



Identifizierung und Struktur-basierte Optimierung biokatalytisch relevanter Alkohol-Dehydrogenasen

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alexander Schulz

aus
Essen

Forschungszentrum Jülich, 2008

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Werner Hummel
Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold
Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2008

*„As long as people use screws in wood, they'll be using the screwdriver.
PCR is to DNA as the screwdriver is to carpentry.“*

Kary Banks Mullis, Chemie-Nobelpreisträger 1993

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Hummel für die Überlassung des interessanten Themas, sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die konstruktiven Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ich bedanke mich für die finanzielle Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projekts: „BioProduktion: Designer-Mikroorganismen - Die Zelle als nachhaltige Fabrik“ (Förderkennzeichen: 0313440D).

Herrn Dr. Thomas Dausmann, Firma Jülich Chiral Solutions – a Codexis company, danke ich dafür, dass er mir die Gene für die ADH-T und ADH105 zur Verfügung gestellt hat.

Frau Dr. Andrea Weckbecker danke ich für die Überlassung der Metagenom-Bibliothek, aber natürlich auch für die vielen hilfreichen Diskussionen und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Frau Dipl.-Biol. Nina Richter danke ich für die Unterstützung am Gas-Chromatographen.

Allen Mitarbeitern des IMET und speziell den Kollegen aus Labor 306, allen voran Frau Dipl.-Biol. Annette Markert, Frau Dipl.-Biol. Stephanie Serci und Herrn Dipl.-Chem. Achim Heck, danke ich für die Hilfsbereitschaft, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit in Jülich.

Frau Dipl.-Biol. Angela Manser und Herrn Dr. Sascha Hausmann danke ich für die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes.

Herrn Dr. Thomas Drepper, Frau Dr. Susanne Wilhelm und Herrn Dr. Frank Rosenau danke ich für ihre fachlichen und persönlichen Ratschläge, die mir sehr wichtig sind.

Mein herzlichster und persönlichster Dank gebührt meinen Freunden, meiner Familie und meiner Freundin Miriam für die Unterstützung, die Motivation und die Geduld während der gesamten Promotionszeit.

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion:

Schulz, A. & Hummel, W. (2008)

Structure-guided Alteration of Coenzyme Specificity of *Thermoanaerobacter brockii* Alcohol Dehydrogenase from NADPH towards NADH by Iterative Saturation Mutagenesis
Journal of Biotechnology, submitted

Schulz, A. & Hummel, W. (2008)

Structure-Based Construction of Two Chimeric Short-Chain Alcohol Dehydrogenases.
Manuskript in Vorbereitung

Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis III

1	Einleitung	1
1.1	Enzyme – von der Entdeckung bis zum industriellen Einsatz.....	1
1.2	Alkohol-Dehydrogenasen und Cofaktor-Regenerierung.....	4
1.3	Enzymoptimierung durch <i>in vitro</i> Evolution.....	13
1.4	Motivation und Zielsetzung dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Mikroorganismen.....	19
2.1.2	Vektoren	20
2.1.3	Oligonukleotide	20
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.5	Geräte.....	22
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	23
2.2.1	Kultivierung von Mikroorganismen und Medien	23
2.2.2	Konservierung von Bakterienstämmen.....	23
2.2.3	Genexpression und Chaperon-Coexpression	23
2.2.4	Gewinnung von Rohextrakten	24
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	24
2.3.2	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	25
2.3.3	<i>In vitro</i> -Rekombination von DNA.....	25
2.3.4	Erstellung einer Genbank aus metagenomischer DNA, (Weckbecker, 2005b). 25	25
2.3.5	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	25
2.3.6	Sequenzierung von DNA	25
2.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR), (Mullis & Faloona, 1987)	25
2.3.8	Iterative Sättigungsmutagenese & QuikChange®-PCR.....	26
2.3.9	Kolonie-PCR.....	26
2.3.10	<i>overlap extension</i> -PCR, (Ho <i>et al.</i> , 1989).....	26
2.3.11	reverse Transkription (RT) – Herstellung von cDNA	26
2.3.12	Quantitative <i>real-time</i> -PCR	26
2.4	Analytische Methoden	27
2.4.1	Proteinmengenbestimmung und densitometrische Analyse	27
2.4.2	Aktivitätsassay für Alkohol-Dehydrogenasen.....	27
2.4.3	Nachweis von chiralen Alkoholen durch Gaschromatographie	28
2.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), (Laemmli, 1970).....	28
2.5	Chromatographische Methoden.....	29
2.5.1	Anionenaustausch-Chromatographie.....	29
2.5.2	Gelfiltrations-Chromatographie.....	29
2.5.3	Affinitäts-Chromatographie (IMAC), (Porath <i>et al.</i> , 1975)	29
2.6	Enzymatische Synthesen von Alkoholen mit Cofaktorregenerierung.....	29
2.6.1	Synthese mit substratgekoppelter Cofaktorregenerierung.....	29
2.6.2	Synthese mit enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung.....	30
2.7	Computerprogramme und Online-Datenbanken.....	31
2.8	Hochdurchsatz-Screening	31

3	Ergebnisse.....	32
3.1	Suche nach neuen Biokatalysatoren im Metagenom-Ansatz.....	32
3.1.1	Isolierung und Klonierung metagenomischer DNA (Weckbecker, 2005b)	32
3.1.2	Rekultivierung und Expression der Metagenom-Klone	33
3.1.3	Entwicklung eines geeigneten Hochdurchsatz-Screening-Assays	34
3.1.4	Identifizierung von Klonen mit Dehydrogenase-Aktivität	35
3.1.5	Sequenzbetrachtungen zur putativen Oxidoreduktase ORM1	37
3.1.6	Isolierung, Amplifizierung und Klonierung einer putativen Oxidoreduktase aus der metagenomischen DNA-Bibliothek.....	39
3.1.7	Expression und Aktivität der putativen Oxidoreduktase	40
3.2	Kombination biokatalytisch relevanter Eigenschaften zweier Alkohol-Dehydrogenasen in chimären ADHs	43
3.2.1	Klonierung, heterologe Expression und Substratspektrum der ADH105.....	43
3.2.2	Reinigung der ADH105	47
3.2.3	Bestimmung der Masse des nativen Holoenzymmultimers ADH105	49
3.2.4	Sequenz- und Strukturanalyse von ADH105 und ADH- <i>Lb</i>	50
3.2.5	Erstellung und Klonierung von zwei chimären <i>adh</i> -Genen	53
3.2.6	Heterologe Expression, Expressionsoptimierung und Stabilitätsbetrachtungen der chimären ADHs	54
3.2.7	Biochemische Charakteristika der chimären ADHs	60
3.3	Änderung der Cofaktor-Spezifität der 2°ADH aus <i>Thermoanaerobacter</i> sp. von NADP(H) zu NAD(H) mit Methoden der gerichteten Evolution.....	64
3.3.1	Klonierung, heterologe Expression, Reinigung und biochemische Charakteristika der 2°ADH aus <i>Thermoanaerobacter</i> sp. (ADH- <i>T</i>).....	64
3.3.2	Sequenz- und Strukturanalyse der ADH- <i>T</i>	68
3.3.3	Iterative Sättigungsmutagenese von ADH- <i>T</i>	69
3.3.4	Expression und Screening der ADH- <i>T</i> Mutantenbibliotheken.....	72
3.3.5	Identifizierung und Isolierung NAD-abhängiger ADH- <i>T</i> Mutanten.....	73
3.3.6	Biochemische Charakterisierung NAD-abhängiger ADH- <i>T</i> Mutanten.....	74
4	Diskussion und Ausblick.....	79
4.1	Das Metagenom als Quelle für neue Biokatalysatoren.....	79
4.2	Kombination biokatalytisch relevanter Eigenschaften in chimären ADHs.....	83
4.3	ADH- <i>T</i> : Änderung der Cofaktor-Spezifität von NADP zu NAD durch iterative Sättigungsmutagenese.....	87
5	Zusammenfassung / Summary	91
	Literaturverzeichnis.....	94
	Anhang	107
	Lebenslauf.....	119

Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADH-C1/2	Alkohol-Dehydrogenase Chimäre 1 bzw. 2
ADH-Lb	Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
ADH-T	Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Thermoanaerobacter</i> sp.
AIM	Autoinduktions Medium
A. dest	Aqua destillata
Ap	Ampicillin
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	complementary DNA
°C	Grad Celsius
Cm	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DW	<i>DeepWell</i> -Platten
EAA	Ethylacetoacetat (3-Oxo-Buttersäure-ethylester)
EC	Enzyme Comission
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FDH	Formiat Dehydrogenase
g	Gramm
GDH	Glucose Dehydrogenase
Gm	Gentamycin
GZE	Gesamtzellextrakt
h	Stunden
IB	<i>inclusion bodies</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ISM	Iterative Sättigungsmutagenese
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	Molar
mA	Milliampere
Mbp	Megabasenpaare

MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MDR	<i>medium-chain</i> Dehydrogenase/Reduktase
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MTP	Mikrotiterplatten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NAD/NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert/reduziert)
NADP/NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (oxidiert/reduziert)
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
nm	Nanometer
OD ₅₈₀	optische Dichte, gemessen bei 580 nm
<i>oe</i> PCR	<i>overlap extension</i> PCR
ori	<i>origin of replication</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PT7 _{lac}	Lactose/IPTG-induzierbarer T7-Promoter
<i>Rf</i>	Rossmann <i>fold</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDR	<i>short-chain</i> Dehydrogenase/Reduktase
Sm	Streptomycin
TB	<i>terrific broth</i>
Tet	Tetrazyklin
TEA	Triethanolamin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> / Enzymeinheit
UE	Untereinheit
ÜK	Übernachtkultur
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Abbildung 1: Strukturformel Atorvastatin.....	3
Abbildung 2: Allgemeine Reaktionsgleichung für eine ADH-katalysierte Carbonyl-Reduktion.....	4
Abbildung 3: Sekundärstruktur der ADH- <i>T</i>	6
Abbildung 4: Alignment der Cofaktor-Bindestellen verschiedener NAD-/NADP-abhängiger.....	7
Abbildung 5: Schematische Strukturen von NAD (links) und NADP (rechts).....	8
Abbildung 6: Allgemeine Reaktionsgleichung für eine kontinuierliche Cofaktor-Regenerierung.....	10
Abbildung 7: Allgemeine Reaktionsgleichung für eine ADH-katalysierte Ketonreduktion.....	27
Abbildung 8: Substratgekoppelte Cofaktorregenerierung.....	30
Abbildung 9: Enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung.....	30
Abbildung 10: Schritte der DNA-Isolierung aus einem Spültuch.....	32
Abbildung 12: Vorhersage von posttranslationalen Modifikationen für ORM1 - Phosphorylierung.....	38
Abbildung 11: Teil der Primärstruktur von ORM1.....	38
Abbildung 13: Agarosegelelektrophorese des PCR-Produkts <i>orm1</i>	40
Abbildung 14: ADH105-katalysierte Umsetzung von 4-Cl-EAA zu (<i>S</i>)-4-Cl-3-HBEE.....	46
Abbildung 15: SDS-PAGE ADH105 nach Anionenaustauschchromatographie.....	47
Abbildung 16: SDS-PAGE des IMAC-Reinigungsverlaufs ADH105::His ₆	48
Abbildung 17: Ausschnitt aus dem Gelfiltrations-Chromatogramm von ADH105.....	49
Abbildung 18: Alignment von ADH105 und ADH- <i>Lb</i>	50
Abbildung 19: Vergleich der Sekundärstrukturen von ADH105 und ADH- <i>Lb</i>	51
Abbildung 20: Strukturüberlagerung von ADH105 (weiß) und ADH- <i>Lb</i> (pink).....	51
Abbildung 21: Exemplarisches Klonierungsschema des chimären <i>adh</i> -Gens.....	53
Abbildung 22: Agarosegel-Elektrophorese der einzelnen PCR-Schritte zur Erstellung von <i>adh-C2</i>	53
Abbildung 23: SDS-PAGE Analyse der Expression chimärer <i>adh</i> -Gene in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	55
Abbildung 24: Auswertung der RT- <i>real time</i> -PCR.....	56
Abbildung 25: SDS-PAGE Analyse der <i>adh-C1/2</i> -Chaperon-Coexpression.....	57
Abbildung 26: SDS-PAGE der Expression von <i>adh-C1/2</i> in <i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3) RIL.....	58
Abbildung 27: Aktivitätsverlauf nach Expression von 4 <i>adh</i> -Genen in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	59
Abbildung 28: (<i>R</i>)-1-Phenylethanol-Bildung durch ADH105, ADH- <i>Lb</i> sowie ADH-C1/2.....	63
Abbildung 29: SDS-PAGE ADH- <i>T</i> nach Hitzedenaturierung und Anionenaustausch-Chromatographie.....	66
Abbildung 30: 3D-Strukturvorhersage der NADP-Koordination in ADH- <i>T</i>	69
Abbildung 31: Agarosegel-Elektrophorese der QuikChange TM -PCR <i>adh-T_{mut}</i>	71
Abbildung 32: Schematischer Ablauf der ISM ADH- <i>T</i> und eine Übersicht über die identifizierten Mutanten....	74
Abbildung 33: SDS-PAGE und Aktivitäts-Analyse wildtypischer ADH- <i>T</i> sowie der 4 Mutanten.....	75
Abbildung 34: (<i>S</i>)-1-Phenylethanol-Bildung durch die ADH- <i>T</i> und 4 NAD-abhängigen ADH- <i>T</i> Mutanten.....	77
Abbildung 35: Lagerstabilität der Wt-ADH- <i>T</i> sowie der 4 ADH- <i>T</i> -Mutanten bei 4 °C.....	78
Abbildung 36: Ladungsverteilung Cofaktor-Bindetaschen von ADH- <i>T</i> Wildtyp und Mutanten.....	87
Tabelle 1: Übersicht über die grundlegenden Charakteristika von SDR und MDR.....	4
Tabelle 2: Cofaktorkpreise in €/mol (Stand 09/2008, Carl Roth GmbH & Co. KG).....	9
Tabelle 3: Enzyme / Substrate zur Cofaktor-Regenerierung.....	11
Tabelle 4: Übersicht über die gebräuchlichsten Methoden der gerichteten Evolution.....	15
Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.....	19
Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Vektoren.....	20
Tabelle 7: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.....	21
Tabelle 8: Übersicht über die Entwicklung des Metagenomscreenings.....	36
Tabelle 9: In <i>orm1</i> vorkommende Codons, die in <i>E. coli</i> K12 nicht häufig genutzt werden.....	39
Tabelle 10: Aktivitäten von ORM1 nach konstitutiver Expression in <i>E. coli</i> TOP10.....	42
Tabelle 11: Gegenüberstellung einiger Charakteristika von ADH105 und ADH- <i>Lb</i>	43
Tabelle 12: Substratspektrum der ADH105.....	45
Tabelle 13: Komposition und Struktur der geplanten synthetischen ADH-Chimären.....	52
Tabelle 14: Übersicht über die Aktivitäten der chimären ADHs und der parentalen Proteine.....	60
Tabelle 15: Kinetische Konstanten für den Cofaktor NADH von ADH105 und ADH-C1/2.....	61
Tabelle 16: Kinetische Konstanten von ADH105, ADH- <i>Lb</i> und ADH-C1/2 für verschiedene Substrate.....	62
Tabelle 17: Übersicht über die Aktivitäten der ADH- <i>T</i>	66
Tabelle 18: Nomenklatur für degenerierte DNA nach NC-IUB. (Liebecq, 1997).....	70
Tabelle 19: Kinetische Konstanten von ADH- <i>T</i> und den 4 NAD-abhängigen Mutanten.....	76

1 Einleitung

1.1 Enzyme – von der Entdeckung bis zum industriellen Einsatz

Seit Mitte des 18. Jahrhunderts ist bekannt, dass Fleisch durch Magensäfte verdaut wird und sowohl Pflanzen-Extrakte als auch Speichel Stärke in Zucker umwandeln können (de Réaumur, 1752). Im Jahre 1833 entdeckten die französischen Chemiker Anselme Payen und François Persoz in einer Malzlösung das erste Enzym, das sie „Diastase“ nannten. Dabei handelte es sich um jenes stärke-spaltende Enzym, welches heute unter dem Namen „Amylase“ bekannt ist. Louis Pasteur und Wilhelm Kühne fanden heraus, dass die alkoholische Gärung ein Prozess ist, der auf ein Hefe-„Ferment“ zurückzuführen ist. Der Begriff „Ferment“ wurde 1878 von Wilhelm Friedrich Kühne durch „Enzym“ abgelöst. Es deutet in seiner Wortherkunft direkt auf das damalige Einsatzgebiet der Enzyme hin und setzt sich aus den griechischen Wörtern „en“ (= in) und „zyme“ (= Sauerteig, gleichbedeutend mit Hefe) zusammen (Kluge, 2002). Die Entdeckung der „zellfreien Gärung“ durch Eduard Buchner war ein weiterer essentieller Schritt im Verständnis der Funktionsweise von Enzymen (Buchner, 1897) und wurde 1907 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde entdeckt, dass es sich bei Enzymen um Proteine handelt, die kristallisiert werden können und auch in reiner Form ihre katalytische Aktivität behalten. Für diese Erkenntnis erhielten J. B. Sumner, J. H. Northrop und W. M. Stanley im Jahre 1946 den Nobelpreis für Chemie und bereiteten den Weg für die moderne Struktur-Biologie. Im Jahre 1965 gelang es, die räumliche Struktur von Lysozym in einer Auflösung von 2 Ångström darzustellen (Blake *et al.*, 1965) – ein entscheidender Schritt im Verständnis der Funktionsweise von Enzymen. Thermodynamisch katalysieren Enzyme biochemische Reaktionen durch Herabsetzen der Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger . Die meisten der katalysierten Reaktionen würden ohne Enzyme gar nicht oder nur extrem langsam ablaufen (Fersht, 1985). Die Reaktionsgeschwindigkeit wird teilweise um das bis zu 1000-fache erhöht (Radzicka & Wolfenden, 1995; Neet, 1998). Das von Emil Fischer im Jahre 1894 postulierte „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ für die Interaktion zwischen Enzym und Substrat (Fischer, 1894) wurde in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts durch das so genannte „*induced-fit*-Prinzip“ abgelöst. In diesem Zusammenhang werden die Enzyme nicht als starre Protein-Strukturen, sondern vielmehr als dynamische Objekte angesehen, die Ihre Konformation zur Interaktion mit dem spezifischen Substrat verändern (Koshland, 1958).

Mit der steigenden Anzahl der entdeckten Enzyme wurden diese alsbald von der „*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*“ in sechs Klassen unterteilt. Die Klassifizierung erfolgte nach der Funktion der Enzyme, die mit so genannten *EC*-Nummern (*Enzyme Classification*) identifiziert werden konnten (IUBMB, 1992). Die Enzyme wurden wie folgt gruppiert:

<i>EC 1</i>	Oxidoreduktasen	katalysieren Redoxreaktionen
<i>EC 2</i>	Transferasen	katalysieren die Übertragung funktioneller Gruppen
<i>EC 3</i>	Hydrolasen	katalysieren die Bindungsspaltung unter H ₂ O-Verbrauch
<i>EC 4</i>	Lyasen	katalysieren Synthesen oder Spaltungen ohne ATP-Einsatz
<i>EC 5</i>	Isomerasen	katalysieren die Umwandlung von chemischen Isomeren
<i>EC 6</i>	Ligasen	katalysieren Synthesen oder Spaltungen mit ATP-Einsatz

Mit der erstmaligen Erzeugung rekombinanter DNA in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts und der Möglichkeit, Enzyme heterolog (vornehmlich in Bakterien und Hefen) zu exprimieren, wurde eine entscheidende Grundlage für die moderne Biotechnologie geschaffen (Cohen *et al.*, 1973).

Enzyme finden dabei hauptsächlich Einsatz im Bereich der Waschmittel, der Lebensmittel-Verarbeitung, der Diagnostik und der „Weißen Biotechnologie“, die sich mit der industriellen Herstellung von Feinchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen befasst. Abgesehen von den meist milderen Reaktionsbedingungen, der besseren Umweltbilanz und den im Vergleich zur chemischen Synthese oft höheren Ausbeuten haben in isolierter Form eingesetzte Enzyme einen entscheidenden Vorteil: Sie sind in der Regel hoch chemo-, regio- und stereo-selektiv und deshalb dazu in der Lage, chirale Moleküle enantiomerenrein darzustellen (Wong & Whitesides, 1994; Rasor & Voss, 2001; Schmid *et al.*, 2001; Schoemaker *et al.*, 2003; Breuer *et al.*, 2004). Heutzutage werden über 500 Produkte durch enzymatische Synthesen hergestellt (Johannes & Zhao, 2006).

Die Herstellung enantiomerenreiner Alkohole spielt in der Weißen Biotechnologie eine übergeordnete Rolle, da sie so genannte „*building blocks*“ in der pharmazeutischen Industrie sind (Wills *et al.*, 1999; Wills & Hannedouche, 2002). Spätestens seitdem die US-amerikanische FDA (*Food and Drug Administration*) den Einsatz enantiomerenreiner Wirkstoffe in Medikamenten vorschreibt, ist die biokatalytische Herstellung von Chiralika auf dem Vormarsch (FDA, 1992; O'Brien & Vanasse, 2000; Rouhi, 2004). Medikamente, deren enantiomerenreine Bausteine enzymatisch hergestellt wurden, sind zum Beispiel Blutdrucksenker wie Omapatrilat sowie Melatonin-Rezeptor-Antagonisten und β 3-Rezeptor-

Antagonisten (Patel *et al.*, 2003; Patel, 2003; Patel, 2006). Ein anderes prominentes Beispiel aus dem Bereich der pharmazeutischen Biotechnologie ist der Blutfettsenker Atorvastatin. Atorvastatin gehört zur Klasse der Statine, die als 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Inhibitoren die Cholesterin-Biosynthese unterbrechen. Es ist das weltweit am meisten verkaufte Medikament überhaupt und wird in Deutschland unter dem Handelsnamen Sortis[®] von der Firma Pfizer vertrieben. Die in Abbildung 1 rot dargestellte Seitenkette des Atorvastatins wird durch chemoenzymatische Reduktion einer prochiralen Ketonvorstufe, katalysiert durch die ADH aus *Lactobacillus brevis*, dargestellt (Müller, 2005; Wolberg *et al.*, 2008).

