $R_{485/390}$	Aktivitätsuntersuchungen*		
		pNPA-Assay	Tributyrin	GBL
PFE I-Wildtyp	0,90 bis 0,95	66 U/mg	18 U/mg	0,99 U/mg
11D4	1,32	k. A.	k. A.	k. A.
29C3	1,51	13 U/mg	8,4 U/mg	k. A.
29C5	1,71	17 U/mg	5,7 U/mg	5,2 U/mg
29D1	1,30	k. A.	k. A.	k. A.
29D5	1,30	k. A.	k. A.	k. A.
29D8	1,50	k. A.	k. A.	k. A.
29F2	1,33	k. A.	k. A.	k. A.
29F5	1,34	k. A.	k. A.	k. A.
31G7	1,32	34 U/mg	24 U/mg	k. A.
32C8	1,32	k. A.	k. A.	k. A.

*k. A. = keine Aktivität

3.6.3.3 Aktivitätsuntersuchung der Mutanten mittels HPLC

Um die in Kap. 3.6.3.2 erhaltenen Ergebnisse für die Aktivitäten der Mutanten bei der Hydrolyse γ-Butyrolacton (GBL) zu γ-Hydroxybutyrat (GHB) zu bestätigen, wurden Aktivitätsuntersuchungen mittels HPLC durchgeführt. Dazu wurde eine bereits publizierte effiziente Analytik zur Bestimmung von GBL und GHB nebeneinander verwendet [Ciolino et al., 2001]. Die feste Phase bestand aus einer C18 *reversed phase* Säule, die für die Separation polarer Substanzen prädestiniert ist. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus Kaliumphosphatpuffer und Methanol im Verhältnis 95:5 eingesetzt. Die Detektion der Signale erfolgte über Absorptionsmessungen bei 215 nm.

Zunächst wurden zur Bestimmung der Retentionszeiten für die an der Reaktionslösung beteiligten Komponenten Standardlösungen aufgenommen (Abbildung 45).

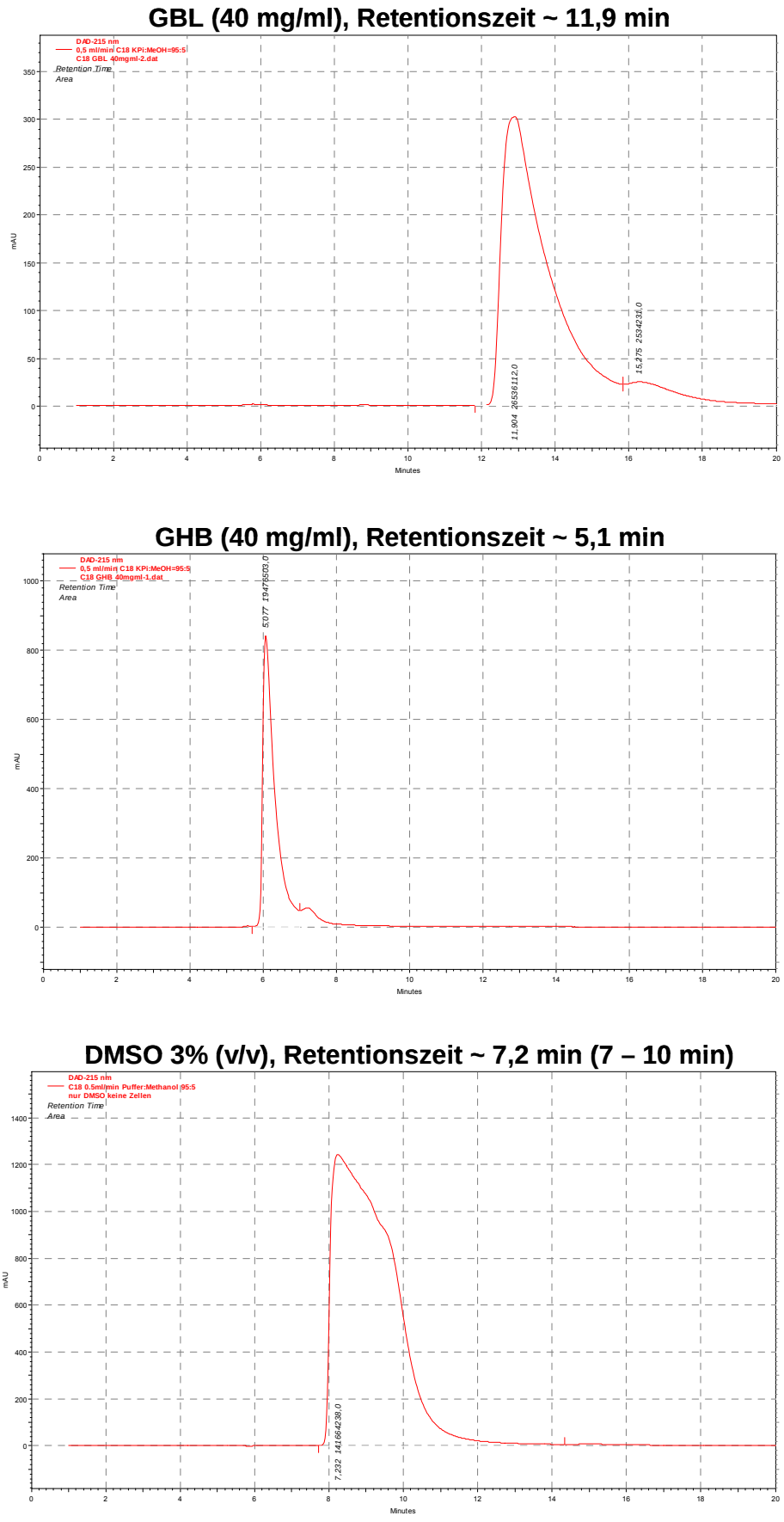


Abbildung 45: Retentionszeiten von γ-Butyrolacton (GBL), γ-Hydroxybutyrat (GHB) und DMSO

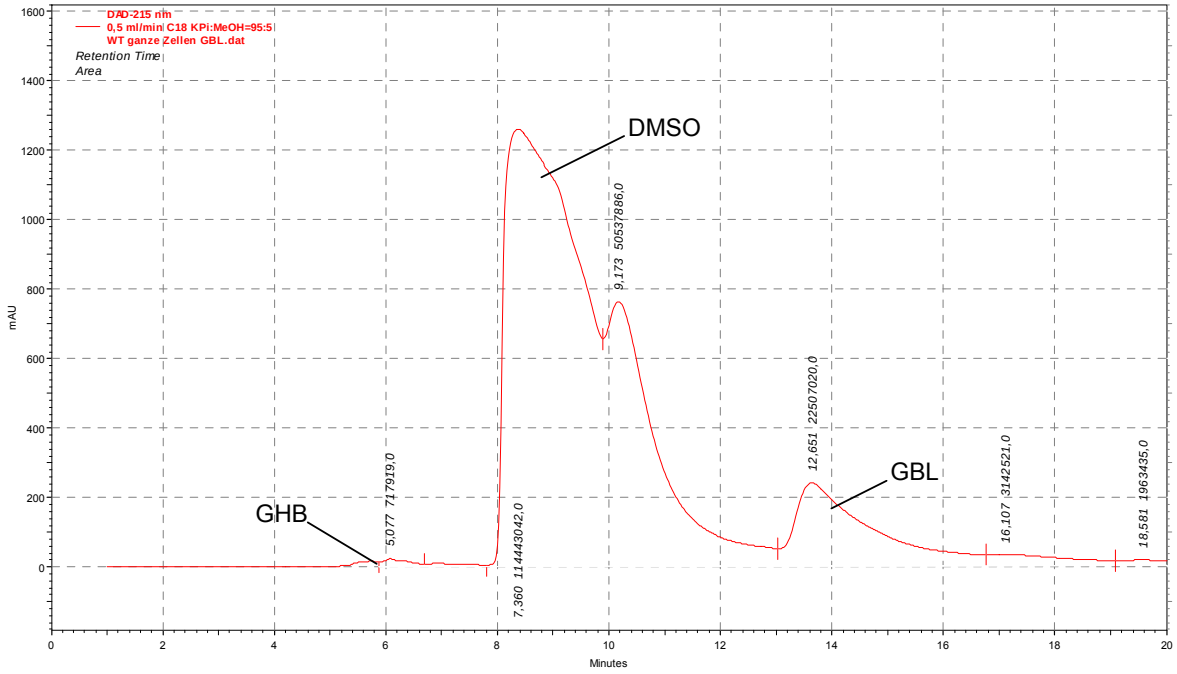
Während das Chromatogramm von GBL und GHB jeweils einen eindeutigen Peak bei einer Retentionszeit von 12,1 bzw. 5,1 min. zeigte, ergab sich im Chromatogramm von DMSO ein größerer Absorptionsbereich zwischen 7 und 10 min. Retentionszeit bei einem Maximum bei 7,2 min.

Anschließend wurden Kalibriergeraden mit Hilfe einer Konzentrationsreihe (1 bis 40 mg/ml) von Edukt (GBL) und Produkt (GHB) der Hydrolyse für eine quantitative Bestimmung erstellt.

Um nun die aktiven Mutanten auf erhöhte Aktivität gegenüber dem Wildtyp bei der Umsetzung von GBL zu GHB zu untersuchen, wurden *E. coli* DH5α-Zellen zunächst kultiviert und die Expression der Mutanten mittels Zugabe von Rhamnose gestartet. Anschließend wurden die Zellen mit Phosphatpuffer mit 2 % (v/v) γ-Butyrolacton und 3 % (v/v) DMSO für 45 min bei 37°C inkubiert, zentrifugiert und der Überstand auf die HPLC aufgetragen (Abbildung 46).

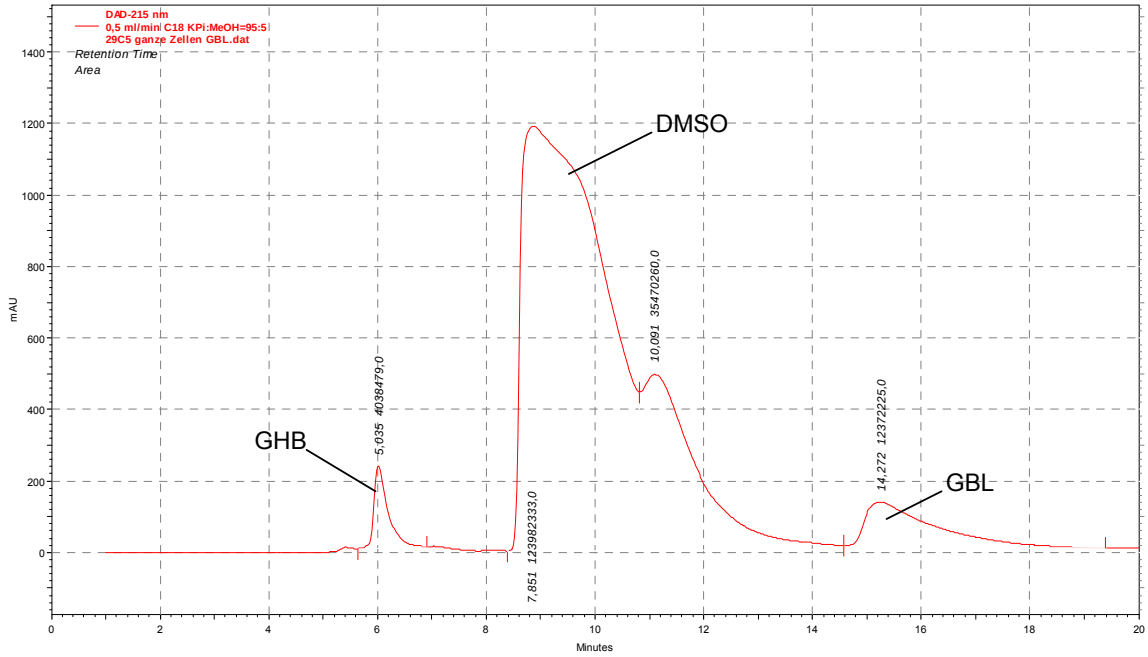
Bei Betrachtung der Chromatogramme sticht zunächst die große Fläche des DMSO-Peaks im Bereich von 7 bis 10 min. Retentionszeit hervor, daß bei 215 nm sehr stark absorbiert. Das Chromatogramm der Mutante 29C5 (unten) zeigte, im Vergleich zum Wildtyp (oben), ein von der Peakfläche her deutlich größeres Maximum bei 5,1 min, welche genau der Retentionszeit des zuvor gemessenen GHB-Standards entsprach (Abbildung 45). Insgesamt konnte bei der Mutante eine ca. 5,6-fach höhere Umsatzrate von GHB zu GBL. Auch die Fläche des GBL-Peaks war um ca. 45 % kleiner als im Chromatogramm des Wildtyps, was auf einen deutlich höheren GBL-Umsatz schließen lässt. Stabilitätsuntersuchungen zeigten jedoch, dass die Lagerung bei 4°C über Nacht bereits zu einer totalen Inaktivierung der Mutante führte.

PFE I Wildtyp



GHB (Produkt): 717919 mAU (0,53 mg)
GBL (Substrat): 22507020 mAU

Mutante 29C5



GHB (Produkt): 4038479 mAU (2,98 mg)
GBL (Substrat): 12372225 mAU

Abbildung 46: Vergleich der Chromatogramme bei der Hydrolyse von GBL katalysiert durch den PFE I-Wildtyp (oben) und die Mutante 29C5 (unten)

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung eines *in vivo* Assays, welcher vor allem im Hochdurchsatz-Screening von Mutantenbibliotheken Anwendung finden sollte.

Eine möglichst einfache Handhabung in Kombination mit einem möglichst hohen Durchsatz ist essentiell für ein solches Nachweissystem. Neben dem Nachweis von hydrolytischer Aktivität unter Ausbildung von Chromophoren, die mittels Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen detektiert werden können, beruhen viele Assays auch auf der Bestimmung von pH-Änderungen mit speziellen Indikatoren [Copeland et al., 1999; Henke et al., 2003; Klein et al., 1999; Kouker et al., 1987]. Des Weiteren können neben organischen Indikatoren auch Proteine als pH-Sensoren eingesetzt werden. So wurde ein Assay für den *in vitro* Nachweis von β-Lactamasen vorgestellt, bei dem die während der enzymatischen Substratspaltung auftretende pH-Änderung mit Hilfe von Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) detektiert wurde [Puckett et al., 2002]. Dabei wurde EGFP mit den untersuchten β-Lactamasen fusioniert. Dieses äußerst sensitive Verfahren wurde für die Bestimmung von Substraten für β-Lactamasen entwickelt. Allerdings ist die Probenvorbereitung inklusive einiger Aufarbeitungsschritte wie mehrfaches Zentrifugieren, Waschen und Zellaufschluss sehr aufwendig.

Die größte Herausforderung bei der Assayentwicklung ist zweifelsohne das Erreichen eines möglichst hohen Durchsatzes bei der Durchmusterung von Mutantenbibliotheken. Eine deutliche Verbesserung brachte die Verwendung der Kapillarelektrophorese mit sich [Reetz et al., 2000b]. Dieses Verfahren führte zu einer Steigerung von ca. 30000 Bestimmungen pro Tag gegenüber den oben bereits erwähnten Standardmethoden, die mit Hilfe eines Pick- und Pipettierroboters bestenfalls einen Durchsatz von 1000 Enzymvarianten pro Tag erlauben. Ein moderner Durchflusszytometer mit einer Sortiereinheit ist in der Lage, im Schnitt bis zu 50000 Zellen pro Sekunde zu analysieren und mit hoher Selektivität zu sortieren. In Kombination mit einem äußerst sensitiven Assay kann ein Durchflusszytometer ein sehr effizientes Screeningsystem mit extrem hohem Durchsatz sein. Aufgrund des hohen Anschaffungspreises eines solchen Systems sind bisher jedoch nur wenige FACS (*Fluorescent-Activated Cell-Sorting*)-Assays bekannt. Eine dieser Screeningmethoden für die Gerichtete Evolution der *E. coli*-Oberflächenprotease

ompT beruht auf dem Prinzip des *fluorescence resonsance energy transfer* (FRET) [Olsen et al., 2003]. Dieser Assay ist jedoch in seiner Enzym- und Substratspezifität stark limitiert.

Im Vergleich zu den bereits publizierten Methoden zeigt der in dieser Arbeit entwickelte *in vivo* Assay eine wesentlich höhere Flexibilität in der Enzym- und Substratauswahl und kann neben dem konventionellen Screening im Mikrotiterplattenformat auch mit den Vorteilen der Durchflusszytometrie für einen extrem hohen Durchsatz kombiniert werden.