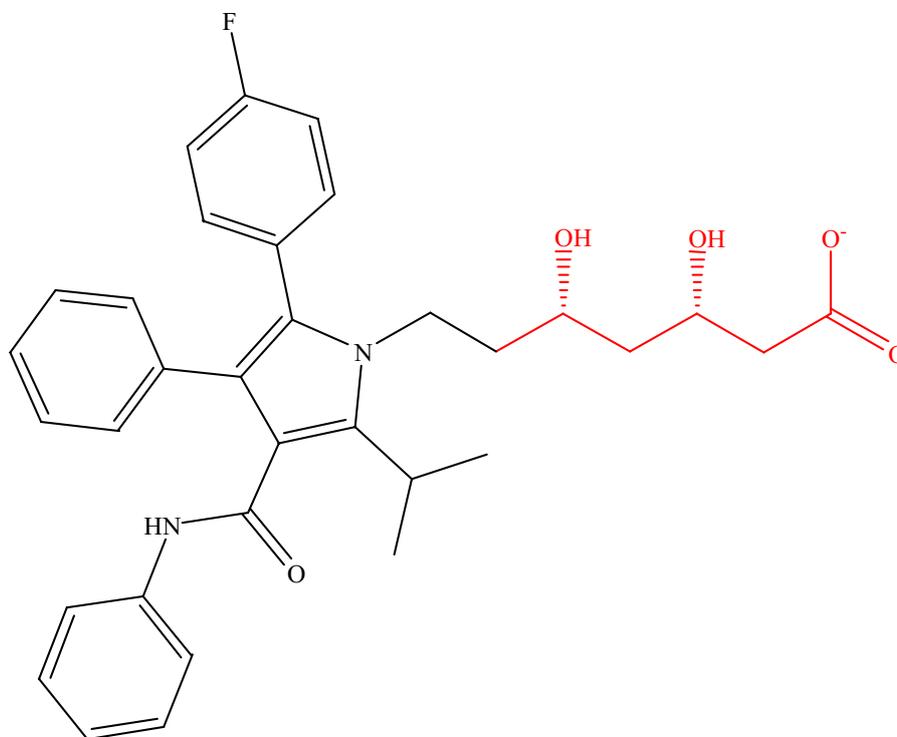


Abbildung 1: Strukturformel Atorvastatin.

Die rot dargestellte Statin-Seitenkette wird chemoenzymatisch synthetisiert.

1.2 Alkohol-Dehydrogenasen und Cofaktor-Regenerierung

Auf biokatalytischem Wege werden enantiomerenreine Alkohole in den meisten Fällen durch die Stereo-spezifische Reduktion prochiraler Ketone durch Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) gewonnen. ADHs gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen. Ihre *EC*-Klassifizierung (1.1.1.x) deutet dabei auf ihren Stellenwert in der Enzymologie hin. Bei der Stereo-spezifischen Reduktion prochiraler Ketone zu den entsprechenden chiralen Alkoholen benötigen ADHs ein Reduktionsäquivalent als Elektronen-Donor. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um NADH bzw. NADPH, seltener FAD oder FMN. Eine allgemeine Reaktionsgleichung ist in Abbildung 2 dargestellt.

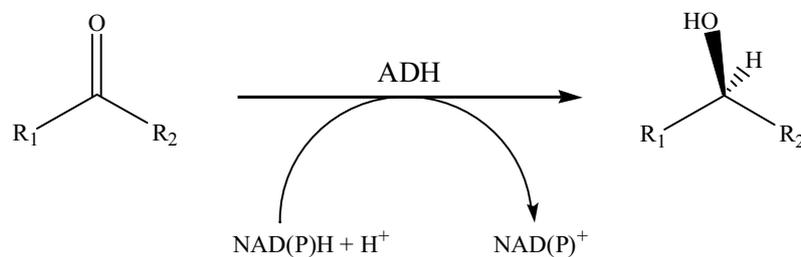


Abbildung 2: Allgemeine Reaktionsgleichung für eine ADH-katalysierte Carbonyl-Reduktion.

Ist $\text{R}_1 \neq \text{R}_2$, so ist das gebildete Produkt ein chiraler Alkohol.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Alkohol-Dehydrogenasen gehören entweder zur Gruppe der *short-chain* Dehydrogenasen (SDR) oder *medium-chain* Dehydrogenasen (MDR) (Jörnvall *et al.*, 1999). Jede Klasse weist ihre jeweiligen Charakteristika auf, einen Überblick bietet Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über die grundlegenden Charakteristika von SDR und MDR.

SDR = *short-chain* Dehydrogenasen, MDR = *medium-chain* Dehydrogenasen, UE = Untereinheit

	SDR	MDR
Aminosäuren pro UE	ca. 250	ca. 350
Quartärstruktur	meist Di- oder Tetramere	meist Tetramere
Cofaktor-Bindemotiv	GxxxGxG	GxGxxG
Lokalisation im Protein	N-terminal	mittig oder C-terminal
Metallabhängigkeit	selten (Mg^{2+})	häufig (Zn^{2+})
in dieser Arbeit	ADH-Lb, ADH105, ADH-C1/2	ADH-T

Biotechnologisch sind ADHs von herausragender Bedeutung, da sie wie eingangs erwähnt prochirale Ketone chemo-, regio- und stereo-selektiv zu chiralen Alkoholen reduzieren können. Die erste ADH, die für solche Umsetzungen genutzt wurde, ist die Pferdeleber ADH (*horse-liver* ADH, HL-ADH), die lange als Modell-Enzym für die Klasse der Alkohol-Dehydrogenasen genutzt wurde. Die HL-ADH wird heute zu den NAD-abhängigen MDRs gezählt, die zudem Zn^{2+} -Abhängigkeit aufweisen. Der grundlegende Reaktionsmechanismus wurde verstanden, nachdem es in den 70er Jahren gelang, die katalytisch aktive Konformation der HL-ADH durch Röntgenstrukturanalyse aufzuklären. Es handelt sich dabei um ein Homo-Dimer, das an jeder Untereinheit eine Cofaktor-Bindetasche und eine Substrat-Bindetasche aufweist. Der Cofaktor wird dabei in einem klassischen „Rossmann *fold*“ gebunden. Durch die dadurch induzierte Konformationsänderung (*induced fit*) bildet sich eine hydrophobe Tasche, in der das Substrat mit seiner Keto- bzw. Hydroxy-Funktion in Richtung des katalytischen Zink-Ions ausgerichtet ist. Durch diese Polarisierung wird der Übergang des Wasserstoffs zwischen Cofaktor und Substrat ermöglicht (Sund & Theorell, 1963; Brändén *et al.*, 1975; Rossmann *et al.*, 1975; Eklund *et al.*, 1976a; Eklund *et al.*, 1976b; Pettersson, 1987; Pettersson & Eklund, 1987).

Auch die in dieser Arbeit behandelten ADHs zeigen das spezifische Faltungsmuster im Bereich der Cofaktor-Bindestelle. Sie alle binden die Nicotinamid-Cofaktoren NAD(H) bzw. NADP(H) in dem angesprochenen Rossmann *fold* (Rf). Dabei handelt es sich um ein charakteristisches Strukturmerkmal in der Sekundärstruktur der Proteine. Der Rossmann *fold* besteht aus einer alternierenden Abfolge von drei β -Faltblättern und zwei α -Helices ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$) (Rao & Rossmann, 1973; Rossmann *et al.*, 1974; Rossmann *et al.*, 1975; Rossmann & Argos, 1978; Rossmann & Argos, 1981). In Abbildung 3 ist die Lokalisation des Rossmann *folds* am Beispiel der Sekundärstruktur der ADH-T aus *Thermoanaerobacter* sp. dargestellt.

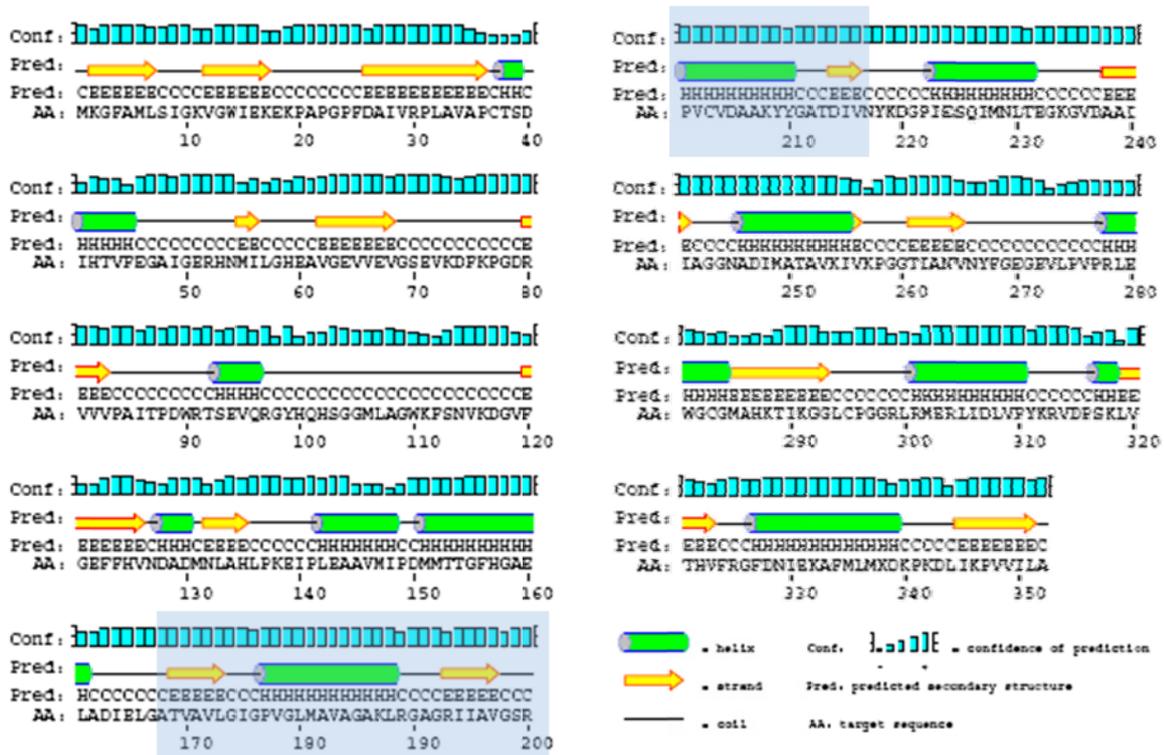


Abbildung 3: Sekundärstruktur der ADH-T.