Die Detektion der bei Hydrolase-katalysierten Substratspaltungen auftretenden intrazellulären pH-Verschiebungen erfolgte mit Hilfe von ratiometrischem pHluorin, einer pH-sensitiven Mutante von GFP [Miesenbock et al., 1998]. pHluorin besitzt im Gegensatz zu GFP zwei Anregungspeaks bei 395 bzw. 475 nm mit einer maximalen Fluoreszenzemission bei 508 nm, deren Maxima sich gegensätzlich zueinander im Bereich von pH 5,5 bis 8,0 in Abhängigkeit vom pH-Wert verändern. Das Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{475/395}$ aus beiden Maxima ist direkt proportional zum Ausmaß der pH-Änderung bei einer hydrolytischen Substratspaltung. Im Gegensatz zu EGFP - dessen pH-Sensitivität auf der Auslöschung seiner Fluoreszenzaktivität bei abnehmendem pH beruht - besitzt pHluorin durch die Bestimmung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses den Vorteil der Unabhängigkeit von seinem Expressionslevel und damit von seiner Fluoreszenzaktivität bei der Detektion von pH-Verschiebungen.

4.1 Assay-Entwicklung

Die Entwicklung eines intrazellulären Nachweissystems, welches auf einer Detektion von pH-Änderungen beruht, ist aus mehreren Gründen schwierig. Bei Bakterienzellen handelt es sich um komplexe lebende Organismen, die jeglicher Form von negativen äußeren und inneren Einflüssen entgegenwirken, um ihr Überleben zu sichern. So enthalten auch *E. coli* Zellen unter anderem mehrere effektive pH-Homöostasesysteme, die, beispielsweise durch hydrolytische Substratspaltung, hervorgerufene pH-Änderungen auszugleichen versuchen, um ihr „inneres pH-Gleichgewicht“ zu erreichen [Kroll et al., 1983; Nakamura et al., 1982].

Obwohl die Anwendbarkeit von pHluorin als pH-Sensor bisher nur in Neuronen untersucht worden war [Miesenbock et al., 1998], konnte anhand der Zunahme des Fluoreszenzemissionsverhältnisses bei abnehmendem pH demonstriert werden, dass pHluorin in der Lage ist, auch in *E. coli* pH-Änderungen zu detektieren. Diese Beobachtungen widersprachen den bereits erwähnten Studien über das Einwirken verschiedener Homöostasemechanismen auf hervorgerufene intrazelluläre pH-Änderungen.

Die Bestimmung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses erfolgte am Fluoreszenzspektrometer bei den beiden Anregungswellenlängen von 390 bzw. 485 nm. Trotz dieser Abweichung von den Anregungsmaxima von pHluorin bei 395 nm bzw. 475 nm (Kap. 1.3.5) waren die Unterschiede der $R_{485/390}$-Werte von *E. coli* DH5α Zellen mit aktiv exprimiertem pHluorin bei verschiedenen pH-Werten dennoch ausreichend groß.

Das Ausmaß der durch Hydrolase-katalysierte Substratspaltungen hervorgerufenen pH-Änderungen ist an verschiedene Bedingungen geknüpft. Zunächst einmal muss das zu untersuchende Substrat in der Lage sein, die *E. coli* Zellmembran in ausreichender Konzentration zu durchdringen. Da biologische Membranen eine hohe Hydrophobizität aufweisen, könnte eine Anwendung des Assays bei Einsatz hydrophiler oder geladener Substrate erschwert werden [Al-Awqati, 1999]. Eine Möglichkeit zur Umgehung dieses Problems ist der Einsatz von Lösevermittlern wie beispielsweise DMSO, die neben einer Erhöhung der Löslichkeit hydrophober Substrate in wässrigen Lösungen auch die Durchlässigkeit der Zellmembran für Substratmoleküle unterstützen, ohne eine Lyse der Zellen hervorzurufen [Brayton, 1986].

Ebenfalls von großer Bedeutung für pH-Änderungen sind die Expressionsrate sowie die Aktivität einer Hydrolase gegenüber den untersuchten Substraten. *In vitro* Messungen am pH-Stat zeigten eine eindeutige Korrelation zwischen der Hydrolaseaktivität gegenüber verschiedenen getesteten Substraten und dem Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ der Zellen. Nur in Gegenwart von Tributyrin oder Methylcaproat, denen gegenüber die Esterase aus *Geobacillus stearothermophilus* eine hohe hydrolytische Aktivität aufweist, zeigte sich eine deutliche Zunahme von $R_{485/390}$ gegenüber der Referenz.

Auch die Säurestärke der bei der Hydrolyse freigesetzten Reaktionsprodukte beeinflusst das Ausmaß von pH-Verschiebungen in der Zelle. Bei der Hydrolyse von

Estern kommt es zur Freisetzung zweier acider Komponenten (Carboxylsäure und Alkohol). So zeigten Zellen bei der Hydrolyse von Tributyrin in Abhängigkeit von der Esteraseaktivität ein relativ großes Fluoreszenzemissionsverhältnis im Vergleich zur Referenz. Als Extrembeispiel erwies sich jedoch die hydrolytische Umsetzung von Phenylacetat. Die hierbei gebildete Essigsäure sorgte für eine totale Auslöschung der Fluoreszenz von pHluorin. Eine Erhaltung der Fluoreszenzaktivität konnte nur durch erhöhte Pufferung im Reaktionsmedium gewährleistet werden. Diese Indizien sprechen dafür, dass durch die kontinuierliche Essigsäureproduktion bei der Hydrolyse der intrazelluläre pH_i unter die Stabilitätsgrenze von pHluorin fiel (< 5,0). Durch erhöhte Pufferkonzentrationen konnte diese extrem große pH-Verschiebung gemindert werden, allerdings nur in Verbindung mit einer gleichzeitigen Abnahme des Fluoreszenzemissionsverhältnisses.

Bei Amidspaltungen dagegen kommt es neben der Bildung einer Carboxylsäure auch zur Freisetzung von Aminen, die als basische Komponente einer pH-Verschiebung in den sauren Bereich entgegenwirkt. Dadurch fiel auch das Fluoreszenzemissionsverhältnis von Zellen mit aktiv exprimierter *p*-Nitrobenzylesterase, die Amidspaltungen katalysieren kann, gegenüber der Referenz deutlich kleiner aus. Die Anwendung des pHluorin-Assays für die Detektion einer pH-Zunahme bei Hydrolase-katalysierten Reaktionen konnte durch einen Reaktionsstart bei pH 6,0 nachgewiesen werden.

Diese Beispiele zeigen, neben der äußerst hohen Sensitivität zur Detektion von relativ kleinen pH-Änderungen, dass der Assay nicht nur auf Esterhydrolysen beschränkt ist, sondern auch auf sämtliche hydrolytischen Reaktionen mit ausreichend großen pH-Verschiebungen in den sauren wie auch in den alkalischen Bereich anwendbar ist. Auch die Erweiterung der Nachweismethode auf andere Hydrolasen konnte mit Hilfe der Hydantoinase-katalysierten Spaltung von Hydantoin demonstriert werden.

Bei Anwendung des pHluorin-Assays muss die Limitierung auf Substrate, die nicht von *E. coli* Zellen umgesetzt werden, berücksichtigt werden. Obwohl ε-Caprolacton durch BSE äußerst schlecht umgesetzt wird [Henke et al., 2002], zeigte bereits die Referenz ohne Esteraseaktivität ein ungewöhnlich hohes Fluoreszenzemissionsverhältnis. Vermutlich wird das ε-Caprolacton bereits von einer Gluconolactonase zu 6-Hydroxycapronsäure hydrolysiert, deren eigentliche Aufgabe

die Umsetzung des als Zwischenprodukt im Pentosephosphatweg auftauchenden 6-Phosphogluconolactons zu 6-Phosphogluconat ist [Hucho et al., 1972].
Eine eher untergeordnete Rolle bei intrazellulären pH-Änderungen spielte dagegen die Autohydrolyse der Substrate selbst, die das Fluoreszenzemissionsverhältnis nur minimal beeinflusste.

4.2 Möglichkeiten einer Assay-Applikation in der Durchflusszytometrie

Um die Anwendbarkeit des pHluorin-Assays in der Durchflusszytometrie zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Experimente am LSR II (ein reines Analysesystem) durchgeführt. Wie schon beim Fluoreszenzspektrometer stimmten die Wellenlängen der Anregungsquellen sowie der Detektionsfilter für die Fluoreszenzemission nicht optimal mit den Maxima von pHluorin (Anregungsmaxima bei 475 bzw. 395 nm mit maximaler Fluoreszenzemission bei 508 nm) überein. Dennoch waren die Populationsverschiebungen der Zellen bei unterschiedlichen pH-Werten, sowie den Zellen mit Esteraseaktivität in Gegenwart von Substrat gegenüber der Referenz deutlich zu erkennen.
In den *GFP excited blue* gegen FSC- bzw. *GFP excited violet* gegen FSC-*Plots* zeigten Zellpopulationen, in denen pHluorin aktiv exprimiert worden war, auch am Durchflusszytometer eine deutlich höhere Fluoreszenzaktivität gegenüber dem *E. coli* DH5α-Wildtyp. Die breite Streuung der Zellpopulationen zeigte, dass pHluorin nicht in allen Zellen auf einem gleich hohen Expressionslevel vorlag. Somit konnte die viel höhere Messgenauigkeit des Durchflusszytometers gegenüber traditionellen Analysetechniken wie z. B. einem Fluoreszenzspektrometer demonstriert werden, der für die Fluoreszenzaktivität lediglich Mittelwerte angeben kann [Rieseberg et al., 2001].
In Übereinstimmung mit den Schüttelkolbenexperimenten wurde auch am Durchflusszytometer das Verhalten von Zellen mit pHluorin-Aktivität bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Sowohl bei Auftragung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses (Ratio exc. 488 nm/exc. 405 nm) bzw. reziproken Fluoreszenzmissionsverhältnisses gegen FSC im *Density Plot* war bei Abnahme von

pH 8,0 bis 6,0 eine deutliche Populationsverschiebung der Region mit der höchsten Zelldichte zu höheren bzw. niedrigeren $R_{488/405}$-Werten zu beobachten.

Auch Zellen mit pHluorin- und Esteraseaktivität zeigten bei Substratumsatz sichtbare Verschiebungen zu höherem Fluoreszenzemissionsverhältnis gegenüber den Referenzzellen ohne Esteraseaktivität. Wie zu erwarten verstärkte DMSO als Lösevermittler diese Populationswanderungen bei Esterase-produzierenden Zellen durch seine membranaufweitenden Eigenschaften für eine verbesserte Permeabilität der Zellmembran gegenüber Substratmolekülen [Brayton, 1986]. Auffallend war bei Betrachtung der einzelnen Fluoreszenzsignale, dass das Ausmaß der Populationsverschiebungen bei Anregung mit 405 nm gegenüber der Referenz wesentlich größer ausfiel als bei Anregung mit 488 nm.

Eine Sortierung von Zellen mit Esteraseaktivität nach dem Fluoreszenzemissionsverhältnis erwies sich jedoch als äußerst schwierig. Das FACSDiVa mit Sortierfunktion hatte im Gegensatz zum LSR II keine violette Laserdiode für eine Anregung bei 405 nm. Bei Untersuchungen mit dem vorhanden UV-Laser (350 nm) zeigten Zellen mit pHluorin-Aktivität ebenso wie der *E. coli* Wildtyp keine Fluoreszenzsignale. Es ist davon auszugehen, dass die maximale Anregung des UV-Lasers zu stark vom Anregungsmaximum von pHluorin bei 395 nm abweicht. Daher konnten die Zellen nur nach einer (bei 488 nm) der beiden Anregungswellenlängen unterschieden werden. Da jedoch - wie oben bereits erwähnt – bei Anregung mit 488 nm kaum Unterschiede der Zellen mit Esteraseaktivität gegenüber der Referenz detektierbar waren, konnten Sortierexperimente von Mischkulturen aus esterase-porduzierenden- und Referenzzellen bei Substratumsatz ohne das Sortierkriterium des Fluoreszenzemissionsverhältnisses nicht durchgeführt werden.

Sortierexperimente wurden daher nur von Zellen mit bzw. ohne Esteraseaktivität in separaten Kulturen durchgeführt, um die Kultivierbarkeit sowie die $R_{485/390}$-Werte der sortierten Zellen am Fluoreszenzspektrometer zu untersuchen. Im Gegensatz zu LB-Amp-Agarplatten erwies sich eine Einzelzellsortierung direkt in Mikrotiterplatten (LB-Amp-DMSO-Medium) als schwierig, da die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Kultivierung nur bei ca. 20 % lag. Um eine hundertprozentige Kultivierbarkeit zu gewährleisten, waren Sortierungen von mindestens 50 Zellen pro Vertiefung notwendig. Nach erneuter Kultivierung der sortierten Zellen mit Esteraseaktivität im Mikrotiterplattenformat zeigte $R_{485/390}$ am Fluoreszenzspektrometer nach Inkubation

in Gegenwart von Tributyrin wiederum Werte von 2,0 bis 2,3, während bei den Referenzzellen Werte zwischen 1,0 und 1,3 detektiert wurden.
Insgesamt konnte die Anwendbarkeit des pHluorin-Assays am Durchflusszytometer anhand der durchgeführten Analysen aufgezeigt werden. Allerdings ist eine hinreichende Assay-Validierung nur bei Einsatz des Fluoreszenzemissionsverhältnisses $R_{488/405}$ als Kriterium für die Einzelzellsortierung möglich.

4.3 Assayanwendung für die Gerichtete Evolution

Nach der Validierung des pHluorin-Assays wurde versucht, eine Mutantenbibliothek der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE), die durch *error-prone* PCR erzeugt wurde, nach verbesserten Enzymvarianten für die hydrolytische Umsetzung von γ-Butyrolacton (GBL) zu γ-Hydroxybutyrat (GHB) zu durchmustern.
Bei der *error-prone* PCR wird der Zeitraum der Evolution von Millionen von Jahren auf Wochen oder Monate verkürzt. Das Prinzip ist jedoch dasselbe: auftretende Mutationen verändern die Eigenschaften von Biomolekülen; diejenigen, die den Anforderungen am Besten angepasst sind, werden durch ein entsprechendes Screening selektiert. Für die gerichtete Evolution von Biomolekülen gilt daher das Gesetz: „*You only get what you screen for*" [Arnold, 1997]. Wichtige Vorteile dieser Methode sind eine schnelle und einfache Durchführbarkeit, Flexibilität in der Einstellung der Mutationsraten sowie die Beschränkung auf einen definierten Genabschnitt. Nachteilig sind dagegen die durch Zunahme der Mg^{2+} und Mn^{2+}-Konzentration abnehmende Ligationseffizienz und der statistische Austausch der Nukleotide [Beckman et al., 1985; Bornscheuer, 1998]. Um ein optimales Mutationsrate-Transformationseffizienz-Verhältnis zu erreichen, wurde die *error-prone* PCR bei einer Mn^{2+}-Konzentration von 0,05 mM durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurde eine Mutantenbibliothek mit insgesamt 3200 Klonen erstellt.
Durch Einsatz des pHluorin-Assays wurden aus dieser Mutantenbibliothek insgesamt zwölf Klone mit deutlich erhöhtem Fluoreszenzemissionsverhältnis $R_{485/390}$ gegenüber dem Wildtyp selektiert. Nach Sequenzierung konnte bei den Klonen eine relativ hohe Mutationshäufigkeit von bis zu neun Punktmutationen nachgewiesen werden. Nach Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab und Zellaufschluss zeigte sich

bei Aktivierungsuntersuchungen mit dem pNPA-Assay sowie am pH-Stat, dass nur drei der insgesamt zwölf Klone aktiv exprimiert worden waren. Dies könnte möglicherweise in den zu hoch eingestellten Mutationsbedingungen bei der *error-prone* PCR begründet sein.

Eine dieser drei Mutanten zeigte nach Aktivitätsuntersuchungen am pH-Stat sowie der HPLC eine ca. 5,6-fache Aktivitätssteigerung bei der Hydrolyse von GBL gegenüber dem Wildtyp. Durch weitere Mutationszyklen der selektierten Mutante könnte die hydrolytische Aktivität gegenüber GBL möglicherweise noch weiter erhöht werden. Die Einführung weiterer Mutationen würde mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer noch weiter gesteigerten Instabilität der Mutante führen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das entwickelte Assay-System zur Identifizierung von aktiven Biokatalysatoren beim Screening von Mutantenbibliotheken geeignet ist.