Hellblau unterlegt ist der Bereich des „Rossmann *fold**“ ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$). α -Helices sind als grüne Rohre und β -Faltblätter als gelbe Pfeile dargestellt. Sekundärstrukturvorhersage mit PSIPred (2.7).

Im R_f -Bereich $\beta_1\alpha_1$ beginnt in der Regel das hoch konservierte Glycin-reiche Motiv innerhalb der Aminosäuresequenz der ADHs. Etwa 20 – 25 Aminosäuren C-terminal des letzten Glycins aus diesem Motiv befindet sich im Fall von NAD-abhängigen Enzymen ein polarer bis negativ geladener Abschnitt, im Fall von NADP-abhängigen Enzymen ein positiv geladener Abschnitt innerhalb der Sequenz ($\beta_2\alpha_2\beta_3$). Diese Charakteristika lassen sich gut an einem exemplarischen Alignment der Cofaktor-Bindestellen verschiedener NAD-/NADP-abhängiger *short-chain* und *medium-chain* ADHs verdeutlichen (Abbildung 4). Obwohl es sich um ADHs aus unterschiedlichen Organismenreihen handelt, findet man in allen das konservierte Glycin-reiche Motiv.

short-chain Dehydrogenasen

	• • •	+	
<i>R.eutropha</i>	VAIVTGAGSGFGAAIARAFIQAGAK~VVLADIDRDAVQRL		(NAD)
<i>D.melanogaster</i>	VIFVAGASLGIGLDTSKELLKRDLKKNLVILDRIENPAAIA		(NAD)
<i>A.niger</i>	HILVIGATAGIGRALASRFVQSGAKVTVVGRRKERLDEFV		(NADP)
<i>L.brevis</i>	VAIITGGTLGIGLAIATKFVEEGAKVMITGRHSDVGEKAA		(NADP)
<i>L.kefir</i>	VAIVTGGTLGIGLAIADKFVEEGAKVVITGRHADVGEKAA		(NADP)
<i>P.furiosus</i>	VAVITGASRGIGEAIKALAEDGYSLALGARSVDRLEKIA		(NADP)

medium-chain Dehydrogenasen

	• • •	+	
<i>S.cerevisiae</i>	WVAISGAGGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGEGKEELFRS		(NAD)
<i>R.erythropolis</i>	YAVVIGTGGLGHVAIQLLRHLAATVIALDVSADKLELAT		(NAD)
<i>T.brockii</i>	TVAVLGIGPVGLMAVAGAKLRGAGRI IAVGSRPVCVDAK		(NADP)
<i>C.beijerinckii</i>	SVVVIGIGAVGLMGIAGAKLRGAGRI IGVGSRPICVEAAK		(NADP)
<i>A.niger</i>	RVGIIGVGGGLGHFGVLLAKAMGA~DKVVAISRKTGKANDA		(NADP)
<i>R.perezi</i>	TCAVFGGLGGVGFSAIVGCKAAGASRI IGVGTHKDKFKAI		(NADP)

Abbildung 4: Alignment der Cofaktor-Bindestellen verschiedener NAD-/NADP-abhängiger *short-chain* und *medium-chain* ADHs.

Die charakteristischen Glycin-reichen Motive sind durch Punkte gekennzeichnet, die über die Cofaktor-Präferenz diskriminierende Aminosäure ist durch ein + hervorgehoben.

In Abbildung 4 ist deutlich zu erkennen, dass in NADP-abhängigen Enzymen an der über die Cofaktor-Präferenz diskriminierenden Aminosäureposition basische (positiv geladene) Reste (R, K, H) zu finden sind, während in NAD-abhängigen ADHs polare bis negative Aminosäurereste (D, E, I, S) vorliegen.

Der Grund hierfür wird klar, wenn man die strukturellen Unterschiede der beiden Nicotinamid-Cofaktoren betrachtet (Abbildung 5). NAD(H) und NADP(H) unterscheiden sich lediglich durch den an 2'-Position veresterten Phosphatrest am Adenosinring. Dieser negative Phosphatrest wechselwirkt unter anderem mit den positiv geladenen Aminosäuren C-terminal des Glycin-reichen Motives. Befinden sich in diesem Bereich ebenfalls negative Ladungen, kommt es zu elektrostatischen Abstoßungen zwischen Enzym und Cofaktor. Dies ist ein Grund für die oft strikte Präferenz der Enzyme für einen der beiden Cofaktoren. Auf die konkrete Architektur der Cofaktor-Bindestellen der in dieser Arbeit verwendeten ADHs wird an entsprechender Stelle im Ergebnisbereich eingegangen.

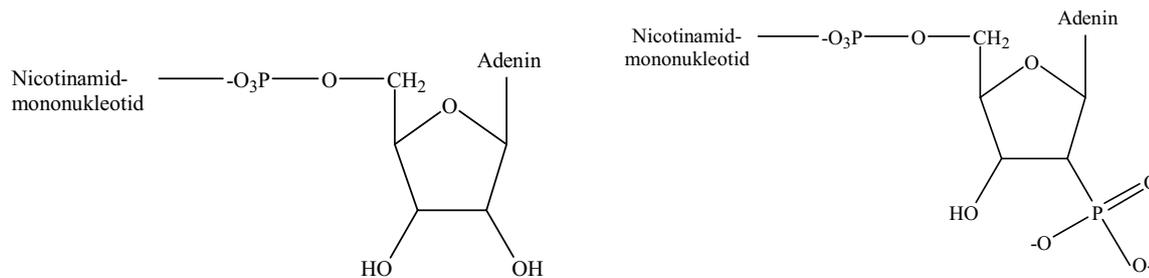


Abbildung 5: Schematische Strukturen von NAD (links) und NADP (rechts).

Die beiden Nicotinamid-Cofaktoren unterscheiden sich strukturell lediglich durch den an 2'-Position veresterten Phosphatrest am Adenosinring. Die eigentliche Reduktion / Oxidation des Cofaktors findet am Nicotinamid-Mononucleotid statt.

Obwohl sich NAD und NADP, wie in Abbildung 5 gezeigt, strukturell nur minimal unterscheiden, erfüllen sie auf zellulärer Ebene völlig unterschiedliche Funktionen. Das in der Glykolyse und im Citratzyklus gebildete NADH wird als Energielieferant bei der ATP-Bildung in der Atmungskette wieder deprotoniert. Da es dabei als Oxidationsmittel im Zell-Katabolismus fungiert, liegt es zum größten Teil als NAD vor.

NADPH hingegen wird im Pentosephosphatweg oder bei der Photosynthese gebildet und dient im Zell-Anabolismus als Reduktionsmittel, wie z. B. als Elektronen-/Wasserstoff-Lieferant in der Fettsäuresynthese. Es liegt in den Zellen zum größeren Teil in reduzierter Form als NADPH vor. In der Trennung dieser „Aufgaben“ innerhalb nicht-kompartimentierter Organismen (wie Bakterien) liegt die oft deutliche Präferenz der Enzyme für einen der beiden Cofaktoren begründet. Alkohol-Dehydrogenasen sind sehr stoffwechselaktive Proteine. In manchen Bakterien sind sie am Fettsäuremetabolismus beteiligt, im Menschen oxidieren sie in der Leber Ethanol zu Acetaldehyd (Herrera *et al.*, 1983; Yin *et al.*, 1990). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und in dem Bakterium *Zymomonas mobilis* katalysieren sie unter NADH-Verbrauch die Reduktion von Acetaldehyd zum Ethanol als letzten Schritt der alkoholischen Gärung (Dickinson & Monger, 1973; Kinoshita *et al.*, 1985). Anhand der physiologischen Funktion lässt sich begründen, warum es ADHs unterschiedlicher Cofaktor-Spezifität gibt.

Unabhängig von der Cofaktor-Präferenz ist es für den Einsatz von Alkohol-Dehydrogenasen in der Biokatalyse essentiell, dass der Cofaktor durch eine geeignete Rückreaktion stetig regeneriert wird. In Tabelle 2 sind aktuelle Cofaktor-Preise aufgelistet. Die Wichtigkeit effektiver Cofaktor-Regenerierung wird umso deutlicher, wenn man sich vor Augen führt, dass der Cofaktor im stöchiometrischen Verhältnis zum eingesetzten Substrat verbraucht wird.

Tabelle 2: Cofaktorpreise in €/mol (Stand 09/2008, Carl Roth GmbH & Co. KG)

Cofaktor	Preis € / mol	Cofaktor	Preis € / mol
NAD	10.050	NADH	19.093
NADP	72.007	NADPH	445.202

Grundsätzlich lassen sich sowohl NADH als auch NADPH problemlos regenerieren. Praktischerweise werden jedoch NAD-abhängige ADHs in der Biokatalyse bevorzugt, da für NADH teilweise effektivere Regenerierungssysteme zur Verfügung stehen, NAD ist im Vergleich zu NADP um ein vielfaches günstiger (Tabelle 2) und verhält sich zudem unter Prozess-Bedingungen deutlich stabiler (Lowry & Carter, 1974; Wu *et al.*, 1986; Tishkov & Popov, 2006; Opperman *et al.*, 2008). Die Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren wie NADH und NADPH kann auf unterschiedlichste Arten bewerkstelligt werden.

Die einfachste Möglichkeit besteht darin, präparative Umsetzungen mit ganzen Zellen durchzuführen. Die Regenerierung der Cofaktoren erfolgt über den zelleigenen Metabolismus und kann durch Zugabe bestimmter Medien und durch spezielle Wuchsbedingungen gesteuert werden. Zudem entfällt die oft kostenintensive (partielle) Aufreinigung, die selbstverständlich Voraussetzung für die Arbeit mit isolierten Enzymen ist. Die Methode der so genannten „Ganzzell-Biotransformation“ hat allerdings auch eklatante Nachteile – die Reaktionen verlaufen sehr langsam, Substrat und Produkt können teilweise nicht ungehindert die Zellmembran passieren, es treten Neben- und Kreuz-Reaktionen auf, die durch den Enzymstatus der Zellen hervorgerufen werden, und die Zellen zeigen eine oftmals geringe Toleranz gegenüber organischen Substraten in Bezug auf die Membranintegrität. Abhilfe schafft hier die Coexpression von Cofaktor-regenerierenden Enzymen, wie sie in Tabelle 3 aufgeführt sind (Weckbecker, 2005a).

Präparative Umsetzungen mit isolierten Enzymen können hingegen mit gesteigerter Selektivität, besserer Raum-Zeit-Ausbeute und effektiverer Cofaktor-Regenerierung durchgeführt werden (Hummel, 1997).

Für die Regeneration von Nicotinamid-Cofaktoren bei Umsetzungen mit isolierten Enzymen bestehen zahlreiche Möglichkeiten (Chenault & Whitesides, 1987). Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich enzymatische Regenerierungsmethoden relevant sind, seien chemische, photochemische und elektrochemische Regenerierungsreaktionen an dieser Stelle lediglich erwähnt (Vandecasteele, 1980; Goldberg *et al.*, 2007b; Goldberg *et al.*, 2007a; Liu & Wang, 2007).

Bei der Arbeit mit isolierten Enzymen unterscheidet man enzymgekoppelte und substratgekoppelte Cofaktor-Regenerierungssysteme. Beide Systeme haben Vor- und Nachteile, welche im Folgenden vorgestellt werden. Die Hauptreaktion ist dabei stets die ADH-katalysierte Reduktion eines prochiralen Ketons zum chiralen Alkohol. Bei dieser

Reaktion wird der Nicotinamid-Cofaktor NAD(P)H oxidiert, indem er ein Hydrid-Ion auf die Ketofunktion des Substrates überträgt. Das bei dieser Reaktion entstehende NAD(P) wird anschließend durch eine Regenerierungs-Reaktion reduziert. Die Regenerierungsreaktion wird dabei durch ein „Co-Enzym“, ein zweites Enzym, das in keinem Zusammenhang mit der Ketonreduktion steht, katalysiert. Dabei wird das Co-Substrat zum Co-Produkt umgesetzt (Abbildung 6). In diesem Fall spricht man von enzymgekoppelter Cofaktor-Regenerierung. Ist das Co-Enzym mit dem Enzym der Hauptreaktion identisch, spricht man von substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung. Seitdem das Prinzip der enzymgekoppelten Cofaktor-Regenerierung erstmals in den frühen 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts angewendet wurde (Wichmann *et al.*, 1981), wurden viele unterschiedliche Regenerierungs-Systeme entwickelt.

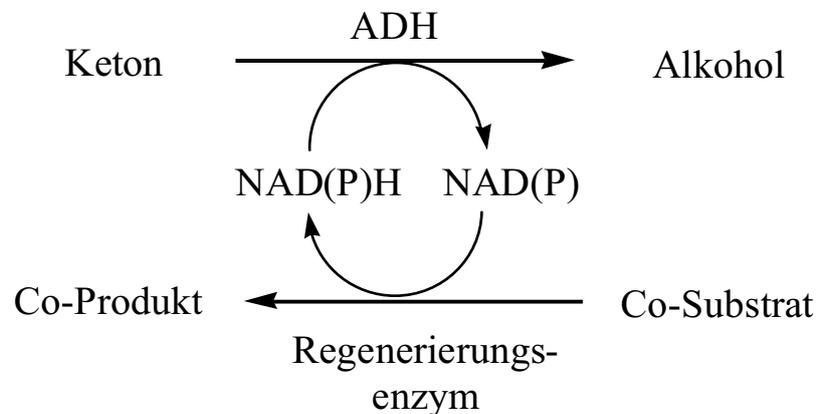


Abbildung 6: Allgemeine Reaktionsgleichung für eine kontinuierliche Cofaktor-Regenerierung.

Unterscheiden sich Regenerierungsenzym und ADH, so spricht man von enzymgekoppelter, anderenfalls von substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung

Einige Regenerierungsenzyme, Co-Substrate und Co-Produkte, die in die in Abbildung 6 dargestellte Regenerierungs-Reaktion eingesetzt werden könnten, sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Dabei wird das Co-Substrat in der Regel im deutlichen Überschuss eingesetzt.

Tabelle 3: Enzyme / Substrate zur Cofaktor-Regenerierung.

ADH = identische Alkohol-Dehydrogenase zur Hauptreaktion in Abbildung 6, FDH = Formiat-Dehydrogenase, GDH = Glucose-Dehydrogenase, G6PDH = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, IDH = Isocitrat-Dehydrogenase, NOX = NADH-Oxidase.

Regenerierungs- enzym	Co-Substrat	Co-Produkt	geeignet für
ADH	2-Propanol	Aceton	substratgekoppelt
FDH	Formiat	CO ₂ + H ₂ O	strikt NAD-abhängig
GDH	β-D-Glucose	D-Glucono-1,5-lacton	NAD und NADP
G6PDH	Glucose-6-phosphat	Glucono-1,5-lacton-6-phosphat	NADP
IDH	DL-Isocitrat	α-Ketoglutarat + CO ₂	NADP
NOX	NADH	NAD + H ₂ O ₂	NADH

Wenn die in der Hauptreaktion eingesetzte ADH auch die Regenerierungs-Reaktion katalysieren kann, spricht man von substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung. Als Co-Substrat wird üblicherweise, wenn die eingesetzten Enzyme dadurch nicht inhibiert werden, 2-Propanol in einer Konzentration zwischen 20 % - 60 % (v/v) eingesetzt (~ 2,5 – 7,5 M !) (Muller *et al.*, 2005). Die Vorteile dieser Methode liegen in erster Linie darin begründet, dass 2-Propanol als Co-Substrat sehr preisgünstig (~ 0,30 € / mol, Carl Roth 09/2008) ist und dass das bei der Reaktion gebildete Aceton relativ einfach aus dem Reaktionsansatz entfernt werden kann, um die Reaktion in ein thermodynamisch günstiges Verhältnis zu bringen (Goldberg *et al.*, 2007b; Goldberg *et al.*, 2007a; Schroer *et al.*, 2007). Zudem befindet sich nur ein Enzym im Reaktionsgemisch, wodurch zusätzliche Kosten bei der Expression und Produktaufreinigung eingespart werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei der Produktisolierung das gebildete Aceton und restliches 2-Propanol auf Grund der niedrigen Siedepunkte sehr leicht aus der Produktlösung abgetrennt werden können.

Das Hauptproblem an dieser Regenerierungs-Methode besteht darin, dass nicht alle ADHs 2-Propanol als Substrat akzeptieren oder durch die hohen Konzentrationen des Co-Substrats inaktiviert werden können. Bei Ganzzell-Biotransformationen kann es durch die hohen Co-Substrat-Konzentrationen zu Membranschäden an den Zellen kommen. Dadurch kommt es zum Austritt cytosolischer Katalyse-Bestandteile wie Cofaktor und Enzym und zum Abstoppen der Reaktion. Zumindest für die Arbeit mit isolierten Enzymen ist die substratgekoppelte Cofaktor-Regenerierung mit 2-Propanol die Methode der Wahl.

Großer Beliebtheit bei der enzymgekoppelten NAD-Regenerierung erfreut sich die Formiat-Dehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* und anderen Organismen. Sie arbeitet ebenfalls mit einem sehr preisgünstigen Co-Substrat (Na-Formiat, ~ 1,30 € / mol, Sigma-Aldrich, 09/2008) und katalysiert eine praktisch irreversible Reaktion mit CO₂ als einzigem

Reaktionsprodukt. Limitierungen bestehen in der geringen spezifischen Aktivität der FDH und der strikten NAD-Abhängigkeit. Aufgrund der thermodynamisch und ökonomisch hervorragenden Bilanz der Regenerierungs-Reaktion wurden letztlich große Anstrengungen unternommen, durch *in vitro* Evolution eine NADP-abhängige Variante der FDH zu erzeugen (Mesentsev *et al.*, 1997; Serov *et al.*, 2002; Tishkov & Popov, 2006; Andreadeli *et al.*, 2008).

Ein weiteres Standard-System zur Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren ist der Einsatz der Glucose-Dehydrogenase (GDH) aus *Bacillus subtilis* als Co-Enzym. Die GDH setzt β -D-Glucose ($\sim 40 \text{ € / mol}$, Sigma-Aldrich, 05/2008) zu D-Glucono-1,5-lacton um, welches seinerseits zur Glucuronsäure autooxidiert. Dadurch kommt es zu einer Absenkung des pH-Wertes im Reaktionsmilieu, was sich unter Umständen negativ auf die Aktivität des Haupt-Enzyms und der GDH auswirken kann. Nichtsdestotrotz zeichnet sich die GDH durch hohe spezifische Aktivitäten, eine gute Stabilität und die seltene Eigenschaft aus, NAD und NADP gleichermaßen zu akzeptieren. (Dedonder, 1953; Tochikubo *et al.*, 1968; Persson *et al.*, 1991; Kataoka *et al.*, 2003; Schroer *et al.*, 2007).

Ebenfalls möglich ist die Regenerierung von NADP mit Enzymen aus der Glykolyse und dem Citratzyklus, namentlich der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und der Isocitrat-Dehydrogenase (Tabelle 3). Beide Enzyme zeichnen sich durch hohe Aktivität und Substratspezifität aus, sind aber aufgrund der extremen Co-Substrat-Kosten nicht von industriellen Interesse sind (Glucose-6-phosphat $\sim 3.500 \text{ € / mol}$, K-Isocitrat $\sim 79.200 \text{ € / mol}$, Sigma-Aldrich, 09/2008). Denkbar ist der Einsatz der IDH, wenn das Substrat Isocitrat in einer vorgeschalteten Reaktion aus dem Substrat Citrat (Na-Citrat, $\sim 3,10 \text{ € / mol}$, Carl Roth, 09/2008) mittels Aconitase gebildet wird (Weckbecker, 2005a).

Eine Regenerierung des oxidierten Cofaktors NAD ist durch die NADH-Oxidase möglich. Ein Vorteil besteht darin, dass kein Co-Substrat eingesetzt werden muss. Limitierend ist, dass das Enzym NADPH nicht oxidieren kann und dass – sofern es sich um eine H_2O_2 -bildende Oxidase handelt - das gebildete Wasserstoffperoxid die Zellen schädigen respektive die Enzyme inaktivieren kann, so dass man in diesem Fall ein weiteres Enzym, die Katalase, zusetzen muss.

1.3 Enzymoptimierung durch *in vitro* Evolution

Die in der Biokatalyse eingesetzten Enzyme katalysieren in den meisten Fällen nicht die Umsetzung ihrer natürlichen Substrate. Darüber hinaus unterscheiden sich üblicherweise die physikalischen Rahmenbedingungen (Lösungsmittel, pH, Temperatur) von dem natürlichen Habitat der Enzyme. Diese Umstände können die Aktivität, Stabilität und Substrat-, Regio- sowie Stereo-Spezifität der Biokatalysatoren beeinflussen. Man kann dieser meist unerwünschten Beeinflussung entgegenwirken, indem man, soweit möglich, besagte Reaktionsparameter der natürlichen Umgebung der Enzyme anpasst oder eben die Enzyme selbst auf die formulierten Reaktionsbedingungen hin optimiert. Diese Enzymoptimierung kann durch *in vitro* Evolution der Enzyme bewerkstelligt werden. Dabei unterscheidet man zwei grundlegend unterschiedliche Vorgehensweisen: zum einen den rationalen Ansatz, der die Modellierung bzw. Manipulation des Enzyms auf Basis der 3D-Struktur vorsieht, und zum anderen den Ansatz der gerichteten Evolution, bei dem die für das Enzym kodierende DNA einer zufälligen Mutagenese unterzogen wird (Bornscheuer, 2005).