Für das Screening im Mikrotiterplattenformat mit 96 Vertiefungen konnte von der Kultivierung der Klone über die Koexpression bis hin zur Bestimmung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses ein Durchsatz von 768 Klonen pro Tag erreicht werden. Eine Steigerung der Durchsatzrate um das Vierfache wäre durch Einsatz von Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen möglich. Bei erfolgreicher Assayetablierung in der Durchflusszytometrie, mit der eine Analyse von 50000 Zellen pro Sekunde und Sortierung der „besten“ Klone in Mikrotiterplattenformat möglich wäre, ließe sich der Durchsatz sogar auf das Screening riesiger Enzymbibliotheken mit 10^6-10^8 Enzymvarianten pro Tag ausdehnen.

5. Material und Methoden

5.1 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Lösungsmittel:	
Ethanol 98 %, Glycerin, Aceton, Toluol	Riedel-de Haen, Seelze
Ethanol 96 % (vergält), Aceton (technische Reinheit)	Brenntag, Mühlheim/Ruhr
Feinchemikalien:	
Agar, Bromphenolblau, Butylacetat, γ-Butyrolacton, Calciumchlorid, Coomassie Brilliant Blue, ε-Caprolacton, Chloramphenicol, Diethylether, Dimethylsulfoxid, Dinatriumhydrogenphosphat, Ethylendiamintetraacetat (Natrium-Salz), Ethidiumbromid, Gum arabic, Kaliumchlorid, Kaliumacetat, Kaliumhydroxid, Kanamycinsulfat, Methylbutyrat, Methylcaproat, Methylcaprylat, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Manganchlorid, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Natriumsulfat, p-Nitrophenylacetat (pNPA), Polyethylenglycol 6000, Phenylacetat, Propylbutyrat, Rubidiumchlorid, L-(+)-Rhamnose Monohydrat, Salzsäure (37 %), Tetracyclin, Tributyrin, Tricaprylin, Tween 20	Fluka, Buchs (Ch)
Agarose, Ampicillin (Natrium-Salz), Hefeextrakt, Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %) für SDS-PAGE, Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (40 %) für Sequenzierungen, Spectinomycin, Trypton/Pepton aus Casein	Roth GmbH, Karlsruhe
Hydantoin, GenElute-Kits für Plasmid Mini Preparation, PCR-Aufreinigung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
N-(1-p-tolylethyl) octylamid	Bayer, Monheim
dNTP (100 mM), 1kb-Ladder (Agarosegel-Standard)	Gibco BRL, Karlsruhe
Oligonukleotide	Sigma-Genosys, Darmstadt Invitrogen, Karlsruhe
BCA-Kit zur Proteinbestimmung	Pierce, Baoud-Beijerland (NL)
Plasmid Midi-Kit, Plasmid Mini-Kit, Gelextraktions-Kit	QIAgen, Hilden

Tabelle 14: Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
Restriktionsendnucleasen:	
*Eco*RI (10 U/µl), *Hind*III (10 U/µl), *Xba*I (10 U/µl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
*Dpn*I (20 U/µl)	New England Biolabs, Frankfurt
DNA/RNA-manipulierende Enzyme:	
T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-DNA-Polymerase (1 U/µl)	Promega, Madison (USA)
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	Eppendorf, Köln
DNAse I	Fluka, Buchs (Ch)
RNAse A	QIAgen, Hilden

5.2 Geräte

Tabelle 15: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese:	
DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell, Mini Sub Cell GT, Power Pac 3000, Power Pac 300, Modell 200/2.0 Power Supply	BioRad, München
Intelligent Dark Box	Fuji Film, Düsseldorf
Monitor	Hitachi, München
UV-Leuchttisch	MWG Biotech, Ebersberg
Brutschrank:	
WTE	Binder, Tuttlingen
DNA-Sequenzierung:	
ABI PRISM 373 A DNA Sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Macintosh Quadra 650	Apple, München
Durchflusszytometrie:	
FACSScan, FACSDiVa, LSR II	BD Bioscience, Heidelberg
Homogenisator:	
Ultra Turrax T25 mit Dispergierstab S25N-25F	Janke & Kunkel, Staufen

Gerät	Hersteller
HPLC:	
LC-10AT Liquid Chromatograph , FCV-10AL, DGU-14A Degasser, SPD-M10A Diode Array Detector, SCL-10A System Controller, RF-10A Fluorescence Detector	Shimadzu, Duisburg
Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 µm Säule	Trentec, Gerlingen
Inkubatoren:	
HAT-Schüttelinkubator	Infors, Bottmingen (CH)
Mikrowelle:	
Micro-Chef FM A935	Moulinex, Solingen
PCR-Geräte:	
Master Cycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter:	
pH-Meter 620	Metrohm, Herisau (CH)
pH-Stat:	
Impulsomat 614, pH-Meter 620, Dosimat 665, thermostatierbare Rührzelle	Metrohm, Herisau (CH)
Kryostat C1	Haake, Karlsruhe
Flachschreiber	Linseis, Selb
Photometer:	
UV/VIS-Spektrometer Ultrospec 3000	Amersham Bioscience, Freiburg
SPECTRAmax MTP-Photometer	Molecular Devices, Ismaning
FLUOstar 403 MTP-Fluoreszenzspektrometer	BMG, Offenburg
Pickroboter:	
BioPick	BioRobotics, Cambridge (UK)
SDS-PAGE:	
Minigel-Twin G42	Biometra, Göttingen
Thermomixer:	
Schutron Thermoshaker	NeoLab, Heidelberg
Waagen:	
Basic, MC1 Research	Sartorius, Göttingen
HF-2000G	A&D, Milpitas (USA)
Vakuumkonzentrator:	
Concentrator 5319	Eppendorf, Hamburg
Vortexer:	
Vortex Genie 2	Scientific Industries

Zellaufschluss:	
Sonifier 250	Branson, Danbury (USA)
Zentrifugen:	
Centrifuge 5417C, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Sorvall RC-5B, Sorvall RC-5C (Rotor: GSR)	Du Pont Instruments, Leipzig

5.3 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 16: Verwendete Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Genotyp	Anbieter
Escherichia coli	DH5α	supE44 ΔlacU169(Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1relA1	Clontech, Heidelberg
Epicurian coli	XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB $lacI^qZ\Delta M15$ Tn10 (Tet^r)]	Stratagene, Amsterdam (NL)

5.4 Plasmide

Tabelle 17: Verwendete Plasmide

Plasmid	Größe	Resistenzen / Promotoren	Referenz / Anbieter
pGEX_pH_PFE	6568 bp	Amp^R, lacI, tacP, rhaP	[Miesenbock et al., 1998] [Traub, 2000]
pG-BSE-WT	3230 bp	Amp^R, rhaP	[Henke, 2001]
pG-BsubpNBE-WT	3956 bp	Amp^R, rhaP	[Henke, 2001]
pNMW10-30	5953 bp	Amp^R, rhaP	[Siemann et al., 1999]
pACYC184	4244 bp	Cam^R, Tet^R	New England Biolabs, Frankfurt/Main

5.5 Oligonukleotide

Tabelle 18: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
Hydrolase-SQF	5'-GAC TGG TCG TAA TGA AC-3'	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung der in den Vektor pGEX eingeführten Hydrolasengene
Hydrolase-SQR	5'-CAC CGA AAC GCG CGA G-3'	Rückwärts-Primer zur Sequenzierung der in den Vektor pGEX eingeführten Hydrolasegene
pHlu-SQ1f	5'-GAT AAG TAC TTG AAA TCC-3'	Vorwärts-Primer 1 zur Sequenzierung des pHluorin-Gens
pHlu-SQ1r	5'-TCC AAG AAT GTT TCC ATC-3'	Rückwärts-Primer 1 zur Sequenzierung des pHluorin-Gens
pHlu-SQ2f	5'-GAT GGA AAC ATT CTT GGA-3'	Vorwärts-Primer 2 zur Sequenzierung des pHluorin-Gens
pHlu-SQ2r	5'-GTA TAG TTC ATC CAT GCC-3'	Rückwärts-Primer 2 zur Sequenzierung des pHluorin-Gens
pHl-amp-f	5'-TAT TTT ATT CTA GAA ATT GTG AGC GGA TAA C-3'	Vorwärts-Primer zur Einführung der *Xba*I-Restriktionsschnittstelle und Amplifikation des *tac*-Promotors und des Fusionsgens aus Glutathion-*S*-Transferase und pHluorin.
pHl-amp-r	5'-AGA CTC GAA GCT TTT TTG TAT AGT TCA TC-3'	Rückwärts-Primer zur Einführung der *Hind*III-Restriktionsschnittstelle und Amplifikation des *tac*-Promotors und des Fusionsgens aus Glutathion-*S*-Transferase und pHluorin.
PFE-EPf	5'-TCT TGA GTT TGT AAC AGC TGC TGG GA-3'	Vorwärts-Primer zur Amplifikation des PFE-Gens unter *error-prone* Bedingungen
PFE-EPr	5'-TTG TCT GCT CCC GGC ATC CGC TTA CA-3'	Rückwärts-Primer zur Amplifikation des PFE-Gens unter *error-prone* Bedingungen

5.6 Lösungen, Medien und Puffer

5.6.1 Kulturmedien

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien/Lösungen für 20 min. bei 121°C und 2 bar Druck autoklaviert. Zur Herstellung fester Nährböden wurden die Medien vor dem Autoklavieren mit 15,0 g/l Agar versetzt. Das zur Selektion benötigte Antibiotikum (Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin) wurde nach Abkühlen der Nährlösungen auf ca. 45°C zugegeben; bei Flüssigkulturen erst kurz vor der eigentlichen Anzucht (Endkonzentration 100 μg/ml).

Luria-Bertani Flüssigmedium (LB-Medium):

(*low-salt*, modifiziert nach Luria et al., 1960 und Sambrook et al., 1989)

- Trypton.....10 g
- Hefeextrakt.....5 g
- Natriumchlorid.....5 g
- ddH_2O.....ad 1 l

Psi-Broth:

- Trypton.....20 g
- Hefeextrakt.....5 g
- Magnesiumsulfat.....5 g
- ddH_2O.....ad 1 l

Luria-Bertani-Tributyrin-Agarplatten:

- Trypton.....10 g
- Hefeextrakt.....5 g
- Natriumchlorid.....5 g
- Agar.....15 g
- ddH_2O.....ad 1 l
- Tributyrin.....1 % (v/v)
- Rhamnose-Stammlösung.....1 % (v/v)

5.6.2 Zelltransformationen

TSS-Medium (*Transformation and storage solution*) [Chung et al., 1989]:

- Trypton.....10 g
- Hefeextrakt.....5 g
- Natriumchlorid.....10 g
- Polyethylenglykol (PEG) 6000.....10 % (m/v)
- Dimethylsulfoxid (DMSO).....5 % (v/v)
- Magnesiumchlorid.....5 % (m/v)
- ddH_2O.....ad 1 l

$\Rightarrow$ auf pH 6,5 einstellen

TfbI-Puffer (Transformationspuffer I für die Rubidiumchlorid-Methode):

(nach www.nwfsc.noaa.gov/protocols/rbcl.html)

- Kaliumacetat.....30 mM
- Manganchlorid.....50 mM
- Rubidiumchlorid.....100 mM
- Calciumchlorid.....10 mM
- Glycerin.....15 % (v/v)
- ddH_2O.....ad 100 ml

$\Rightarrow$ mit verdünnter Essigsäure auf pH 5,8 einstellen

TfbII-Puffer (Transformationspuffer II für die Rubidiumchlorid-Methode):

(nach www.nwfsc.noaa.gov/protocols/rbcl.html)

- MOPS (Natriumsalz).....10 mM
- Rubidiumchlorid.....10 mM
- Calciumchlorid.....75 mM
- Glycerin.....15 % (v/v)
- ddH_2O.....ad 100 ml

$\Rightarrow$ mit verdünnter Natronlauge auf pH 6,5 einstellen

5.6.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x):

- Tris.....242 g
- Eisessig.....57 ml
- EDTA (pH 8,0).....0,5 M
- ddH_2O.....ad 1 l

Agarosegel (1 %):

- Agarose.....4 g
- TAE-Puffer (1x).....ad 400 ml

⇒ nach dem Aufkochen Lagerung bei 80°C

DNA-Auftragspuffer (6x):

- Glycerin.....30 % (v/v)
- Bromphenolblau.....0,2 % (w/v)
- EDTA (pH 7,5).....25 mM

1kb-*ladder*:

- Stammlösung BioRad.....25 µl
- TAE-Puffer (1x).....325 µl
- DNA-Auftragspuffer (1x).....150 µl

5.6.4 Puffer und Lösungen für die DNA-Sequenzierung

Polyacrylamid-Gel (5,25 %)

- Rotiphorese NF-Harnstoff.....18 g
- Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid....6,6 ml
- Rotiphorese NF-10x TBE-Puffer.....5 ml
- Calciumchlorid.....10 mM
- Glycerin.....15 % (v/v)
- ddH_2O.....ad 50 ml

TBE-Puffer (10x):

- Tris.....108 g
- Borsäure.....55 g
- EDTA (Natrium-Salz).....8,3 g
- ddH_2O.....ad 1 l

Resuspensionslösung für DNA-Sequenzierung:

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

5.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgel-Puffer (*Upper Tris*, 4x):

- Tris.....12,11 g
- Natriumdodecylsulfat (SDS).....0,8 g
- ddH_2O.....ad 200 ml

$\Rightarrow$ mit verdünnter Salzsäure auf pH 6,8 einstellen

Sammelgel (4 %):

- Acrylamidlösung 30 % (m/v).....0,52 ml
- Sammelgel-Puffer (4x).....1,0 ml
- ddH_2O.....2,47 ml
- Ammoniumpersulfatlösung 10 % (m/v).....40 µl
- TEMED.....4 µl

Trenngel-Puffer (*Lower Tris*, 4x):

- Tris.....36,46 g
- Natriumdodecylsulfat (SDS).....0,8 g
- ddH_2O.....ad 200 ml

$\Rightarrow$ mit verdünnter Salzsäure auf pH 8,8 einstellen

Trenngel (12,5 %):

- Acrylamidlösung 30 % (m/v).....3,33 ml
- Trenngel-Puffer (4x).....2,0 ml
- ddH_2O.....2,67 ml
- Ammoniumpersulfatlösung 10 % (m/v).....40 µl
- TEMED.....4 µl

SDS-Probenpuffer (2x) [Sambrook et al., 1989]:

- Tris.....100 mM
- Dithiothreitol (DTT).....200 mM
- Natriumdodecylsulfat (SDS).....2 % (m/v)
- Bromphenolblau.....20 % (v/v)
- Glycerin.....20 % (v/v)
- ddH_2O.....ad 10 ml

Zusammensetzung des *low molecular weight*-Standards (BioRad):

- Phosphorylase b.....97,4 kDa
- Serumalbumin.....66,2 kDa
- Ovalbumin.....45,0 kDa
- Carbonsäureanhydrase.....31,0 kDa
- Trypsin Inhibitor.....21,5 kDa
- Lysozym.....14,0 kDa

Elektrophoresepuffer:

- Tris.....25 mM
- Glycin.....192 mM
- Natriumdodecylsulfat (SDS).....0,1 % (m/v)
- ddH_2O.....ad 1 l

$\Rightarrow$ mit verdünnter Salzsäure auf pH 8,4 einstellen

Coomassie-Färbelösung:

- Coomassie Brilliant Blue R-250.....1 g
- Methanol.....300 ml
- Eisessig.....100 ml
- ddH_2O.....600 ml

Entfärbelösung:

- Methanol.....300 ml
- Eisessig.....100 ml
- ddH_2O.....600 ml

5.6.5 Stammlösungen

Ampicillin-Stammlösung:

- Ampicillin.....1 g
- ddH_2O.....ad 10 ml

Chloramphenicol-Stammlösung:

- Chloramphenicol.....0,34 g
- ddH_2O.....ad 10 ml

Kanamycin-Stammlösung:

- Kanamycin.....0,1 g
- ddH_2O.....ad 10 ml

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid-Stammlösung (IPTG):

- IPTG.....2,4 g
- ddH_2O.....ad 10 ml

Rhamnose-Stammlösung 20 % (m/v):

- Rhamnose.....20 g
- ddH_2O.....ad 100 ml

5.7 Mikrobiologische Methoden

5.7.1 Stammhaltung von *Escherichia coli* [Sambrook et al., 1989]

Zur Erhaltung von Reinkulturen wurden Verdünnungsausstriche auf LB-Agarplatten mit Zusatz des entsprechenden Selektionsantibiotikums hergestellt. Die Kulturen wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Verschließen der Petrischalen mit Parafilm und Lagern im Kühlraum (6°C) konnten die *E. coli*-Kulturen bis zur weiteren Verwendung für etwa vier bis sechs Wochen gelagert werden.
Die Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen erfolgte durch Animpfen von 5 mL LB-Amp-Medium mit einer Einzelkolonie, Inkubation (37°C, 200 rpm) über Nacht und anschließender Verdünnung eines 500 µl Aliquots dieser Kulturlösung mit 500 µl Glycerin (87 %; autoklaviert). Bei –80°C sind diese Glycerol-Stocks über Jahre haltbar.