Essentielle Voraussetzung für den rationalen Ansatz zur Enzymoptimierung ist die genaue Kenntnis der 3D-Struktur des betreffenden oder eines hoch-homologen Proteins. Idealerweise wurde die Struktur im Komplex mit dem Substrat bzw. Substrat und Cofaktor gelöst. Nach Identifizierung der Aminosäure-Reste oder Regionen, die für die entsprechende Aktivität oder Spezifität verantwortlich sein könnten (z. B. Interaktionsstellen / Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat, Größe und Form von Bindetaschen), werden diese üblicherweise gezielt gegen eine oder mehrere unterschiedliche Aminosäuren ausgetauscht („ortsspezifische Mutagenese“). Wird die entsprechende Aminosäure an der identifizierten Position gegen alle anderen Aminosäuren ausgetauscht, so spricht man von einer Sättigungsmutagenese. Diese Methode wird sehr erfolgreich von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Reetz, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung Mülheim, angewendet.

Das Prinzip der iterativen Sättigungsmutagenese beruht auf einer kartesischen Betrachtung der 3D-Proteinstruktur. Die so genannten *hot spots*, die für eine bestimmte Eigenschaft wie z. B. die Enantioselektivität des Enzyms verantwortlich sein könnten, werden identifiziert und einer Sättigungsmutagenese unterzogen. Dabei betrachtet man die *hot spots* zunächst in separaten Mutagenese-Bibliotheken. Im anschließenden Screening werden diejenigen Mutanten aus Bibliothek A, die sich im Sinne der gewünschten Eigenschaft am vorteilhaftesten entwickelt haben, mit eben jenen aus Bibliothek B kombiniert. Auf diese Art ist es beispielsweise gelungen, die Thermostabilität der *Bacillus subtilis* Lipase A dramatisch zu erhöhen und im Bereich Enantioselektivität den *E*-Wert der *Aspergillus niger* Epoxid-Hydrolase von 4,8 auf 115 zu steigern (Reetz *et al.*, 2005; Reetz *et al.*, 2006b; Reetz *et al.*, 2006c; Reetz & Carballeira, 2007; Reetz *et al.*, 2007).

Durch rational begründete, ortsgerichtete Mutagenesen konnten darüber hinaus Erfolge in den Bereichen Substrat-Spezifität, Cofaktor-Spezifität und Stereo-Selektivität von Enzymen erzielt werden (Clarke *et al.*, 1989b; Clarke *et al.*, 1989a; Scrutton *et al.*, 1990; van Den Heuvel *et al.*, 2000; Seebeck & Hilvert, 2003). Ein großer Nachteil des rationalen Ansatzes liegt darin begründet, dass weit vom eigentlichen *hot spot* entfernte Positionen, die ebenfalls direkt oder indirekt an der entsprechenden Spezifität des Enzyms beteiligt sind, von dieser Methode nicht erfasst werden (Williams, 2004).

Im Bereich der gerichteten Evolution unterscheidet man nicht-rekombinatorische von rekombinatorischen Methoden. Bei nicht-rekombinatorischen Methoden, wie z. B. der *error-prone* PCR (*epPCR*) (Cadwell & Joyce, 1992; Cadwell & Joyce, 1995), werden an willkürlichen Positionen innerhalb des zu mutagenisierenden Gens zufällige Punkt-Mutationen eingefügt. Bei rekombinatorischen Methoden, wie z. B. dem klassischen DNA-Shuffling (Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b), werden durch das Zerkleinern und die Rekombination von DNA-Fragmenten „neue“ Gene erzeugt, die für Proteine mit den gewünschten Eigenschaften codieren können.

Im Laufe der letzten Dekade wurde, speziell auf dem Gebiet der rekombinatorischen Methoden, eine Vielzahl von Methoden erdacht. Nachteilig im Vergleich zum rationalen Mutageseansatz ist allen Methoden gemein, dass eine große Bibliothek von Mutanten durchmustert werden muss. Einen Überblick über die gebräuchlichsten Methoden bietet Tabelle 4.

Durch alle vorgestellten Techniken wurden bemerkenswerte Erfolge erzielt. So konnte beispielsweise durch klassische *epPCR* eine Mutante der *Pseudomonas aeruginosa* LipaseA erzeugt werden, deren *E*-Wert von 1,1 auf 26 zu Gunsten des S-Enantiomers der Hydrolyse von 2-Methyldecansäure-*p*-nitrophenylester verschoben wurde (Liebeton *et al.*, 2000). Die Besonderheit hierbei lag in der Tatsache, dass keine der 5 eingebrachten Mutationen im Bereich der Substrat-Bindestelle lag.

Durch das rekombinatorische DNA-Shuffling konnten die bislang signifikantesten Veränderungen in der Funktion und Spezifität der Enzyme erzeugt werden (Williams, 2004). So ist es nach drei Runden DNA-Shuffling gelungen, eine Mutante der *Escherichia coli* β -Glucuronidase zu erzeugen, die β -Galactosid 500-fach effizienter im Vergleich zum Wildtyp umsetzt. Die Stereo-Spezifität wurde dabei ca. um den Faktor $5,2 \times 10^6$ umgekehrt (Matsumura & Ellington, 2001).

Tabelle 4: Übersicht über die gebräuchlichsten Methoden der gerichteten Evolution.

epPCR = error-prone PCR, StEP = staggered extension process, ITCHY = incremental truncation for the creation of hybrid enzymes

Method	Prinzip	Vorteile	Nachteile
<i>epPCR</i>	Erzeugung zufälliger Punktmutationen durch fehlerhafte Gen-Amplifikation	Einfache Durchführung, Mutationsrate einstellbar, auch scheinbar unbeteiligte Positionen können mutagenisiert werden	Nur Punktmutationen möglich
DNA-Shuffling	Kontrollierte Zerkleinerung von DNA-Fragmenten durch DNaseI, Rekombination der Fragmente in Primer-loser PCR	Unterschiedliche parentale Gene können rekombiniert werden, Chimären-Bildung, Mutagenese ganzer Genregionen	Ausreichende Sequenz-Homologie erforderlich
StEP	PCR mit sehr kurzen Elongationszeiten, Crossover-Rekombinationen von partiell elongierten DNA-Fragmenten	sehr hohe Rekombinationsfrequenz, keine DNA-Fragmentierung notwendig, Chimären-Bildung	Ausreichende Sequenz-Homologie erforderlich, aufwändiges PCR-Protokoll
ITCHY	Direkte Ligation von DNA-Fragmenten	sehr hohe Rekombinationsfrequenz, keine Sequenz-Homologie notwendig, Chimären-Bildung	Überdurchschnittlich hoher Anteil von unfunktionaler DNA

Als Weiterentwicklung des DNA-Shufflings sind StEP (Shao *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1998) und ITCHY (Ostermeier & Benkovic, 1999; Ostermeier *et al.*, 1999a; Ostermeier *et al.*, 1999b; Ostermeier *et al.*, 1999c) ebenfalls effektive methodische Werkzeuge, um chimäre Gene auch ohne DNA-Fragmentierung respektive entsprechende Homologie erzeugen zu können.

Generell wurden durch die Konstruktion von Chimären in der Vergangenheit Enzyme mit interessanten Eigenschaften erzeugt.

Durch eine Kombination aus DNA-Shuffling und ortsspezifischer Mutagenese war es möglich, eine GDH-Chimäre (Glucose-Dehydrogenase) aus den parentalen GDHs aus *Escherichia coli* und *Serratia marcescens* zu erzeugen, die eine erhöhte EDTA-Toleranz, eine gesteigerte Thermostabilität und eine höhere Substrat-Affinität als die jeweiligen Wt-GDHs aufweist (Tripura & Podile, 2007). Ebenfalls durch eine Kombination aus DNA-Shuffling der *E. coli* IDH (Isocitrat-Dehydrogenase) und der *Thermus thermophilus* IPMDH (Isopropylmalat-Dehydrogenase) und anschließender ortsspezifischer Mutagenese konnte die Aktivität des chimären Enzyms mit Isocitrat signifikant erhöhen (Doyle *et al.*, 2000).

Ein weiteres, sehr interessantes Ergebnis wurde erzielt, als eine Chimäre aus zwei unterschiedlichen Aminosäure-Dehydrogeasen erzeugt wurde. Die Chimäre wurde nicht durch klassisches DNA-Shuffling, sondern durch einen gezielten rationalen Ansatz konstruiert. Der N-Terminus, der die Substrat-Bindestelle beinhaltet, wurde durch die *Thermoactinomyces intermedius* L-Phenylalanin-Dehydrogenase gestellt. Der C-Terminus mit der NAD(H)-Bindestelle stammt aus der *Bacillus stearothermophilus* L-Leucin-Dehydrogenase. Im Ergebnis wurde eine NAD-abhängige Aminosäure-Dehydrogenase erzeugt, die trotz identischer K_m -Werte für L-Phenylalanin lediglich 6 % der Wt-Aktivität der L-Phenylalanin-Dehydrogenase aufweist. Interessanterweise wurde die Akzeptanz für Isoleucin und Valin deutlich gesteigert. Als Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen blieb die Erkenntnis, dass die beiden Domänen des chimären Enzyms miteinander agieren und in der Form miteinander in Kontakt treten, so dass eine „neue“ Substratbindetasche mit „neuer“ Substrat-Spezifität entsteht (Kataoka *et al.*, 1994).

Die Quintessenz dieser Ergebnisse liegt darin, dass eine einzige Mutation in einem Protein oft nicht den gewünschten Effekt erzielen kann, sondern meist eine Kombination aus mehreren Mutationen zum Erreichen des Ziels benötigt wird. Welche Methode dabei Anwendung findet, muss den entsprechenden Umständen geschuldet werden (Strukturaufklärung, Homologiebetrachtung).

1.4 Motivation und Zielsetzung dieser Arbeit

Alkohol-Dehydrogenasen sind als Biokatalysatoren zur stereo-selektiven Synthese von essentiellen *building blocks* für die Agro- und Pharmaindustrie nicht mehr wegzudenken. Die Identifizierung neuer und die Optimierung bereits etablierter Enzyme stellen ein wichtiges Forschungsfeld der industriellen Biotechnologie dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch unterschiedliche Methoden neue respektive verbesserte Enzyme für die Biokatalyse zur Verfügung zu stellen.

(1) Der erste Ansatz bestand darin, durch die Etablierung eines geeigneten Screeningsystems neue putative Biokatalysatoren innerhalb einer Metagenom-Bibliothek zu identifizieren. Dabei handelt es sich um die metagenomische DNA einer Anreicherungskultur, die über einen längeren Zeitraum mit dem Substrat 2-Hexanol inkubiert wurde. Durch diese Anreicherung sollte die Oxidoreduktase-Frequenz innerhalb des DNA-Pools erhöht werden, so dass auch aus einer kleinen Bibliothek (ca. 1000 Klone), deren Expressionsplasmide mit kleinen metagenomischen DNA-Inserts (Ø 2,4 kb) ausgestattet wurden, entsprechende Gene über die Aktivität ihrer Genprodukte bei der heterologen Expression in *E. coli* identifiziert werden können.

(2) Der zweite Ansatz sah die Konstruktion von chimären Alkohol-Dehydrogenasen vor. Als parentale Gene standen dabei die *adh-Lb* aus *Lactobacillus brevis* sowie das Gen *adh105*, welches thermophilen Ursprungs ist, zur Verfügung. Beide ADHs werden biokatalytisch eingesetzt und haben sehr interessante unterschiedliche Charakteristika, wobei eine Gemeinsamkeit beider Enzyme in erster Linie in der (*R*)-Selektivität bei der Carbonylreduktion besteht. Die ADH-*Lb* ist NADP-abhängig und akzeptiert bevorzugt aromatische Substrate wohingegen die ADH105 NAD-abhängig ist und bevorzugt aliphatische Substrate akzeptiert. Die Chimären sollten die für die Biokatalyse positiven Eigenschaften (Substrat-Spezifität, Cofaktor-Spezifität, Stereo-Selektivität) der einzelnen ADHs miteinander kombinieren. Auf Grund der mangelnden Homologie in der Primärstruktur sollte die Konstruktion der chimären ADHs nicht durch klassisches DNA-Shuffling, sondern durch eine anhand der Sekundärstruktur begründeten Überlegung durchgeführt werden. Dabei sollte in zwei unterschiedlichen Verhältnissen der N-Terminus der ADH105 (Cofaktor-Bindestelle) mit dem C-Terminus der ADH-*Lb* (Substrat-Bindestelle) kombiniert werden.

(3) Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die Cofaktor-Spezifität der industriell eingesetzten ADH-*T* aus *Thermoanaerobacter* sp. von NADP hin zu NAD geändert werden. Die ADH-*T* ist ein strikt NADP-abhängiges Enzym. Aus den in der Einleitung dargestellten Gründen (Stabilität, Preis, Regenerierbarkeit) ist eine NAD-Abhängigkeit bei kontinuierlichen Umsetzungen mit Cofaktor-Regenerierung von Vorteil. Dabei wurden die zu mutagenisierenden Positionen durch auf der 3D-Struktur beruhenden kartesischen

Betrachtungen der Cofaktor-Bindestelle ausgewählt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals versucht, eine Änderung der Cofaktor-Spezifität durch iterative Sättigungsmutagenese zu erreichen. In mehreren hintereinandergeschalteten Mutageneserunden sollte dabei ein kumulativer Effekt erzielt werden, der letztendlich in einem stabilen NAD-abhängigen Enzym resultiert, das in seiner biokatalytischen Effizienz der wildtypischen ADH-*T* mit dem Cofaktor NADP(H) entspricht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196 (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dem</i> (λ <i>Its857 ind1 Sam7 nin5 lavUV5-T7gene1</i>)	(Studier & Moffatt, 1986)
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cm ^R)	Novagen
<i>Escherichia coli</i> ArcticExpress (DE3) RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte [cpn10cpn60 Gent^r] [argU ileY leuW Str^r]</i>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

2.1.2 Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tabelle 6 aufgelistet. Vektorkarten befinden sich im Anhang.

Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Vektoren.

Vektor	Genotyp	Referenz
pET-19b	Ap ^R , ori _{pBR322} , P _{T7lac} , N _{His} •Tag	Novagen
pET-21a (+)	Ap ^R , ori _{pBR322} , P _{T7lac} , C _{His} •Tag, T7•Tag	Novagen
pET-22b	Ap ^R , ori _{pBR322} , P _{T7lac} , C _{His} •Tag	Novagen
pZERO-2	pUC origin, Km ^R , P _{T7lac} , <i>lacZa:::ccdB</i>	Invitrogen
pLbADH	pET-21a (+) <i>adh</i> _[L. brevis]	(Weckbecker, 2005a)
pAS-9	pET-19b <i>adh-T</i>	diese Arbeit
pAS-12	pET-19b <i>adh-T</i> R200D	diese Arbeit
pAS-18	pET-19b <i>adh105</i>	diese Arbeit
pAS-19	pET-22b <i>adh105</i> [C _{His} •Tag]	diese Arbeit
pAS-27	pET-21a (+) <i>adh-C1</i>	diese Arbeit
pAS-29	pET-21a (+) <i>adh-C2</i>	diese Arbeit
pAS-30	pET-21a (+) <i>orm1</i> [Metagenom]	diese Arbeit
pAS-31	pET-19b <i>adh-T</i> G198D S199N	diese Arbeit
pAS-32	pET-19b <i>adh-T</i> G198D S199N Y218W	diese Arbeit
pAS-33	pET-19b <i>adh-T</i> G198D S199N Y218F	diese Arbeit
pAS-34	pET-19b <i>adh-T</i> G198D S199D	diese Arbeit

2.1.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Tabelle 7) wurden von den Firmen metabion (Martinsried) oder MWG (Ebersberg) in lyophilisierter Form bezogen und in der angegebenen Menge destilliertem Wasser (A. dest.) aufgenommen, so dass sie in einer Konzentration von 100 pmol/μl vorlagen. Oligonukleotide für den Einsatz in einer QuikChangeTM-PCR (2.3.8) wurden speziell mittels hoch auflösender Flüssigchromatographie (HPLC) aufgereinigt.

Tabelle 7: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

oePCR = overlap extension PCR, rtPCR = real-time PCR, ISM = iterative Sättigungsmutagenese.

Name	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
<i>adh105</i> up	AAAAAACATATGATGACAACACAGCGTATCGCA	<i>NdeI</i>
<i>adh-Lb</i> dn	AAAAAAAAGCTTCTACTATTGAGCAGTGTAGCC	<i>HindIII</i>
C1 dn	TCTGATCAGGACCTTGTGCT	oePCR
C1 up	AGCACAAGGTCCTGATCAGA	oePCR
C2 dn	CTTGTTAACCGCGATCCCCGCGTT	oePCR
C2 up	AACGCGGGGATCGCGGTTAACAAG	oePCR
pAS-9 dn	GCGCTTTCTCGAGTTATGCTAATATTACA	<i>XhoI</i>
pAS-9 up	AAAACCATGGCGAAAGGTTTTGCAATGC	<i>NcoI</i>
pAS-18 dn	TTTTTTGGATCCTCAGTACATGTGCAGACCG	<i>BamHI</i>
pAS-18 up	AAAAAACCATGGCAATGACAACACAGCGTA	<i>NcoI</i>
pAS-30 dn	AAAAAAGCTTTCATCTACAAGGAAACCGTG	<i>HindIII</i>
pAS-30 up	AAAACATATGCATGCTCGAGCGGCC	<i>NdeI</i>
RT <i>105</i> dn	TTTTCGCGACCATCGTTTTG	rtPCR
RT <i>105</i> up	GTCGTTGCCAACTGCATTCC	rtPCR
RT <i>C1</i> dn	GCCAAAGGCTTTTTCCGTTG	rtPCR
RT <i>C1</i> up	AGTGGCTGGCTGCACAAAAA	rtPCR
RT <i>C2</i> dn	TTTTCGCGACCATCGTTTTG	rtPCR
RT <i>C2</i> up	GTCGTTGCCAACTGCATTCC	rtPCR
RT <i>Lb</i> dn	GGCCCCTGGTAGGTCATCAA	rtPCR
RT <i>Lb</i> up	ACGCATCTAAAGGGGCGGTA	rtPCR
RT <i>rpoD</i> dn	CTGCGTTCGGGTCAACAAAG	rtPCR
RT <i>rpoD</i> up	CAGGTTCAATGCTCCGTTGC	rtPCR
T198/9 dn	CACAAACAGGTCTMNNMNNTAGTGCAATAA	ISM <i>adh-T</i>
T198/9 up	TTATTGCAGGTANNKNNKAGACCTGTTTGTG	ISM <i>adh-T</i>
T200 dn	CTACACAAACAGGMNNACTGCCTACTGC	ISM <i>adh-T</i>
T200 up	GCAGTAGGCAGTNNKCCTGTTTGTGTAG	ISM <i>adh-T</i>
T201/2 dn	AGCATCTACACAMNNMNNTCTACTGCCT	ISM <i>adh-T</i>
T201/2 up	AGGCAGTAGANNKNNKTGTGTAGATGCT	ISM <i>adh-T</i>
T218 dn	AGGACCATTTTTMNNGTTTACAATATC	ISM <i>adh-T</i>
T218 up	GATATTGTAAACNNKAAAAATGGTCCT	ISM <i>adh-T</i>
T7 Prom	TAATACGACTCACTATAGG	Kolonie-PCR
T7 Term	GCTAGTTATTGCTCAGCG	Kolonie-PCR
TR200D dn	CTACACAAACAGGGTCACTGCCTACTGC	oePCR
TR200D up	GCAGTAGGCAGTGACCCTGTTTGTGTAG	oePCR

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Falls nicht gesondert aufgeführt, waren alle in dieser Arbeit aufgeführten **Chemikalien** mindestens von analysereiner Qualität und stammten von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Fluka AG (Buchs, Schweiz), Merck AG (Darmstadt), Biomol (Hamburg) oder Carl Roth GmbH (Karlsruhe). **Medienbestandteile** wurden von Merck (Darmstadt), Difco (Detroit, USA), Oxoid (Wesel) oder Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. **Restriktionsenzyme** und die zugehörigen Puffer waren von Fermentas GmbH (Leon-Rot) oder New England BioLabs GmbH (Schwalbach), **Reagenzien** für molekularbiologische Arbeiten von Qiagen (Hilden), Fermentas GmbH (Leon-Rot), Eppendorf AG (Hamburg), Promega (Madison, USA) oder Roche Diagnostics (Mannheim).

2.1.5 Geräte

Chromatographie

Gaschromatograph GC-17A Shimadzu

Desintegration

Schwingmühle MM200 Retsch
Sonopuls HD 2070 Bandelin

Elektrophorese

Elektrophoresekammer Mupid-ex Eurogentec
DNA Elektrophoresekammer GT System Bio-Rad
NuPAGE XCell SureLock Mini Cell NOVEX Electrophoresis
EagleEye II Videodokumentationssystem Stratagene

PCR

Tpersonal Thermocycler Biometra
Mastercycler ep gradient Eppendorf
Mastercycler ep realplex4 S Eppendorf

Spektroskopie

UV/VIS-Spektralphotometer UV-1602 Shimadzu
BioPhotometer Eppendorf

Zentrifugation

Sorvall RC5B und RC5B-Plus DuPont
Tischzentrifuge Mikro 22R Hettich
Tischzentrifuge Rotina 35R Hettich
Tischzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415 D Eppendorf

automatisierte Systeme

TECAN Workstation Genesis Genios
Kolonie-Pickroboter QPix2 Genetix

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von Mikroorganismen und Medien

Kulturen von *E. coli* wurden, soweit nicht anders angegeben, in LB-Medium angelegt und bei 37°C bebrütet. Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg), größere Volumina in Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH) bei 120 rpm kultiviert, wobei das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer-Kolbens 1:10 entsprach. Bei Anzucht in Mikrotiterplatten (Greiner Bio One, 96 Kavitäten à 200 µl) wurden die Kulturen, wenn nicht anders angegeben, in Autoinduktionsmedium (AIM) auf einem Schüttler bei 600 rpm bebrütet. Bakterienstämme mit plasmid- oder genomcodierten Resistenzmarken wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums kultiviert. Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden.