5.7.2 Kultivierung von *Escherichia coli* [Sambrook et al., 1989]

Zur Kultivierung von *E. coli* wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (100 µg/ml) versetzt und mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Agarplatte mittels sterilem Zahnstocher angeimpft. Die *E. coli*-Kultur wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert (220 rpm). Diese Art der Kultivierung wird im folgenden als Übernacht-Kultur (ÜN-Kultur) bezeichnet.
Die Inokulation der Hauptkulturen in LB-Amp-Medium erfolgte im Verhältnis 1:100 aus diesen ÜN-Kulturen. Die weitere Kultivierung bis zur gewünschten Zelldichte wurde ebenfalls bei 37°C und 200 rpm im Inkubator durchgeführt. Durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm (OD_{578}) lässt sich das Wachstum der Kulturen kontrollieren. Für *E. coli* gilt allgemein: Anzahl der Zellen / ml ist gleich $OD_{578} \times 5 \times 10^8$.

5.7.3 Transformation von *Escherichia coli*

5.7.3.1 Herstellung kompetenter Zellen mit der TSS-Methode

Aus einer ÜN-Kultur von *E. coli* DH5α ohne Selektionsantibiotikum wurden 50 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD_{578} von 0,4 – 0,7 inkubiert. Die Zellen wurden danach abzentrifugiert (4°C, 10 min, 3000 rpm), mit 20 ml eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 2 ml eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert und in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden entweder sofort zur Transformation mit DNA eingesetzt oder zur Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.7.3.2 Herstellung kompetenter Zellen mit der Rubidiumchlorid-Methode

1 ml einer ÜN-Kultur von *E. coli* DH5α wurden in 100 ml *Psi broth* überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator (220 rpm) bis zu einer OD_{550} = 0,48 inkubiert. Danach wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, und die Zellen in dem 0,4-fachen Volumen an TfBI-Puffer resuspendiert. Nach weiteren 15 min Inkubationszeit auf Eis und erneuter Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm wurde der Überstand abgegossen, und die Zellen im 0,04-fachen Volumen an TfBII-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen direkt zur Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

5.7.3.3 Hitzeschock-Transformation kompetenter Zellen

200 µl an kompetenten Zellen wurden nach Vermischen mit 1 µl DNA-Miniprep für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Transformationsansatz für 30 bis 45 sek einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Zur Regeneration der Zellen wurden 800 µl LB-Medium hinzugesetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden danach für 2 min bei 7500 rpm zentrifugiert, im Rücklauf resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Danach erfolgte die Inkubation bei 37°C über Nacht.

5.7.4 Koexpression von pHluorin und rekombinanten Hydrolasen in *E. coli*

200 ml LB-Medium wurden mit 200 µl Ampicillin-Stammlösung versetzt und mit 2 ml einer 5 ml ÜN-Kultur der rekombinanten *E. coli*-Zellen inokuliert. Nach Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{578} von 0,8-1,0 wurde die Expression von pHluorin bzw. der rekombinanten Hydrolase durch Zusatz von 200 µl IPTG- bzw. 2 ml Rhamnose-Stammlösung induziert. Nach weiterer vierstündiger Inkubation bei 30°C wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4°C abgeerntet. Um Reste des Mediums zu entfernen, wurde das Pellet in 20 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0; 50mM) resuspendiert, nochmals abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann entweder direkt für *in vivo* Assayuntersuchungen verwendet (Kap. 5.10.1) oder erneut in 20 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen und unter Eiskühlung mittels Ultraschall (dreimal für 1 min; Output Level: 80 W; Duty Cycle: 35 %) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer entfernte man durch Zentrifugation bei 4°C und 9000 g. Der Überstand wurde dann direkt für *in vitro* Aktivitätstest eingesetzt (Kap. 5.9.3).

5.7.5 Stammhaltung, Bakterienanzucht und Koexpression in Mikrotiterplatten

Die Stammhaltung der Klone einer Mutantenbibliothek erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Nunc; Wiesbaden). Hierzu wurden 200 µl LB-Amp-DMSO-Medium pro Vertiefung vorgelegt und mit je einer einzelnen Kolonie (Klon) inokuliert. Nach Inkubation über Nacht (37°C, 200 rpm) wurden die Mikrotiterplatten anschließend zur Lagerung bei -80°C eingefroren (*master plates*).
Für das Screening nach Mutanten mit verbesserten Eigenschaften wurde kurzzeitig bei Raumtemperatur aufgetaut und auf Mikrotiterplatten ebenfalls mit 96 Vertiefungen (200 µl LB-Amp-Medium pro Vertiefung) überimpft. Nach Inkubation (37°C, 200 rpm, ca. 7 h) bis zu einem Anstieg der optischen Dichte bei 578 nm um 0,3 Extinktionseinheiten, wurde durch Zugabe von 20 µl IPTG-Lösung (25 mM) bzw. 20 µl Rhamnose-Lösung (2 %; v/v) je Vertiefung die Produktion von pHluorin bzw. der rekombinanten Hydrolase induziert. Die Expression (30°C, 200 rpm) wurde durch Zentrifugation (4°C, 4000 rpm, 15 min) nach 16 h gestoppt, die Überstände abdekantiert, die Zellpellets in 200 µl Kaliumphosphatpuffer mit Substrat (2 %; v/v) und Lösevermittler resuspendiert und direkt für das *in vivo* Screening nach Hydrolaseaktivität eingesetzt.

5.8 Molekularbiologische Methoden

5.8.1 Schnellisolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

Die Isolierung plasmidischer DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse transformierter Zellen [Birnboim et al., 1979]. Allerdings erfolgte die Aufreinigung nicht über eine Isopropanol-Fällung, sondern durch Chromatographie an Anionenaustauscher-Säulen (QIAgen Prepspin Plasmid Isolierung, QIAgen, Hilden bzw. GenElute-Kits für Plasmid Mini Preparation, Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Auch wurden die vom Hersteller der Anionenaustauscher-Säulen mitgelieferten Puffer verwendet.

Durchführung:

2 ml einer ÜN-Zellkultur in LB-Medium mit Selektionsantibiotikum wurden zentrifugiert (4°C, 20000 g, 10 min) und das Zellpellet in Puffer resuspendiert (Tris-HCl, EDTA; pH 7,5; RNAse I). Durch Zugabe von Natronlauge (NaOH, SDS) wurden die Zellen lysiert, die Lyse nach 5 min durch Neutralisation mit Natriumacetat-Puffer beendet. Um die ausgefällten Zelltrümmer und Proteine zu entfernen, wurde zentrifugiert (4°C, 20000 x g, 10 min) und der Überstand in die Anionenaustauscher-Säulen dekantiert. Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wurde nach einem Waschschritt mit demineralisiertem Wasser eluiert. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

5.8.2 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Die Präzipitation mit Alkohol ist eine einfache Möglichkeit zur Konzentrierung oder Reinigung von DNA. Dabei ist die Fällung der DNA aus wässrigen Lösungen mit Ethanol üblich. In Anwesenheit von Alkohol und einem monovalenten Salz bildet die DNA bei niedrigen Temperaturen ein Präzipitat, das sich durch Zentrifugation pelletieren lässt. Durch anschließendes Waschen mit Ethanol (70 %, v/v) lassen sich Salzreste entfernen. Ein Nebeneffekt der Methode ist, dass neben dem Salz auch viele andere kleine, wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst bleiben, so dass ein gewisser Reinigungseffekt erzielt wird.

Durchführung:

Die DNA enthaltende Lösung wurde mit 1/10 des Volumens Na-Acetat Lösung (3 M, pH 5,3) gemischt und 3 Volumen Ethanol (100 %, -20°C) zugegeben. Die Präzipitation erfolgte über zwei Stunden bei –80 °C. Nach Zentrifugation (20000 x g, 4 °C) wurde der Überstand entfernt und das verbliebene Pellet mit Ethanol (70 %, -20°C) gewaschen. Nach dem Abgießen der Waschlösung wurde die DNA im Vakuum getrocknet und in demineralisiertem Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

5.8.3 Bestimmung der DNA-Konzentration [Mühlhardt, 2000]

Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Bei Verwendung von Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm lässt sich die Konzentration folgendermaßen berechnen:

Doppelsträngige DNA-Moleküle: $c(dsDNA) = OD_{260} \times 50\ \mu g/ml$

Anhand der UV-Absorption kann auch die Reinheit einer DNA-Präparation überprüft werden. Bei einer reinen DNA-Probe liegt das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm bei 1,8. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung z. B. mit Protein hin.

Durchführung:
2 µl einer nach Kap. 5.8.1 erhaltenen DNA-Lösung wurde mit 48 µl Wasser verdünnt und die UV-Absorption gegen das reine Lösungsmittel (Wasser) als Referenz gemessen.

5.8.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese [Sambrook et al., 1989; Sharp et al., 1973]

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode, DNA-Fragmente voneinander zu trennen und zu identifizieren. Das Prinzip beruht auf der Wanderung der negativ geladenen DNA-Moleküle (Phosphat-Reste) bei Anlegung eines elektrischen Feldes (Gleichspannung). Die Auftrennung (analytisch oder präparativ) der Fragmente ist dadurch von der Größe (Molekulargewicht) und der Konformation der DNA-Moleküle abhängig. Zirkulare DNA-Fragmente besitzen bei gleicher Anzahl an Basen eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit als lineare Fragmente und legen somit eine größere Strecke im Agarosegel zurück. Darüber hinaus wird die Wanderungsgeschwindigkeit vom Agarosegehalt des Gels beeinflusst. Um die aufgetrennten DNA-Banden sichtbar zu machen, wird beim Gießen des Agarosegels Ethidiumbromid zugesetzt, welches in die DNA-Helices

interkaliert und im UV-Durchlicht eines Transilluminators fluoresziert [Lepecq et al., 1967]. Es ist hierbei zu beachten, dass bei Anlegung eines elektrischen Feldes das positiv geladene Ethidiumion entgegengesetzt zur DNA in Richtung der Kathode wandert, so dass kleinere DNA-Moleküle bei gleicher Konzentration ein schwächeres Signal geben. Die Zuordnung der DNA-Banden erfolgt über einen Vergleich mit einem externen Längenstandard (*kb-ladder*).

Ein Aliquot (analytisch) bzw. die gesamte DNA-Probe (präparativ) wird mit einer Bromphenolblau-Glycerin-Lösung (DNA-Auftrags-Puffer) im Verhältnis 1:1 bis 5:1 (v/v) vermischt und aufgetragen. Das Glycerin erhöht hierbei die Dichte, so dass die Proben in die angelegten Taschen im Agarosegel absinken. Der negativ geladene Farbstoff Bromphenolblau dient als Indikator, welcher die zurückgelegte Laufstrecke im elektrischen Feld anzeigt.

Für präparative Trennungen können die Banden anschließend aus dem Agarosegel ausgeschnitten, die DNA isoliert und gereinigt werden. Nach Auflösung des Agarosegels in einem geeigneten Puffersystem erfolgt die weitere Behandlung der DNA-Lösung entsprechend Kap. 5.8.5.

Durchführung:

40 mL 1 % Agarose-Lösung (m/v) wurden mit 4 µl Ethidiumbromid-Stammlösung vermischt und auf einen Gelträger mit eingesetztem „Probentaschenkamm“ gegossen. Aus dem erstarrten Agarosegel (ca. 20 min) konnte der „Kamm“ entfernt und das Agarosegel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt werden. Nach Überschichtung mit TAE-Puffer wurden die mit dem Auftrags-Puffer vermischten DNA-Proben in die Taschen eingefüllt und eine konstante Spannung von 120 V für 30 bis 45 min angelegt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte im UV-Durchlicht eines Transilluminators. Zur Dokumentation wurden die Gele photographiert und bei präparativer Trennung die gewünschten Banden ausgeschnitten. Die anschließende Isolierung und Reinigung der DNA erfolgte entsprechend des QIAquick Gel Extraction Kit Protokolls für die Verwendung einer Zentrifuge (Kap. 5.8.5).

5.8.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde das "QIAquick Gel Extraktion Kit" (Qiagen, Hilden) verwendet und nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Dabei wird das die DNA enthaltene Agarose-Gelstück in einem Puffer gelöst und die DNA auf einer Kieselgelmatrix gebunden. Nach mehreren Waschschritten wird die DNA mit Wasser eluiert.

5.8.6 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen ermöglichen es, DNA sequenzspezifisch zu schneiden. Die Restriktionsspaltung erzeugt Fragmente, die nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel anhand des Bandenmusters Rückschlüsse auf die Sequenz der untersuchten DNA zulassen. So lässt sich z.B. schnell und einfach überprüfen, ob ein DNA-Molekül (Plasmid) ein bestimmtes Fragment (Gen) enthält oder nicht. Die Analytische Restriktionsspaltung kann somit einen ersten Aufschluss geben, ob eine Klonierung erfolgreich war. Diese analytische Kontrolle erfolgt üblicherweise in einem Reaktionsvolumen von 10 µl.
Die präparative Restriktionsspaltung dient dazu, einen Vektor und ein DNA-Molekül (Insert; Gen) mit definierten Endonukleasen so zu spalten, dass nach Aufreinigung (Agarose-Gelelektrophorese) eine Ligation (Kap. 5.8.7) der beiden geschnittenen Fragmente an den kompatiblen Schnittstellen möglich ist.

Durchführung:
Zu 20 µl (2 µl für den analytischen Ansatz) einer DNA-Präparation nach Kap. 5.8.1, 5.8.2 oder 5.8.8.3 wurden 2 µl (0,5 µl) Restriktionsenzym sowie 10 µl (1 µl) des entsprechenden Puffers zugesetzt und auf 50 µl (10 µl) mit ddH_2O aufgefüllt. Die Restriktionsspaltung erfolgte im allgemeinen bei 37°C. Nach 2 h (1 h) wurde die Reaktion gestoppt (Abkühlung auf < 0°C) und eine DNA-Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 5.8.4 und 5.8.5) durchgeführt.

5.8.7 Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase

Die Grundlage der molekularen Klonierungstechnik liegt darin, einen Vektor (präparierte Plasmid-DNA) mit einer Fremd-DNA (Gen; Insert) unter Zusatz einer Polynukleotid-Ligase kovalent zu einem zirkularen Molekül (Hybrid-DNA oder chimäre DNA) zu verbinden. Dieser Vorgang wird als Ligation bezeichnet. DNA-Ligasen schließen die Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH-Gruppe am anderen Ende einer doppelsträngigen DNA. Das neu gebildete, zirkuläre Plasmid lässt sich wieder mit *E. coli* transformieren (Kap. 5.7.3).

Durchführung:

Die Ligation erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers der T4 DNA-Ligase in einem Volumen von 20 µl. In einem Kunststoffreaktionsgefäß wurde eine Mischung von etwa drei- bis fünffachem Überschuss an Insert- zu Vektor-DNA-Lösung vorgelegt. Nach Zugabe von 2 µl T4 DNA-Ligase (2 U) und 2 µl Ligations-Puffer (10×) wurde mit Wasser ad 20 µl aufgefüllt und die Lösung über Nacht bei 16°C inkubiert.

5.8.8 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction,* PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde zur enzymatischen Amplifizierung von DNA Fragmenten verwendet. Das von Mullis *et al.* [Mullis et al., 1986] erstmals beschriebene Prinzip beruht auf der mehrfachen Wiederholung dreier Teilschritte:

- Schmelzen: Die DNA-Matrize wird bei Temperaturen >92 °C in die beiden Einzelstränge aufgeschmolzen.
- Anlagerung (*Annealing*): Bei Temperaturen zwischen 37 und 72 °C lagern sich kurze Oligonukleotide (Primer) an, die komplementär zu einem kurzen Sequenzabschnitt am Anfang bzw. Ende des zu vervielfältigenden Fragments sind.

- Synthese (*Extension*): Bei 72 °C synthetisiert die DNA-Polymerase beginnend an den angelagerten Primern unter Verwendung der zugesetzten Desoxynukleotide einen komplementären DNA-Einzelstrang. Die Synthese erfolgt dabei vom 5‘- zum 3‘-Ende.

In jedem Zyklus dieser drei Teilschritte kann so theoretisch aus jedem DNA Molekül ein Neues erhalten werden. Durch die Verwendung einer temperaturstabilen DNA-Polymerase können die Zyklen direkt hintereinander in einem programmgesteuerten Thermocycler durchgeführt werden.
Für eine erfolgreiche Amplifikation ist es erforderlich, die Bedingungen so zu wählen, dass die Fehlerrate beim Einbau der Nucleotide durch die Polymerase so niedrig wie möglich gehalten wird. Unter optimalen Bedingungen liegt die Fehlerrate bei 0,001 bis 0,02 % [Cadwell und Joyce, 1992; Tindall und Kunkel, 1988]. Die Fehler sind dabei über das ganze Produkt verteilt. Hauptsächlich tritt ein Austausch der Basen, bevorzugt Cytosin gegen Thymin, auf, Deletionen oder Insertionen einer Base kommen sehr selten (1 Leserastermutation / 50000 Basen), komplexere Mutationen gar nicht vor.

Tabelle 19: Zusammensetzung einer Standard-PCR-Reaktion im 100 µl-Maßstab

Komponente	**Zusammensetzung**	**Menge**
10 x Reaktionspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$	10 µl
Primer 1	100 µM in ddH_2O	1 µl
Primer 2	100 µM in ddH_2O	1 µl
DNA-Matrize	Ca. 0,1 µg gelöst in ddH_2O	x µl
Desoxynukleotid- Mischung	je 2,5 mM	8 µl
Taq-Polymerase	1 U	x µl
ddH_2O		ad 100 µl

Tabelle 20: Temperaturprogramm für die Standard-PCR-Reaktion

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	1:30 min	25
Anlagerung	55°C	1:30 min	
Synthese	72°C	5 min	
Synthese	72°C	10 min	1

5.8.8.1 PCR zur DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger [Sanger et al., 1977] durchgeführt. Dabei wird zu einer der PCR ähnlichen Reaktion nur ein komplementäres Oligonukleotid (Primer) zugegeben. An einem im Unterschuss zugesetzten fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden bricht die Synthese des DNA-Strangs ab. Die unterschiedlich langen synthetisierten DNA-Stränge können elektrophoretisch in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden. Durch Auslesen dieser fluoreszenzmarkierten Fragmente kann die Sequenz erhalten werden.
Verwendet wurde das Big Dye Terminator Kit der Firma Perkin Elmer. In einer vom Hersteller gelieferten Fertigmischung befinden sich dabei bereits Puffersubstanzen, DNA-Polymerase, Desoxynukleotide und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Sequenzierungs-PCR-Reaktion

Komponente	Zusammensetzung	Menge
Big Dye Terminator Mix	Fertigmischung (Kap 5.8.9)	6 µl
Primer	2 µM in ddH_2O	4 µl
DNA-Matrize	Ca. 0,1 µg gelöst in ddH_2O	x µl
DMSO		1 µl
ddH_2O		ad 20 µl

Tabelle 22: Temperaturprogramm für die Sequenzierungs-PCR-Reaktion

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
Denaturierung	95°C	6 min	1
Denaturierung	95°C	1 min	25
Anlagerung/Synthese	60°C	5 min	
Synthese	60°C	4 min	1

5.8.8.2 Einführung von Restriktionsschnittstellen mittels PCR

In einer PCR können während der Vervielfältigung am Anfang und Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments neue Nukleotide angehängt werden. Man wählt dafür Primer, die zu Anfang und Ende des DNA-Abschnitts komplementär sind, an den weitere Nukleotide angehängt werden sollen. Diese Oligonukleotide werden um die gewünschte Nukleotidsequenz verlängert. Bei der Einführung von Restriktionsschnittstellen ist darauf zu achten, dass Restriktionsendonukleasen außerhalb der Erkennungssequenz noch einen Überhang von mehren Basenpaaren benötigen, um arbeiten zu können.

5.8.8.3 Die error-prone PCR

Durch gerichtete Mutagenese mittels PCR ist die Parallelerzeugung vieler Mutanten und damit ein Protein-Engineering zur Untersuchung der Funktionalität von Proteindomänen in Bezug auf ihre Wirkung möglich geworden. Darüber hinaus lassen sich durch Zufallsmutagenese die Eigenschaften eines Genprodukts, d.h. eines Proteins bzw. im Spezialfall eines Biokatalysators, verändern. Eine Durchführung der PCR unter suboptimalen Bedingungen, die zu einer Erhöhung der Mutationsrate führt, wird als *error-prone* (fehlerhafte) PCR (*ep*PCR) bezeichnet. So lässt sich durch Zusatz von Mangan(II)chlorid und dNTP-Mischungen, bei denen einzelne Basen signifikant im Unterschuss enthalten sind, die Fehlerrate bei der Amplifikation auf über 1 % steigern. Die *error-prone* PCR stellt die wichtigste Methode bei der gerichteten Evolution von Enzymen dar.

Tabelle 23: Zusammensetzung einer *error-prone* PCR-Reaktion

Komponente	Zusammensetzung	Menge
10 x Reaktionspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$	5 µl
Primer 1	100 µM in ddH_2O	0,5 µl
Primer 2	100 µM in ddH_2O	0,5 µl
DNA-Matrize	Ca. 0,1 µg gelöst in ddH_2O	1 µl
Desoxynukleotid-Mischung	je ein Nukleotid im fünffachen Unterschuss (2 mM), die anderen 10 mM	5 µl
Magnesiumchlorid	25 mM in ddH_2O	11,5 µl
Manganchlorid	5 mM in ddH_2O	1 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	1 µl
ddH_2O		ad 50 µl

Tabelle 24: Temperaturprogramm für die *error-prone* PCR-Reaktion

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	1:30 min	
Anlagerung	55°C	1:30 min	25
Synthese	72°C	6 min	
Synthese	72°C	10 min	1

5.8.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgt nach der von Sanger entwickelten enzymatischen Ketten-Abbruch-Methode [Sanger et al., 1977], die auch als „Enzymatische DNA-Sequenzierung“ oder „Didesoxy-Sequenzierung“ bezeichnet wird. Die Methode beruht auf der enzymatischen Synthese einer komplementären Kopie des zu sequenzierenden, einzelsträngigen Matrizenstrangs. Hierbei werden unterschiedlich lange DNA-Fragmente durch kontrollierte Unterbrechung der Amplifikation mittels spezifischer Terminatoren (2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphate; ddNTPs) erzeugt, die zusätzlich zu den 2'-Desoxynucleotiden im Reaktionsansatz enthalten sind. Aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe der ddNTPs

bricht die Kettenverlängerung eines entstehenden DNA-Fragments nach dem statistischen Einbau dieses Terminators ab, da die Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung zu einem weiteren Nukleotid nicht mehr möglich ist. Bei der ursprünglich entwickelten Sanger-Methode wurden vier separate Reaktionen, jede mit einem anderen, radioaktiv markierten ddNTP als Terminator angesetzt und anschließend nebeneinander durch Polycrylamidgel-Elektrophorese analysiert. Hierbei lassen sich DNA-Moleküle trennen, die sich in der Länge nur um ein Nukleotid unterscheiden. Aus der Abfolge der Banden im Autoradiogramm lässt sich direkt die DNA-Sequenz ablesen.

Als Variante der Sanger-Methode werden an Stelle von radioaktiv markierten ddNTPs Terminatoren mit Fluoreszenzmarkern eingesetzt [Ansorge et al., 1987; Freeman et al., 1990], wobei jedes der vier Didesoxy-Nukleotide mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff kovalent verbunden ist. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode liegt darin, die so markierten DNA-Fragmente zusammen in einer Spur des Polyacrylamidgels auftragen zu können [Prober et al., 1987]. Die Detektion bei dieser Vierfarbentechnik erfolgt durch zwei Argonlaser mit Emissionsbanden von 488 und 514 nm. Das senkrecht hierzu emittierte Fluoreszenzlicht wird von Photodioden hinter dem Gel gemessen und die Datenauswertung erfolgt online durch ein angeschlossenes EDV-System.

Eine weitere Steigerung der Effizienz und des Durchsatzes lässt sich durch die Verwendung thermostabiler Polymerasen erreichen. Diese Methode erfolgt analog zur PCR (Kap. 5.8.8). Bei der enzymatischen Sequenzierung wird eine DNA-Replikation bis zum statistischen Einbau eines fluoreszenzmarkierten ddNTPs, mit einem Primer über mehrere Zyklen durchgeführt. Aufgrund der wiederholten Synthese neuer DNA-Fragmente sind nur geringe Mengen an Ausgangs-DNA erforderlich. Darüber hinaus lassen sich durch die Verwendung jeweils nur eines Primers die beiden komplementären Sequenzen einer doppelsträngigen DNA separat analysieren.

Eine weitere Verbesserung dieser *Cycle-Sequencing*-Methode lässt sich auch durch spezielle DNA-Polymerasen erreichen. PE Applied Biosystems (Weiterstadt) bietet hierfür die sogenannte Ampli*Taq*-Polymerase FS an. Es handelt sich hierbei um eine Doppelmutante der bekannten *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase; Kap. 5.8.8), deren 5'-3'-Nuclease-Aktivität (Mutation G46D) verringert und die Akzeptanz gegen Didesoxynukleotide (Mutation F667Y) erhöht wurde.

Durchführung:

Gießen des Polyacrylamidgels:

Die Lösung für das Polyacrylamidgel wurde durch eine Membran (0,2 µM) filtriert und entgast. Der Start der Polymerisation erfolgte durch Zusatz von 24 µl TEMED und 180 µl 10 % (m/v) APS. Zum Aushärten des Gels wurde die Lösung umgehend zwischen die durch Abstandshalter (*Spacer*) getrennten, gründlichst gereinigten Glasplatten gegossen, der „Vorkamm“ eingesetzt und die Platten während der zweistündigen Polymerisationszeit abgedichtet. Anschließend tauschte man den 'Vorkamm' gegen den sogenannten „Haifisch-Kamm“ aus und setzte das Gel in den Sequenzer ein. Nach Kontrolle des Basissignals erfolgte ein einstündiger Vorlauf.

Sequenzierungsreaktion:

Genaue Angaben über die Sequenzierungsreaktion sind in Kap. 5.8.8.1 zu finden.

Probenaufarbeitung nach der Sequenzierungsreaktion:

Der Ansatz wurde ad 100 µl mit Wasser aufgefüllt und die DNA durch Zusatz von 10 µl 3 M Natriumacetatlösung so wie 250 µl Ethanol (98 %) gefällt und die Lösung für 20 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (16°C, 20800 *g*, 30 min) wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit Ethanol 70 % (v/v) gewaschen, erneut für 10 min abzentrifugiert und im Vakuum getrocknet (SpeedVac; 45°C, 5 min). Schließlich nahm man das Pellet in 4 µl Resuspensionslösung auf und denaturierte die DNA für 5 min bei 95°C. Anschließend wurde auf Eis abgekühlt, kurz abzentrifugiert (*short spin*) und die Lösung in eine Tasche des in das Sequenziergerät eingesetzten Polyacrylamidgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Programmparametern (Handbuch zum Sequenzierautomaten) für eine Dauer von 12 h.

5.8.10 Bestimmung der Mutationshäufigkeit in Mutanten-bibliotheken

Die Mutationshäufigkeit wurde durch Sequenzierung mehrerer zufällig ausgewählter Klone bestimmt. Um zusätzlich einen schnelleren Überblick über die zu erwartende Mutationsfrequenz zu erhalten, wurden Klone auf LB-Amp-Tributyrin-Rhamnose-Agarplatten ausplattiert. Klone, die nach vier Tagen noch keine eindeutige Hofbildungen zeigten, wurden als inaktiv bewertet.

5.9 Proteinchemische Methoden

5.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*)

Mittels PAGE können Proteine in analytischem oder präparativem Maßstab nach Größe (SDS- und Native-PAGE) oder nach dem relativen Gehalt an sauren und basischen Gruppen (Isoelektrische Fokussierung; IEF) aufgetrennt werden [Lämmli, 1970]. Dabei wandern die Proteine unter dem Einfluss des angelegten elektrischen Feldes durch die Poren eines Polyacrylamidgels, wobei die Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit von der Ladung der Proteine, der Porengröße des Gels und der angelegten Spannung abhängen. Während die Auftrennung der Proteine bei der nativen PAGE im nicht-denaturierten Zustand erfolgt, werden die Proteine zur Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht durch Bindung des Detergenz SDS proportional zu ihrer Größe negativ geladen (z.B. 1,4 g SDS / g Protein in 1 %igen SDS-Lösungen) und denaturiert. Die Denaturierung wird durch eine vorherige Reduktion der Proteine mit Mercaptoethanol oder DTT unterstützt. SDS unterbindet darüber hinaus die Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen). Die SDS-Protein-Komlexe verschiedener Proteine unterscheiden sich damit für viele Meßmethoden nur noch in ihrer Größe (Molekulargewicht bzw. Stokes-Radius) und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften.

Durchführung:

Herstellung des SDS-Gels:

Nach Start der Polymerisation durch Zusatz APS und TEMED wurde die Trenngel-Lösung zum Aushärten des Gels umgehend zwischen die durch Abstandshalter (Spacer) getrennten, gründlichst gereinigten Glasplatten gegossen, zum Erzielen einer geraden Geloberfläche mit 200 µl Isopropanol überschichtet und für 30 min bei RT stehen gelassen. Anschließend konnte das Isopropanol abdekantiert und die Geloberfläche mit Wasser nachgespült werden. Danach erfolgte die Herstellung des Sammelgels. Hierzu wurde die Sammelgel-Lösung auf das gereinigte Trenngel gegossen, der Probentaschen-Kamm eingesetzt und erneut 30 min bei RT zur Polymerisation stehen gelassen. Nach Entfernung des Kamms und der Spacer wurden die Probentaschen gründlich gespült und die Glasplatten mit dem Polyacrylamidgel in die bereits mit Puffer befüllte Elektrophorese-Apparatur luftblasenfrei eingesetzt.

Vorbehandlung der Protein-Proben:

10 µl der in Puffer gelösten Protein-Probe (ca. 20 µg Protein) wurden mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C gekocht, auf Eis abgekühlt und nach Zentrifugation (*short spin*) auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente der *low-molecular-weight*-Standard (Auftragung 10 µl).

Elektrophorese-Bedingungen:

Die Elektrophorese erfolgte für 10 min mit 10 mA (pro Gel) und anschließend mit 25 mA (pro Gel) bis die blaue BPB-Bande das Ende des Gels erreicht hatte.

Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels:

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde mit Coomassie Briliant Blue (0,1 % (w/v), 30 % Methanol, 10 % Essigsäure) gefärbt. Das Gel wurde 12-18 h in der Färbelösung belassen, danach entfärbte man mit 30 % Methanol, 10 % Essigsäure in Wasser bis der Gelhintergrund weitgehend farblos wurde.

5.9.2 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt der Proben wurde mittels des BCA-Tests durchgeführt. Der Test beruht auf der Biuret-Reaktion, bzw. der Eigenschaft von Proteinen Kupfer(II)-Ionen, in alkalischer Umgebung zu Kupfer(I) zu reduzieren. Die Kupfer(I)-Ionen bilden mit der zugesetzten Bicinchonin-Säure (BCA) einen violetten Komplex, der durch Absorptionsmessung bei 562 nm quantitativ erfasst werden kann [Smith et al., 1985]. Verwendet wurde der Kit mit den fertigen Lösungen der Firma Pierce (NL).
Ein Abgleich der gemessenen Absorption gegenüber der Proteinmenge erfolgte durch Vergleich mit einer BSA-Standardgerade.

5.9.3 Aktivitätsmessungen von Hydrolasen

5.9.3.1 pNPA-Assay

Prinzip:
Die Bestimmung der Hydrolaseaktivität mit dem pNPA-Assay basiert auf der enzymkatalysierten Spaltung von *p*-Nitrophenylacetat. Das bei der Spaltung freiwerdende *p*-Nitrophenolat kann photometrisch bei 410 nm bestimmt werden [Bornscheuer, 1999]. Die Methode wurde ursprünglich zur Messung der Aktivität von Lipasen gegen *p*-Nitrophenylpalmitat entwickelt [Purdy et al., 1973]. Aus dem Anstieg der Absorption bei 410 nm, lässt sich die Aktivität berechnen. Eine Einheit (U) Hydrolaseaktivität entspricht der Menge an Enzym, die 1 µmol *p*-Nitrophenolat pro Minute unter den gewählten Reaktionsbedingungen freisetzt.

Es gilt:

$$\text{Aktivität}\left[\frac{\text{U}}{\text{mg}}\right]_{\text{pNPA-Assay}} = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d \cdot c_{\text{Enzym}}}$$

hierbei ist:

- ΔE: Anstieg der Absorption bei 410 nm [1/min]
- ε: molarer Absorptionskoeff. *p*-Nitrophenolat bei pH 8,0 [14500 L/(mol cm)]
- d: Schichtdicke der Messküvette [cm]
- c_{Enzym}: Konzentration an Enzym in der Assaylösung [mg/mL]

Bei Kenntnis des Proteingehalts einer Enzympräparation ist die Berechnung der spezifischen Aktivität [U/mg Protein] möglich.

Durchführung:

900 µl Phosphatpuffer (pH 8,0; 50 mM) mit einer bekannten Hydrolasekonzentration wurden zum Starten der Reaktion in einer Messküvette (1 ml; Schichtdicke 1 cm) mit 100 µl *p*-Nitrophenylacetat-Lösung (10 mM in DMSO) versetzt. Die Konzentration des Enzyms wurde für eine Bestimmung im Bereich von 0,0001 bis 1 mg/ml variiert. Die einzelnen Messungen erfolgten bei RT gegen eine aktive Referenz (900 µl Phosphatpuffer ohne Enzym). Für jede Enzympräparation wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

5.9.3.2 pH-Stat-Assay

Prinzip:

Grundlage für die Bestimmung der Hydrolaseaktivität im pH-Stat-Assay ist die enzymatische Spaltung einer Esterverbindung. Zur Bestimmung der Aktivität von Lipasen wurde ursprünglich Olivenöl als Substrat eingesetzt [Tietz et al., 1966]. Durch Verwendung von definierten Triglyceriden ließ sich die Reproduzierbarkeit der Methode erhöhen [Peled et al., 1981]. Die bei der Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren (allg. Carbonsäuren) werden automatisch mit Natronlauge titriert, um den pH-Wert

der Lösung konstant zu halten. Aus dem Verbrauch an Natronlauge, der auf einem X/Y-Schreiber in Abhängigkeit von der Zeitaufgetragen wird, lässt sich die Aktivität berechnen. Eine Einheit (1 U) Hydrolaseaktivität entspricht der Menge an Enzym, die 1 µmol Fettsäure (allg. Carbonsäure) pro Minute unter den gewählten Reaktionsbedingungen freisetzt.

Es gilt:

$$\text{Aktivität}\left[\frac{\text{U}}{\text{mg}}\right]_{\text{pH-Stat-Assay}} = \frac{f_x \cdot f_y \cdot c_{\text{Natronlauge}}}{\text{M}} \cdot \frac{\Delta x}{\Delta y}$$

hierbei ist:

f_x:	Schreiberparameter bez. des Natronlauge-Verbrauchs [µl/mm]
f_y:	Schreiberparameter bezüglich der Reaktionszeit [mm/min]
$c_{Natronlauge}$:	Konzentration der Natronlauge [mol/L]
M:	eingesetzte Menge an Enzym [mg]
$\Delta x/\Delta y$:	Steigung der Messgeraden [mm/mm]

Bei Kenntnis des Proteingehalts einer Enzym-Präparation ist die Berechnung der spezifischen Aktivität [U/mg Protein] möglich.
Neben der Aktivitätsbestimmung lässt sich auch über den Verbrauch an titrierter Natronlauge der Umsatz einer Hydrolase-katalysierten Reaktion verfolgen. Für präparative Zwecke (Synthese; GC-Untersuchung) ist es somit möglich, die Hydrolyse gezielt beim Erreichen eines bestimmten Umsatzes abzustoppen und die Assaylösung zu extrahieren.

Durchführung:

Die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität der Esterasen erfolgte mit einer Standardemulsion (Assaylösung): 2 % (v/v) Substrat und 3 % (v/v) Lösevermittler (Gummi arabicum, DMSO, Tween 20) wurden mit 100 mL Wasser versetzt und 10 min mittels Ultraturrax emulgiert. 20 mL dieser Assaylösung wurden in das Reaktionsgefäß (Reaktor) gegeben, auf 37°C temperiert, mit Natronlauge (0,1 M) auf pH 8,0 (Startpunkt) eingestellt und anschließend eine bekannte Menge an Enzym zugesetzt. Die Titration der freiwerdenden Säure auf den vorgegebenen konstanten

pH-Wert (pH 8,0) erfolgte mit 0,1 M Natronlauge. Für jede Enzympräparation wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

5.10 Assaysysteme

5.10.1 pHluorin-Assay

5.10.1.1 Das Konzept des pHluorin-Assays

Die bei hydrolasekatalysierten Substrathydrolysen freigesetzten Protonen sorgen für eine Erniedrigung des pH-Werts. Um diese pH-Änderung und damit die Hydrolaseaktivität *in vivo* nachweisen zu können, wird in einer Zelle neben der zu untersuchenden Hydrolase auch das ratiometrische pHluorin exprimiert. Je nach Stärke der pH-Änderung nach Substratumsatz kommt es zu einer Änderung der beiden pH-abhängigen Maxima im Anregungsspektrum des pHluorins, die mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers oder Durchflusszytometers nachweisbar ist. Die Änderung des Emissionsverhältnis $R_{475/395}$ aus beiden Peaks ist ein Maß für die pH-Änderung in der Zelle.

5.10.1.2 Testreaktionen zur Assayentwicklung

Die erhaltenen Zellpellets (Kap. 5.7.4) wurden in 5 ml Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) ohne bzw. mit 2 % (v/v) Substrat sowie ohne bzw. mit DMSO (3 % v/v) als Lösevermittler resuspendiert und für 45 min im Schüttelinkubator bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Aliquots in schwarze Mikrotiterplatten überführt. Die Fluoreszenzemission bei 508 nm wurde durch Anregung bei 390 und 485 nm am Fluoreszenzspektrometer bestimmt und daraus das Emissionsverhältnis $R_{485/390}$ berechnet. Zur Zellanalyse und -sortierung am Durchflusszytometer wurden Lösungen nach der Biotransformation direkt eingesetzt.

5.10.1.3 Selektion aktiver Hydrolasen

Die Klone einer Mutantenbibliothek wurden mit Hilfe eines Pickroboters (Biopick) in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) überführt. Die Kultivierung der Zellen sowie die Koexpression von pHluorin und Hydrolase erfolgte gemäß Kap. 5.7.5.
Die erhaltenen Zellpellets wurden in 250 µl Phosphatpuffer (50 mM; pH 8,0) mit 2 % (v/v) Substrat und 3 % (v/v) DMSO resuspendiert und für 45 min im Schüttelinkubator bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzaktivität der Proben bei den beiden Anregungswellenlängen 390 nm und 485 nm gemessen und das Emissionsverhältnis $R_{485/390}$ bestimmt.
Die Klone, die das größte Emissionsverhältnis zeigten, wurden anschließend zur näheren Bestimmung der Hydrolaseaktivität im Schüttelkolbenmaßstab erneut exprimiert (Kap. 5.7.4). Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und Aktivitätstests am pH-Stat (Kap. 5.9.3.2), mit Hilfe des pNPA-Assays (Kap. 5.9.3.1) und Substratumsetzungen mit ganzen Zellen an der HPLC durchgeführt (Kap. 5.10.3).

5.10.2 Fluoreszenzanalysen durch Fluorescence-Activated Cell-Sorting

Die Fluoreszenzanalysen wurden mit den Durchflusszytometern FACSScan™, FACSVantage™ mit FACSDiVa™-Option und LSR II™ der Firma BD Bioscience durchgeführt. Die Anregung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines blauen Argonlasers mit einem Anregungsmaximum bei 488 nm, eines UV-Lasers bei 350 nm (nur FACSDiVa) sowie einer violetten Laserdiode bei 405 nm (nur LSR II). Folgende Parameter wurden analysiert (Kap. 3.5):

- Forward Scatter (FSC): Die Lichtbeugung durch die Zelle entlang der Achse des einfallenden Lichtstrahls bei 488 nm wird mit Hilfe einer Photodiode detektiert. Das Signal ist proportional zur Zelloberfläche bzw. Zellgröße.

- Side Scatter (SSC): Das durch Lichtbrechung und Reflektion des eingestrahlten Lichts bei 488 nm an der Zelloberfläche entstehende, um 90° abgelenkte Streulicht wird durch eine weitere Photodiode registriert. Es liefert Informationen über Dichte und Beschaffenheit lichtbrechender Strukturen in der Zelle, ist also proportional zur Zellgranularität.

- GFP exc. 488 nm: Das FITC-Signal wird im 90°-Winkel zum einfallenden Licht gemessen. Die Anregung erfolgt bei 488 nm und die Detektion im Bereich von 515 und 545 nm mit einem sogenannten 530/30 *band-pass* Filter. Es wird also die Fluoreszenz der Zellen, die in diesem Bereich ein Maximum besitzt, gemessen. Zur Registration und Verstärkung aller Fluoreszenzsignale werden Photomultiplier verwendet, die eine wesentlich höhere Sensitivität besitzen als normale Photodioden.

- GFP exc. 405 nm: Die Anregung der Zellen erfolgt hier bei 405 nm und die Detektion ebenfalls über den 530/30 Filter.

- UV: Die Anregung der Zellen erfolgt bei 350 nm. Das von den Zellen emittierte Fluoreszenzsignal wird mit Hilfe des 530/30 Filters detektiert.

- Ratio exc. 488 nm/ exc. 405 nm: Das Emissionsverhältnis der beiden Signale bei den beiden Anregungswellenlängen 488 nm und 405 nm wird mit dem 530/30 Filter registriert.

- Ratio exc. 405 nm/exc. 488 nm: Dieser Parameter stellt das reziproke Emissionsverhältnis der beiden Signale bei 405 nm und 488 nm dar.

Für jedes Experiment wurden 10^6 Zellen analysiert und sortiert. Die Darstellung der vom Durchflusszytometer gemessenen Zellen in der Software erfolgte durch sogenannte *Plots* (Kap. 3.5), in denen oben genannte Parameter gegeneinander aufgetragen werden.
Bei den konventionellen *Dot Plots* werden jeder gemessenen Zelle als sogenanntes Event je nach Eigenschaften bestimmte Koordinaten zugeordnet. Neben Zellen

werden jedoch auch Zelltrümmer und sonstige Verunreinigungen je nach Größe vom Durchflusszytometer als Event erkannt und dargestellt. Essentiell für die Analyse von *Plots* ist das Setzen von Regionen, mit deren Hilfe man Zellpopulationen voneinander unterscheiden und dem Durchflusszytometer exakte Anweisungen zum Sortieren der Events in einem oder mehreren dieser Bereiche geben kann. Einer Region können wiederum statistische Parameter zugeordnet werden (Kap. 3.5), zum Beispiel die Anzahl aller vorhandenen Partikel (*Events*), der prozentuale Anteil (*%Parent*) im Verhältnis zur Gesamtzahl aller Events sowie die durchschnittliche Fluoreszenzintensität über alle Events in dieser Region (*Median*).
Zur übersichtlicheren Darstellung von Populationsverschiebungen bei der Auftragung der Emissionsverhältnisse $R_{488/405}$ bzw. der reziproken Emissionsverhältnisse $R_{405/488}$ gegen FSC wurden am LSR II sogenannte *Density Plots* verwendet (Kap. 3.5). Bei dieser Darstellung werden Bereiche mit unterschiedlicher Dichte an *Events* (Zelldichten) innerhalb eines *Plots* durch Höhenlinien bzw. Farbvariationen wiedergegeben. Je heller der Farbton, desto höher ist Dichte an Events in einem bestimmten Bereich.

Durchführung:
Die erhaltenen Zellpellets (Kap 5.7.4) wurden in 5 ml Kaliumphosphatpuffer (50 mM; pH 8,0) ohne bzw. mit Substrat (2 % v/v) sowie ohne bzw. mit DMSO (3 % v/v) resuspendiert und für 45 min im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort am Durchflusszytometer analysiert.

5.10.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analytik

Die mit Hilfe des pHluorin-Assays auf verbesserte hydrolytische Aktivität gegenüber GBL selektierten Mutanten (Kap. 3.6.3.3) wurden mittels analytischer HPLC untersucht. Dabei wurde zunächst der Umsatz des Substrats mit ganzen Zellen durchgeführt und die Reaktionsprodukte analysiert: Für sämtliche Messungen wurde ein Shimadzu LC-10AT Liquid Chromatograph mit einer Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 µm Säule von Trentec verwendet. Als mobile Phase diente ein 50 mM Kaliumphosphatpuffer-Methanol-Gemisch im Verhältnis 95:5 bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Der Puffer hatte eine Konzentration von 50 mM mit einem pH-Wert von

8,0. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Shimadzu RF-10A Fluoreszenzdetektors bei 215 nm mit einer Detektortemperatur von 30°C sowie einer Laufzeit von 20 min.

6. Literaturverzeichnis

Al-Awqati, Q. (1999). One hundred years of membrane permeability: does Overton still rule? *Nature Cell Biology*, **1**, E201-E202.

Amaki, Y., Tulin, E.E., Ueda, S., Ohmiya, K. and Yamane, T. (1992). Purification and Properties of a Thermostable Esterase of Bacillus-Stearothermophilus Produced by Recombinant Bacillus-Brevis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **56**, 238-241.

Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C. and Zenke, M. (1987). Automated DNA Sequencing - Ultrasensitive Detection of Fluorescent Bands During Electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, **15**, 4593-4602.

Arnold, F.H. (1998). Design by directed evolution. *Accounts of Chemical Research*, **31**, 125-131.

Arnold, F.H. (2001). Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, **409**, 253-257.

Arnold, F.H. and Volkov, A.A. (1999). Directed evolution of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, **3**, 54-59.

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

Attfield, P., Gunasekera, T., Boyd, A., Deere, D. and Veal, D. (1999). Applications of flow cytometry to microbiology of food and beverage industries. *Australasian Biotechnology*, **9**, 159-166.

Balkenhohl, F., Ditrich, K., Hauer, B. and Ladner, W. (1997). Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation. *Journal Fur Praktische Chemie-Chemiker-Zeitung*, **339**, 381-384.

Bastiaens, P.I.H. and Pepperkok, R. (2000). Observing proteins in their natural habitat: the living cell. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 631-637.

Baumann, M. (2002). Dissertation.

Beckman, R.A., Mildvan, A.S. and Loeb, L.A. (1985). On the Fidelity of DNA-Replication - Manganese Mutagenesis Invitro. *Biochemistry*, **24**, 5810-5817.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513-1523.

Blackman, R.L., Spence, J.M., Field, L.M. and Devonshire, A.L. (1995). Chromosomal Location of the Amplified Esterase Genes Conferring Resistance to Insecticides in Myzus-Persicae (Homoptera, Aphididae). *Heredity*, **75**, 297-302.

Boder, E.T. and Wittrup, K.D. (2000). Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Pt C*, **328**, 430-444.

Bokman, S.H. and Ward, W.W. (1981). Renaturation of Aequorea Green-Fluorescent Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **101**, 1372-1380.

Booth, I.R. (1985). Regulation of Cytoplasmic Ph in Bacteria. *Microbiological Reviews*, **49**, 359-378.

Bornscheuer, U.T. (1998). Directed evolution of enzymes. *Angewandte Chemie-International Edition*, **37**, 3105-3108.

Bornscheuer, U.T. (2000). Directed evolution of enzymes. *Chimica Oggi-Chemistry Today*, **18**, 65-67.

Bornscheuer, U.T. (2001). Directed evolution of enzymes for biocatalytic applications. *Biocatalysis and Biotransformation*, **19**, 85-97.

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

Bornscheuer, U.T. and Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**, 137-143.

Boswell, C.D., Hewitt, C.J. and Macaskie, L.E. (1998). An application of bacterial cytometry: evaluation of the toxic effects of four heavy metals on Acinetobacter sp. with potential for bioremediation of contaminated waste water. *Biotechnology Letters*, **20**, 857-863.

Boyer, M.J. and Hedley, D.W. (1994). Measurement of Intracellular Ph. *Methods in Cell Biology, Vol 41*, **41**, 135-148.

Brannon, D.R., Mabe, J.A. and Fukuda, D.S. (1976). De-Esterification of Cephalosporin Para-Nitrobenzyl Esters by Microbial Enzymes. *Journal of Antibiotics*, **29**, 121-124.

Brayton, C.F. (1986). Dimethylsulfoxide (Dmso) - a Review. *Cornell Veterinarian*, **76**, 61-90.

Brejc, K., Sixma, T.K., Kitts, P.A., Kain, S.R., Tsien, R.Y., Ormo, M. and Remington, S.J. (1997). Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 2306-2311.

Bruno, M.E.C., Kaiser, A. and Montville, T.J. (1992). Depletion of Proton Motive Force by Nisin in Listeria-Monocytogenes Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 2255-2259.

Budde, B.B. and Jakobsen, M. (2000). Real-time measurements of the interaction between single cells of Listeria monocytogenes and nisin on a solid surface. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3586-3591.

Burton, S.G., Cowan, D.A. and Woodley, J.M. (2002). The search for the ideal biocatalyst. *Nature Biotechnology*, **20**, 37-45.

Campbell, L.L. (1958). Reductive Degradation of Pyrimidines .4. Purification and Properties of Dihydrouracil Hydrase. *Journal of Biological Chemistry*, **233**, 1236-1240.

Castanie-Cornet, M.P., Penfound, T.A., Smith, D., Elliott, J.F. and Foster, J.W. (1999). Control of acid resistance in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, **181**, 3525-3535.

Chalfie, M. and Kain, S. (1998). Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols. Wiley-Liss New York.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene-Expression. *Science*, **263**, 802-805.

Chang, C.C.J., Chen, T.T., Cox, B.W., Dawes, G.N., Stemmer, W.P.C., Punnonen, J. and Patten, P.A. (1999). Evolution of a cytokine using DNA family shuffling. *Nature Biotechnology*, **17**, 793-797.

Chattoraj, M., King, B.A., Bublitz, G.U. and Boxer, S.G. (1996). Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 8362-8367.

Chen, K.Q. and Arnold, F.H. (1993). Tuning the Activity of an Enzyme for Unusual Environments - Sequential Random Mutagenesis of Subtilisin-E for Catalysis in Dimethylformamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 5618-5622.

Chen, Y.R., Usui, S., Queener, S.W. and Yu, C.A. (1995). Purification and Properties of a P-Nitrobenzyl Esterase from Bacillus-Subtilis. *Journal of Industrial Microbiology*, **15**, 10-18.

Cherlet, M., Franck, P., Nabet, P. and Marc, A. (1999). Development and validation of a methodology for intracellular pH measurements of hybridoma cells under bioreactor culture conditions. *Biotechnology Progress*, **15**, 630-639.

Cherry, J.R., Lamsa, M.H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A. and Pedersen, A.H. (1999). Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology*, **17**, 379-384.

Cheville, A.M., Arnold, K.W., Buchrieser, C., Cheng, C.M. and Kaspar, C.W. (1996). rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in Escherichia coli O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 1822-1824.

Choi, K.D., Jeohn, G.H., Rhee, J.S. and Yoo, O.J. (1990). Cloning and Nucleotide-Sequence of an Esterase Gene from Pseudomonas-Fluorescens and Expression of the Gene in Escherichia-Coli. *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**, 2039-2045.

Christians, F.C., Scapozza, L., Crameri, A., Folkers, G. and Stemmer, W.P.C. (1999). Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling. *Nature Biotechnology*, **17**, 259-264.

Chung, C.T., Niemela, S.L. and Miller, R.H. (1989). One-Step Preparation of Competent Escherichia-Coli - Transformation and Storage of Bacterial-Cells in the Same Solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 2172-2175.

Ciolino, L.A., Mesmer, M.Z., Satzger, R.D., Machal, A.C., McCauley, H.A. and Mohrhaus, A.S. (2001). The chemical interconversion of GHB and GBL: Forensic issues and implications. *Journal of Forensic Sciences*, **46**, 1315-1323.

Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C.H. and Monticello, D.J. (2001). DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nature Biotechnology*, **19**, 354-359.

Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G. and Ward, W.W. (1993). Chemical-Structure of the Hexapeptide Chromophore of the Aequorea Green-Fluorescent Protein. *Biochemistry*, **32**, 1212-1218.

Cohen, N., Abramov, S., Dror, Y. and Freeman, A. (2001). In vitro enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million. *Trends in Biotechnology*, **19**, 507-510.

Copeland, G.T. and Miller, S.J. (1999). A chemosensor-based approach to catalyst discovery in solution and on solid support. *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 4306-4307.

Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38.

Cormier, M.J., Hori, K. and Anderson, J.M. (1974). Bioluminescence in Coelenterates. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **346**, 137-164.

Crameri, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P.C. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology*, **14**, 315-319.

Cubitt, A.B., Woolenweber, L.A. and Heim, R. (1999). Methods in Cell Biology.

Davenport, D. and Nicol, J.A.C. (1955). Luminescence in Hydromedusae. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **144**, 399-411.

Demirjian, D.C., Shah, P.C. and Moris-Varas, F. (1999). Screening for novel enzymes. *Biocatalysis - from Discovery to Application*, **200**, 1-29.

Dodson, G. and Wlodawer, A. (1998). Catalytic triads and their relatives. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**, 347-352.

Donnelly, M., Fedeles, F., Wirstam, M., Siegbahn, P.E. and Zimmer, M. (2001). Computational analysis of the autocatalytic posttranslational cyclization observed in histidine ammonia-lyase. A comparison with green fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society*, **123**, 4679-4686.

Dopf, J. and Horiagon, T.M. (1996). Deletion mapping of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Gene*, **173**, 39-44.

Eadie, G.S., Bernheim, F. and Bernheim, M.L.C. (1949). The Partial Purification and Properties of Animal and Plant Hydantoinases. *Journal of Biological Chemistry*, **181**, 449-458.

Faber, K. (2000). Biotransformations in Organic Chemistry. 4. Aufl., Springer Verlag, Berlin.

Farinas, E.T., Bulter, T. and Arnold, F.H. (2001). Directed enzyme evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**, 545-551.

Ferguson, G.P., Mclaggan, D. and Booth, I.R. (1995). Potassium Channel Activation by Glutathione-S-Conjugates in Escherichia-Coli - Protection against Methylglyoxal Is Mediated by Cytoplasmic Acidification. *Molecular Microbiology*, **17**, 1025-1033.

Foster, J.W. and Hall, H.K. (1991). Inducible Ph Homeostasis and the Acid Tolerance Response of Salmonella-Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, **173**, 5129-5135.

Freeman, M., Baehler, C. and Spotts, S. (1990). Automated Laser-Fluorescence Sequencing. *Bio-Technology*, **8**, 147-148.

Fukuda, H., Arai, M. and Kuwajima, K. (2000). Folding of green fluorescent protein and the cycle3 mutant. *Biochemistry*, **39**, 12025-12032.

Gaebler, O.H. and Keltch, A.K. (1926). On the metabolism of hydantoins and hydantoic acid. *Journal of Biological Chemistry*, **70**, 763-777.

Gerhartz, W. (1990). Enzymes in Industry. Wiley-VCH, Weinheim.

Giordano, A., Cannio, R., La Cara, F., Bartolucci, S., Rossi, M. and Raia, C.A. (1999). Asn249Tyr substitution at the coenzyme binding domain activates Sulfolobus solfataricus alcohol dehyrdrogenase and increases its thermal stability. *Biochemistry*, **38**, 3043-3054.

Gorenflo, V., Steinbuchel, A., Marose, S., Rieseberg, M. and Scheper, T. (1999). Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 765-772.

Grosse-Uhlmann, R. and Bley, T. (1999). A modular approach to situation identification of the dynamics of bacterial populations synthesizing poly-beta-hydroxybutyrate. *Bioprocess Engineering*, **21**, 191-200.

Haest, C.W.M., Degier, J., Vandeene.Ll, Verkleij, A.J. and Vanes, G.A. (1972). Fragility of Permeability Barrier of Escherichia-Coli. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **288**, 43-&.

Hastings, J.W. and Morin, J.G. (1969). Comparative Biochemistry of Calcium-Activated Photoproteins from Ctenophore, Mnemiopsis and Coelenterates Aequorea, Obelia, Pelagia and Renilla. *Biological Bulletin*, **137**, 402-&.

Heim, R., Cubitt, A.B. and Tsien, R.Y. (1995). Improved Green Fluorescence. *Nature*, **373**, 663-664.

Heim, R., Prasher, D.C. and Tsien, R.Y. (1994). Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, **91**, 12501-12504.

Hein, R. and Tsien, R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology*, **6**, 178-182.

Henke, E. (2001). Dissertation.

Henke, E. and Bornscheuer, U.T. (2002). Esterases from Bacillus subtilis and B. stearothermophilus share high sequence homology but differ substantially in their properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, **60**, 320-6.

Henke, E. and Bornscheuer, U.T. (2003). Fluorophoric assay for the high-throughput determination of amidase activity. *Analytical Chemistry*, **75**, 255-260.

Hermann, C., Lösche, A., Müller, S., Bley, T. and Babel, W. (1997). Flow cytometric discrimination between Acinetobacter calcoaceticus 69-V and Alcaligenes eutrophus JMP 134 by fluorescently labelled rRNA-targeted oligonucleotide probes and DNA staining. *Acta Biotechnologica*, **17**, 19-38.

Hersh, B.M., Farooq, F.T., Barstad, D.N., Blankenhorn, D.L. and Slonczewski, J.L. (1996). A glutamate-dependent acid resistance gene in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, **178**, 3978-3981.

Hucho, F. and Wallenfels, K. (1972). Glucono- -lactonase from Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta*, **276**, 176-9.

Inouye, S. and Tsuji, F.I. (1994). Aequorea Green Fluorescent Protein - Expression of the Gene and Fluorescence Characteristics of the Recombinant Protein. *Febs Letters*, **341**, 277-280.

Jabri, E., Carr, M.B., Hausinger, R.P. and Karplus, P.A. (1995). The Crystal-Structure of Urease from Klebsiella-Aerogenes. *Science*, **268**, 998-1004.

Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A. and Reetz, M.T. (2001). Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**, 519-530.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Vanheuvel, M. and Misset, O. (1994). Bacterial Lipases. *Fems Microbiology Reviews*, **15**, 29-63.

Jaeger, K.E. and Reetz, M.T. (2000). Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*, **4**, 68-73.

Jankowski, A., Kim, J.H., Collins, R.F., Daneman, R., Walton, P. and Grinstein, S. (2001). In situ measurements of the pH of mammalian peroxisomes using the

fluorescent protein pHluorin. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 48748-48753.

Kahana, J. and Silver, P.A. (1996). Current Protocols in Molecular Biology. Green and Wiley, New York.

Kanda, T., Sullivan, K.F. and Wahl, G.M. (1998). Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Current Biology*, **8**, 377-385.

Kaneko, M., Inoue, F. and Oda, T. (2000). Calcium associated resistance to H2O2 in Chinese hamster V79 cells. *Toxicology Letters*, **115**, 137-147.

Karagiannis, J. and Young, P.G. (2001). Intracellular pH homeostasis during cell-cycle progression and growth state transition in Schizosaccharomyces pombe. *Journal of Cell Science*, **114**, 2929-2941.

Klein, G. and Reymond, J.L. (1999). Enantioselective fluorogenic assay of acetate hydrolysis for detecting lipase catalytic antibodies. *Helvetica Chimica Acta*, **82**, 400-407.

Klibanov, A.M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology*, **15**, 97-101.

Klibanov, A.M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **409**, 241-246.

Kolb, V.A., Makeyev, E.V., Ward, W.W. and Spirin, A.S. (1996). Synthesis and maturation of green fluorescent protein in a cell-free translation system. *Biotechnology Letters*, **18**, 1447-1452.

Kolber, M.A., Quinones, R.R., Gress, R.E. and Henkart, P.A. (1988). Measurement of Cyto-Toxicity by Target-Cell Release and Retention of the Fluorescent Dye Bis-Carboxyethyl-Carboxyfluorescein (Bcecf). *Journal of Immunological Methods*, **108**, 255-264.

Koshland, D.E. (1994). Das Schlüssel-Schloß-Prinzip und die Induced-fit-Theorie. *Angew. Chem.*, **106**, 2469-2472.

Kouker, G. and Jaeger, K.E. (1987). Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 211-213.

Krebsfanger, N., Schierholz, K. and Bornscheuer, U.T. (1998a). Enantioselectivity of a recombinant esterase from Pseudomonas fluorescens towards alcohols and carboxylic acids. *Journal of Biotechnology*, **60**, 105-111.

Krebsfanger, N., Zocher, F., Altenbuchner, J. and Bornscheuer, U.T. (1998b). Characterization and enantioselectivity of a recombinant esterase from Pseudomonas fluorescens. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 641-646.

Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Poulaingodefroy, O. and Locht, C. (1995). Green Fluorescent Protein as a New Expression Marker in Mycobacteria. *Molecular Microbiology*, **17**, 913-922.

Kroll, R.G. and Booth, I.R. (1983). The Relationship between Intracellular Ph, the Ph Gradient and Potassium-Transport in Escherichia-Coli. *Biochemical Journal*, **216**, 709-716.

Kugimiya, W., Otani, Y. and Hashimoto, Y. (1992). Molecular cloning and structure of the gene for esterase from a thermophilic bacterium, Bacillus stearothermophilus IFO 12550. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 2074-2075.

Kurtzman, A.L., Govindarajan, S., Vahle, K., Jones, J.T., Heinrichs, V. and Patten, P.A. (2001). Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**, 361-370.

Lämmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **277**, 680-685.

Lebbink, J.H.G., Kaper, T., Bron, P., van der Oost, J. and de Vos, W.M. (2000). Improving low-temperature catalysis in the hyperthermostable Pyrococcus furiosus beta-glucosidase CelB by directed evolution. *Biochemistry*, **39**, 3656-3665.

Lee, S.G., Lee, D.C., Hong, S.P., Sung, M.H. and Kim, H.S. (1995). Thermostable D-Hydantoinase from Thermophilic Bacillus-Stearothermophilus Sd-1 - Characteristics of Purified Enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**, 270-276.

Lepecq, J.B. and Paoletti, C. (1967). A Fluorescent Complex between Ethidium Bromide and Nucleic Acids - Physical-Chemical Characterization. *Journal of Molecular Biology*, **27**, 87-&.

Leung, D.W., Chen, E. and Goeddel, D. V. (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique*, **1**, 11-15.

Levine, L.D. and Ward, W.W. (1982). Isolation and Characterization of a Photoprotein, Phialidin, and a Spectrally Unique Green-Fluorescent Protein

from the Bioluminescent Jellyfish Phialidium-Gregarium. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **72**, 77-85.

Li, X., Zhang, G., Ngo, N., Zhao, X., Kain, S.R. and Huang, C.C. (1997). Deletions of the Aequorea victoria green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *J Biol Chem*, **272**, 28545-9.

Li, Y., Arawal, A., Sakon, J. and Beitle, R.R. (2001). Characterization of metal affinity of green fluorescent protein and its purification through salt promoted, immobilized metal affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, **909**, 183-190.

Liese, A., Seelbach, K. and Wandrey, C. (2000). Industrial Biotransformations. Wiley-VCH, Weinheim.

Lin, J.S., Lee, I.S., Frey, J., Slonczewski, J.L. and Foster, J.W. (1995). Comparative-Analysis of Extreme Acid Survival in Salmonella-Typhimurium, Shigella-Flexneri, and Escherichia-Coli. *Journal of Bacteriology*, **177**, 4097-4104.

Lin, J.S., Smith, M.P., Chapin, K.C., Baik, H.S., Bennett, G.N. and Foster, J.W. (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 3094-3100.

Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. and Kenworthy, A. (2001). Studying protein dynamics in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2**, 444-456.

Liu, A.M.F., Somers, N.A., Kazlauskas, R.J., Brush, T.S., Zocher, F., Enzelberger, M.M., Bornscheuer, U.T., Horsman, G.P., Mezzetti, A., Schmidt-Dannert, C. and Schmid, R.D. (2001). Mapping the substrate selectivity of new hydrolases using colorimetric screening: lipases from Bacillus thermocatenulatus and Ophiostoma piliferum, esterases from Pseudomonas fluorescens and Streptomyces diastatochromogenes. *Tetrahedron-Asymmetry*, **12**, 545-556.

Low, N.M., Holliger, P. and Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: Affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *Journal of Molecular Biology*, **260**, 359-368.

Luria, S.E., Adams, J.N. and Ting, R.C. (1960). Transduction of Lactose-Utilizing Ability among Strains of E-Coli and S-Dysenteriae and the Properties of the Transducing Phage Particles. *Virology*, **12**, 348-390.

Machen, T.E., Leigh, M.J., Taylor, C., Kimura, T., Asano, S. and Moore, H.P.H. (2003). pH of TGN and recycling endosomes of H+/K+-ATPase-transfected

HEK-293 cells: implications for pH regulation in the secretory pathway. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **285**, C205-C214.

Miesenbock, G., De Angelis, D.A. and Rothman, J.E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, **394**, 192-195.

Misteli, T. and Spector, D.L. (1997). Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nature Biotechnology*, **15**, 961-964.

Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism. *Nature*, **191**, 144-&.

Moore, J.C. and Arnold, F.H. (1996). Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nature Biotechnology*, **14**, 458-467.

Morawski, B., Quan, S. and Arnold, F.H. (2001). Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnology and Bioengineering*, **76**, 99-107.

Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991). Molecular Genetic-Analysis of Fission Yeast Schizosaccharomyces-Pombe. *Methods in Enzymology*, **194**, 795-823.

Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971). Energy Transfer in a Bioluminescnet System. *Journal of Cellular Physiology*, **77**, 313-&.

Moris-Varas, F., Hartman, L. Shah, A. and Demirjian, D. C. (2001). Screening of hydrolase libraries using pH-shift reagents: rapid evaluation of enantioselectivity. *ACS Symp. Ser.*, **776**, 41-54.

Moris-Varas, F., Shah, A., Aikens, J., Nadkarni, N.P., Rozzell, J.D. and Demirjian, D.C. (1999). Visualization of enzyme-catalyzed reactions using pH indicators: Rapid screening of hydrolase libraries and estimation of the enantioselectivity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **7**, 2183-2188.

Mühlhardt, C. (2000). Der Experimentator: Molekularbiologie. 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.

Müller, S. and Hutter, K.J. (1999). Prozessoptimierung von Reinzucht- und Anstellverfahren mittels Flusscytometrie in sächsischen Brauereien. *Monatsschrift für Brauwissenschaften*, **3**, 40-48.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA Invitro - the Polymerase Chain-Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**, 263-273.

Nakamura, T., Tokuda, H. and Unemoto, T. (1982). Effects of Ph and Mono-Valent Cations on the Potassium-Ion Exit from the Marine Bacterium, Vibrio-Alginolyticus, and the Manipulation of Cellular Cation Contents. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **692**, 389-396.

Ogawa, J. and Shimizu, S. (1997). Diversity and versatility of microbial hydantoin-transforming enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **2**, 163-176.

Ogawa, J. and Shimizu, S. (1999). Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Trends in Biotechnology*, **17**, 13-21.

Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G. and Goldman, A. (1992). The Alpha/Beta-Hydrolase Fold. *Protein Engineering*, **5**, 197-211.

Olsen, M., Iverson, B. and Georgiou, G. (2000). High-throughput screening of enzyme libraries. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**, 331-337.

Olsen, M.J., Gam, J., Iverson, B.L. and Georgiou, G. (2003). High-throughput FACS method for directed evolution of substrate specificity. *Methods Mol Biol*, **230**, 329-42.

Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. and Remington, S.J. (1996). Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, **273**, 1392-1395.

Ostermeier, M., Shim, J.H. and Benkovic, S.J. (1999). A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nature Biotechnology*, **17**, 1205-1209.

Padan, E. and Schuldiner, S. (1994). Molecular Physiology of the Na+/H+ Antiporter in Escherichia-Coli. *Journal of Experimental Biology*, **196**, 443-456.

Palm, G.J., Zdanov, A., Gaitanaris, G.A., Stauber, R., Pavlakis, G.N. and Wlodawer, A. (1997). The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. *Nature Structural Biology*, **4**, 361-365.

Patel, R.N. (2001a). Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**, 587-604.

Patel, R.N. (2001b). Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug. *Biomolecular Engineering*, **17**, 167-182.

Peled, N. and Krenz, M.C. (1981). A New Assay of Microbial Lipases with Emulsified Trioleoyl Glycerol. *Analytical Biochemistry*, **112**, 219-222.

Pelletier, I. and Altenbuchner, J. (1995). A Bacterial Esterase Is Homologous with Nonheme Haloperoxidases and Displays Brominating Activity. *Microbiology-Uk*, **141**, 459-468.

Petersen, M. and Kiener, A. (1999). Biocatalysis - Preparation and functionalization of N-heterocycles. *Green Chemistry*, **1**, 99-106.

Powell, K.A., Ramer, S.W., del Cardayre, S.B., Stemmer, W.P.C., Tobin, M.B., Longchamp, P.F. and Huisman, G.W. (2001). Directed evolution and biocatalysis. *Angewandte Chemie-International Edition*, **40**, 3948-3959.

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. (1992). Primary Structure of the Aequorea-Victoria Green-Fluorescent Protein. *Gene*, **111**, 229-233.

Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A. and Baumeister, K. (1987). A System for Rapid DNA Sequencing with Fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides. *Science*, **238**, 336-341.

Puckett, L.G., Lewis, J.C., Bachas, L.G. and Daunert, S. (2002). Development of an assay for beta-lactam hydrolysis using the pH-dependence of enhanced green fluorescent protein. *Anal Biochem*, **309**, 224-31.

Purdy, R.E. and Kolattuk.Pe (1973). Depolymerization of a Hydroxy Fatty-Acid Biopolymer, Cutin, by an Extracellular Enzyme from Fusarium-Solani-F-Pisi - Isolation and Some Properties of Enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **159**, 61-69.

Rao, B.D.N., Kemple, M.D. and Prendergast, F.G. (1980). Proton Nuclear Magnetic-Resonance and Fluorescence Spectroscopic Studies of Segmental Mobility in Aequorin and a Green Fluorescent Protein from Aequorea-Forskalea. *Biophysical Journal*, **32**, 630-632.

Raven, J.A. and Smith, F.A. (1976). The evolution of chemiosmotic energy coupling. *J Theor Biol*, **57**, 301-12.

Reetz, M.T. (2000). Evolution in the test tube as a means to create enantioselective enzymes for use in organic synthesis. *Sci. Prog.*, **83**, 157-172.

Reetz, M.T. and Jaeger, K.E. (1999). Superior biocatalysts by directed evolution. *Biocatalysis - from Discovery to Application*, **200**, 31-57.

Reetz, M.T. and Jaeger, K.E. (2000a). Enantioselective enzymes for organic synthesis created by directed evolution. *Chemistry-a European Journal*, **6**, 407-412.

Reetz, M.T., Kuhling, K.M., Deege, A., Hinrichs, H. and Belder, D. (2000b). Super-high-throughput screening of enantioselective catalysts by using capillary array electrophoresis. *Angewandte Chemie-International Edition*, **39**, 3891-3893.

Rellos, P. and Scopes, R.K. (1994). Polymerase Chain Reaction-Based Random Mutagenesis - Production and Characterization of Thermostable Mutants of Zymomonas-Mobilis Alcohol Dehydrogenase-2. *Protein Expression and Purification*, **5**, 270-277.

Richmond, T.A., Takahashi, T.T., Shimkhada, R. and Bernsdorf, J. (2000). Engineered metal binding sites on green fluorescence protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **268**, 462-465.

Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K.F. and Scheper, T. (2001). Flow cytometry in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**, 350-360.

Roth, A.F. and Ward, W.W. (1983). Conformational stability after protease treatment in Aequorea GFP. *Photochemistry and Photobiology*, **37S**, 71.

Roth, B.L., Poot, M., Yue, S.T. and Millard, P.J. (1997). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX Green nucleic acid stain. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 2421-2431.

Saab-Rincon, G., Juarez, V.R., Osuna, J., Sanchez, F. and Soberon, X. (2001). Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein Engineering*, **14**, 149-155.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463-5467.

Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J.E. and Ryan, T.A. (2000). The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophysical Journal*, **79**, 2199-2208.

Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. and Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, **409**, 258-268.

Schmid, R.D. (2002). Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley-VCH, Weinheim.

Schmidt-Dannert, C. (2001). Directed evolution of single proteins, metabolic pathways, and viruses. *Biochemistry*, **40**, 13125-13136.

Schulze, B. and Wubbolts, M.G. (1999). Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, **10**, 609-615.

Schuster, S. (2001). Diplomarbeit.

Schwede, T.F., Retey, J. and Schulz, G.E. (1999). Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. *Biochemistry*, **38**, 5355-5361.

Shao, Z.X., Zhao, H.M., Giver, L. and Arnold, F.H. (1998). Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Research*, **26**, 681-683.

Sharp, P.A., Sugden, B. and Sambrook, J. (1973). Detection of 2 Restriction Endonuclease Activities in Haemophilus-Parainfluenzae Using Analytical Agarose-Ethidium Bromide Electrophoresis. *Biochemistry*, **12**, 3055-3063.

Shimizu, S. (2000). Vitamins and related compounds: microbial production. *Biotechnology Series*, **10**, 319-340.

Shimomura, O. (1979). Structure of the Chromophore of Aequorea Green Fluorescent Protein. *Febs Letters*, **104**, 220-222.

Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, **59**, 223-&.

Siemann, M., Alvarado-Marin, A., Pietzsch, M. and Syldatk, C. (1999). A D-specific hydantoin amidohydrolase: properties of the metalloenzyme purified from

Arthrobacter crystallopoietes. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **6**, 387-397.

Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R. and Haseloff, J. (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology*, **6**, 1653-1663.

Smith, G.P. (1994). Applied Evolution - the Progeny of Sexual Pcr. *Nature*, **370**, 324-325.

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. and Klenk, D.C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, **150**, 76-85.

Stemmer, W.P.C. (1994a). DNA Shuffling by Random Fragmentation and Reassembly - in-Vitro Recombination for Molecular Evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 10747-10751.

Stemmer, W.P.C. (1994b). Rapid Evolution of a Protein in-Vitro by DNA Shuffling. *Nature*, **370**, 389-391.

Syldatk, C., Cotoras, D., Dombach, G., Gross, C., Kallwass, H. and Wagner, F. (1987). Substratespecificity and Stereospecificity, Induction and Metallodependence of a Microbial Hydantoinase. *Biotechnology Letters*, **9**, 25-30.

Syldatk, C., May, O., Altenbuchner, J., Mattes, R. and Siemann, M. (1999). Microbial hydantoinases - industrial enzymes from the origin of life? *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 293-309.

Takahashi, A., Zhang, Y.P., Centonze, V.E. and Herman, B. (2001). Measurement of mitochondrial pH in situ. *Biotechniques*, **30**, 804-809.

Thayer, A.M. (2001). Biocatalysis. *Chemical & Engineering News*, **79**, 27-35.

Tietz, N.W. and Fiereck, E.A. (1966). A Specific Method for Serum Lipase Determination. *Clinica Chimica Acta*, **13**, 352-357.

Traub, P. (2000). Persönliche Mitteilung.

Tulin, E.E., Amaki, Y., Nagasawa, T. and Yamane, T. (1993). A Bacillus-Stearothermophilus Esterase Produced by a Recombinant Bacillus-Brevis Stabilized by Sulfhydryl Compounds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **57**, 856-857.

Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkarr, S. and Jones, T.A. (1994). The Sequence, Crystal-Structure Determination and Refinement of 2 Crystal Forms of Lipase-B from Candida-Antarctica (Vol 2, Pg 293, 1994). *Structure*, **2**, 453-454.

vanGennip, A.H., Abeling, N.G.G.M., Vreken, P. and vanKuilenburg, A.B.P. (1997). Inborn errors of pyrimidine degradation: Clinical, biochemical and molecular aspects. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **20**, 203-213.

Vartanian, J.P., Henry, M. and WainHobson, S. (1996). Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic Acids Research*, **24**, 2627-2631.

Vorlop, K.D.a.J., M. (1997). Immobilisierte Biokatalysatoren. *Biokonversion nachwachsender Rohstoffe*, **10**, 25-31.

Wang, C.W. and Liao, J.C. (2001a). Alteration of product specificity of Rhodobacter sphaeroides phytoene desaturase by directed evolution. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 41161-41164.

Wang, X.L. and Slavik, M.F. (1999). Rapid detection of Salmonella in chicken washes by immunomagnetic separation and flow cytometry. *Journal of Food Protection*, **62**, 717-723.

Wang, Y., Wang, G., O'Kane, D.J. and Szalay, A.A. (2001b). A study of protein-protein interactions in living cells using luminescence resonance energy transfer (LRET) from Renilla luciferase to Aequorea GFP. *Molecular and General Genetics*, **264**, 578-587.

Ward, B.M. and Moss, B. (2001). Visualization of intracellular movement of vaccinia virus virions containing a green fluorescent protein-B5R membrane protein chimera. *Journal of Virology*, **75**, 4802-4813.

Ward, W.W. and Bokman, S.H. (1982a). Reversible Denaturation of Aequorea Green-Fluorescent Protein - Physical Separation and Characterization of the Renatured Protein. *Biochemistry*, **21**, 4535-4540.

Ward, W.W. and Cormier, M.J. (1979). Energy-Transfer Protein in Coelenterate Bioluminescence - Characterization of the Renilla Green-Fluorescent Protein. *Journal of Biological Chemistry*, **254**, 781-788.

Ward, W.W., Prentice, H.J., Roth, A.F., Cody, C.W. and Reeves, S.C. (1982b). Spectral Perturbations of the Aequorea Green-Fluorescent Protein. *Photochemistry and Photobiology*, **35**, 803-808.

Wie, Y., Swenson, L., Kneusel, R. E., Matern, U. and Derewenda, Z. S. (1996). Crystallisation of a novel esterase which inactivates the macrolide toxin Brefeldin A. *Acta Cryst.*, **D52**, 1194-95.

Yamada, H., Takahashi, S., Kii, Y. and Kumagai, H. (1978). Microbial Transformation of Hydantoins to Amino-Acids .1. Distribution of Hydantoin Hydrolyzing Activity in Microorganisms. *Journal of Fermentation Technology*, **56**, 484-491.

Yamashiro, A., Kubota, K. and Yokozeki, K. (1988). Mechanism of Stereospecific Production of L-Amino-Acids from the Corresponding 5-Substituted Hydantoins by Bacillus-Brevis. *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**, 2857-2863.

Yang, F., Moss, L.G. and Phillips, G.N. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, **14**, 1246-1251.

You, L. and Arnold, F.H. (1996). Directed evolution of subtilisin E in Bacillus subtilis to enhance total activity in aqueous dimethylformamide (vol 9, pg 78, 1996). *Protein Engineering*, **9**, 719-719.

Zaks, A. (2001). Industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**, 130-136.

Zhang, J.H., Dawes, G. and Stemmer, W.P.C. (1997). Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 4504-4509.

Zhao, H.M., Chockalingam, K. and Chen, Z.L. (2002). Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 104-110.

Zhao, H.M., Giver, L., Shao, Z.X., Affholter, J.A. and Arnold, F.H. (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature Biotechnology*, **16**, 258-261.

Zhao, R., Natarajan, A. and Srienc, F. (1999). A flow injection flow cytometry system for on-line monitoring of bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **62**, 609-617.

Zhu, J.D., Musco, M.L. and Grace, M.J. (1999). Three-color flow cytometry analysis of tricistronic expression of eBFP, eGFP, and eYFP using EMCV-IRES linkages. *Cytometry*, **37**, 51-59.

Zimmer, M. (2002). Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical Reviews*, **102**, 759-781.

Zocher, F., Krebsfanger, N., Yoo, O.J. and Bornscheuer, U.T. (1998). Enantioselectivity of a recombinant esterase from Pseudomonas fluorescens. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **5**, 199-202.

Zocher, F., Trauthwein, H., Riermeier, T. H. and Dingerdissen, U. (2001). Neue Wege in der Biokatalyse. *Chemie in unserer Zeit*, **35**, 238-249.

Zock, J., Cantwell, C., Swartling, J., Hodges, R., Pohl, T., Sutton, K., Rosteck, P., Mcgilvray, D. and Queener, S. (1994). The Bacillus-Subtilis Pnba Gene Encoding P-Nitrobenzyl Esterase - Cloning, Sequence and High-Level Expression in Escherichia-Coli. *Gene*, **151**, 37-43.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Sascha Johannes Schuster
Geburtsdatum:	25.02.1974
Geburtsort:	Hechingen
Staatsangehörigkeit:	Österreichisch

Akademische Ausbildung

Juli 2001 bis Aug.2005	Doktorarbeit am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart Thema der Dissertation: Ein GFP-basierter *in vivo* Assay für das Hochdurchsatz-Screening nach Hydrolaseaktivität
Sep.2002 bis Feb. 2003	Teilnahme am South German Catalysis Course, Universität Ulm Erfolgreich absolvierte Klausuren in englischer Sprache über Biokatalyse, Homogene Katalyse, Katalytische Reaktoren, Industrielle Prozesse, Elektrokatalyse, Photokatalyse und Katalytische Theorien
1993 bis 2001	Diplom-Chemie an der Universität Stuttgart Thema der Diplomarbeit: Etablierung eines *in vivo* Assays zum Nachweis von Hydrolasen

Schulische Ausbildung

1984 bis 1993	Schickhardt Gymnasium in Herrenberg Abschluss: Allgemeines Abitur (Note: 2,6)
1980 bis 1984	Joseph-Haydn-Grundschule in Gärtringen-Rohrau