LB-Medium: 10 g Trypton; 10 g NaCl; 5 g Hefextrakt
ad 1000 ml A. dest, pH 7,0

TB-Medium: 24 g Hefextrakt; 12 g Caseinhydrolysat; 5 g Glycerin
ad 1000 ml KP_i 100 mM pH 7,0

AIM: TB-Medium + 2 g/l Lactose + 0,5 g/l Glucose

M9-Medium: 4 g Glucose; 0,25 g MgSO₄ x 7H₂O; 0,02 g CaCl₂ x 2 H₂O;
7g Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 3 g K₂HPO₄; 0,5 g NaCl; 1 g NH₄Cl
ad 1000 ml A. dest, pH 7,0

Medien wurden für 20 min bei 2 bar Druck und 121 °C sterilisiert. Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben. Hitzelabile Chemikalien wurden mit Membranfiltern mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm (Schleicher und Schüll, Dassel) sterilfiltriert und den autoklavierten Medien bei einer Temperatur von ≤ 60 °C zugesetzt.

2.2.2 Konservierung von Bakterienstämmen

Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedien ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4°C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Genexpression und Chaperon-Coexpression

T7-Expressionskulturen in LB-Medium wurden aus einer Vorkultur auf eine OD₅₈₀ von 0,05 angeimpft und bei 30 °C oder 37 °C bebrütet. Die Genexpression wurde, wenn nicht anders angegeben, bei Erreichen einer OD₅₈₀ von 0,5 durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert.

T7-Expressionskulturen in Autoinduktionsmedium wurden durch Inokulation mit einer Einzelkolonie, einer Vorkultur oder eines frischen Transformationsansatzes beimpft. Die Genexpression fand, wenn nicht anders angegeben, über Nacht bei 30 °C statt.

Die Coexpression von Chaperonen zur Steigerung der Löslichkeit von Proteinen bei heterologer Expression wurde mit dem „Chaperone Plasmid Set“ der Firma TaKaRa Bio Europe S.A.S. (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4 Gewinnung von Rohextrakten

E. coli Zellsedimente wurden durch Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4 °C) gewonnen. Das erhaltene Pellet wurde, wenn nicht anders angegeben, im Verhältnis 1:4 (1 g Zellen : 4 g Puffer) in 100 mM Tris-HCl Puffer pH 7,0 aufgenommen. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit gepulstem Ultraschall mittels eines Pulsed Sonifier der Firma Branson aufgeschlossen (Gesamtzellextrakt - GZE). 1-2 ml Zellsuspension wurden für 4 min bei 50 % Puls und 40 % Intensität auf Eis mit Ultraschall behandelt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Rohextrakt abgenommen und das Pellet für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

Bei Genexpressionen in MTP wurden diese nach Inkubation zentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4 °C) und das erhaltene *E. coli* Zellsediment durch Inkubation (60 min, 37 °C) mit Lysozym-Lösung (100 mg/ml Lysozym aus Hühnereiweiß im gewünschten Puffer) lysiert. Die danach in der Suspension befindlichen Membranfragmente wurden zur Gewinnung des Rohextraktes durch erneute Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4 °C) vom GZE abgetrennt.

Thermostabile Proteine wurden partiell gereinigt, indem der Rohextrakt oder GZE für 7 min bei 70 °C denaturiert wurde. Der Großteil der homologen *E. coli* Proteine denaturierte dabei, während die heterolog exprimierten, thermostabilen Proteine in Lösung blieben. Durch Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4 °C) ließen sich denaturierte und lösliche Proteine voneinander trennen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch die Verwendung von Mini- und Midiprep-Kits der Firmen Invitex (Berlin) und Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller.

Zur Isolierung metagenomischer DNA wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

Die Isolierung von RNA (mRNA) aus *E. coli* erfolgte durch die Verwendung des RNeasy-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben.

2.3.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen mit einer Konzentration von 0,6 % - 2 % (w/v) nach (Sambrook *et al.*, 1989) elektrophoretisch getrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde $0,5 \times$ TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$; pH 8,3) verwendet. Als Längenstandard wurde die „1kb-ladder“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf der „Eagle Eye II“-Videodokumentationsanlage der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „QiaEx II“-Kits der Firma Qiagen (Hilden) oder des DNA GelCleanup Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

2.3.3 *In vitro*-Rekombination von DNA

Die Restriktion von DNA, Modifikation von DNA-Enden und Ligation von DNA-Fragmenten wurde nach (Sambrook *et al.*, 1989) sowie nach Angaben des Herstellers des jeweiligen Enzyms in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.3.4 Erstellung einer Genbank aus metagenomischer DNA, (Weckbecker, 2005b)

Die Genbank wurde unter Verwendung des ZeroBackgroundTM/Kan Cloning Kits der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Herstellerangaben erstellt. Als Quelle für die metagenomische DNA diente ein über Monate mit Medien und 2-Hexanol inkubiertes, benutztes Spültuch aus der Küche des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie, FZ Jülich. Genutzt mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Andrea Weckbecker.

2.3.5 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation sowie die Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli* Zellen wurde nach (Hanahan, 1983) durchgeführt.

2.3.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde von den Firmen Sequiserve (Vaterstetten) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg) in Auftragsarbeit durchgeführt.

2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR), (Mullis & Faloona, 1987)

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach (Saiki *et al.*, 1988) durchgeführt. Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 μl angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 ng Plasmid- oder 10 ng genomische DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Pfu*-Polymerase im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in den PCR-Automaten „Mastercycler epGradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) oder Tpersonal Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen) mit dem folgenden Programm durchgeführt:

1 × (5 min: 95 °C); 35 × (1 min: 95 °C; 1 min: 50–60 °C je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide; 1 min / 500 bp × 72 °C je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments); 1 × (10 min: 72 °C). Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des DNA GelCleanup Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers. Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen.

2.3.8 Iterative Sättigungsmutagenese & QuikChange®-PCR

Zur iterativen Sättigungsmutagenese (ISM) wurden die in 2.1.3 aufgeführten Oligonukleotide mit degenerierten Codons eingesetzt. Die entsprechenden Mutanten wurden durch QuikChange®-PCR nach Vorgaben des Herstellers Stratagene (La Jolla, CA, USA) gemäß des „QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit“-Protokolls durchgeführt. PCR-Ansatz: DNA-Template 2 µl, Primer up/dn je 2 µl (100 pmol 1:40 verdünnt), dNTP 1 µl (10 mM each), 10x KOD-Puffer 2 µl, 25 mM MgSO₄ 0,8 µl, KOD-Polymerase 0,5 µl, H₂O 9,7 µl. PCR-Programm: 94 °C – 3 min, [94 °C – 1 min, 55 °C – 1 min, 72 °C – 7 min] x25, 72 °C – 10 min. Nach der PCR wurde dem kompletten Ansatz 1 µl DpnI zugesetzt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Das Ergebnis der PCR konnte an dieser Stelle durch Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert werden. Die mutagenisierten PCR-Produkte konnten nach 2.3.5 transformiert werden: 2 µl PCR-Produkt zu 100 µl chemisch kompetenten *E. coli* BL21 (DE3), 30 min Eis, 90 s 42 °C, 2 min Eis, Zugabe von 500 µl LB (42 °C vorgeheizt), 60 min bei 37 °C schütteln, auf Selektivagar ausplattieren.

2.3.9 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde wie eine Standard-PCR (2.3.7) ausgeführt. Abweichend von diesem Protokoll wurde als Matrizen-DNA kein Plasmid oder genomische DNA, sondern 30 µl einer Resuspendierungslösung (1:10 TE-Puffer) einer *E. coli*-Einzelkolonie, die für 10 min bei 95 °C erhitzt wurde, eingesetzt.

2.3.10 *overlap extension*-PCR, (Ho *et al.*, 1989)

Die *overlap extension*-PCR zur ortsgerichteten Mutagenese wurde nach der Methode von (Ho *et al.*, 1989) durchgeführt.

2.3.11 reverse Transkription (RT) – Herstellung von cDNA

Die Herstellung von cDNA erfolgte mit Hilfe des „First Strand cDNA Synthesis Kits“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben. Als Matrize wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

2.3.12 Quantitative *real-time*-PCR

In die quantitative *real-time*-PCR wurden 5 µl cDNA (2.3.11) eingesetzt. Der Ansatz wurde gemäß des Herstellerprotokolls der Firma 5Prime (Hamburg) für das „RealMasterMix CYBR ROX Kit“ ausgeführt. Als *housekeeping*-Gen diente *rpoD*, das für eine *E. coli* RNA-Polymerase-Untereinheit codiert und konstitutiv unreguliert exprimiert wird.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Proteinmengenbestimmung und densitometrische Analyse

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von (Bradford, 1976) bestimmt. Als Referenz diente eine definierte BSA-Konzentrationsreihe.

Um einzelnen Banden in der Spur eines SDS-Geles eine definierte Proteinmenge zuschreiben zu können, wurde eine densitometrische Peakflächenintegration durchgeführt. Dazu wurde zunächst die gesamte Proteinmenge der Probe, z. B. eines Rohextraktes nach vorgenannter Methode bestimmt. Daraufhin wurde das SDS-Gel durch ein geeignetes Videodokumentationssystem (Stella raytest) erfasst und durch eine Software (AIDA 4.18) analysiert. Diese Software kann die einzelnen Banden eines Gels in ein Histogramm umsetzen, bei dem diese Banden dann in Form von Peaks dargestellt werden. Je intensiver die Bande, desto höher der Peak. Die Integration der Fläche unter dem Peak steht daraufhin in einem linearen Verhältnis zu der Fläche unter dem gesamten Histogramm, die wiederum für die Gesamtproteinmenge steht. Beispielrechnung: Gesamtproteinmenge 1 mg/ml, Anteil Peak A an der Gesamtfläche des Histogramms 6 %, Proteinmenge, die Peak A zugeschrieben werden kann: 60 µg/ml.

2.4.2 Aktivitätsassay für Alkohol-Dehydrogenasen

Die Bestimmung der Enzymaktivität für Alkohol-Dehydrogenasen beruht auf einem indirekten photometrischen Assay.

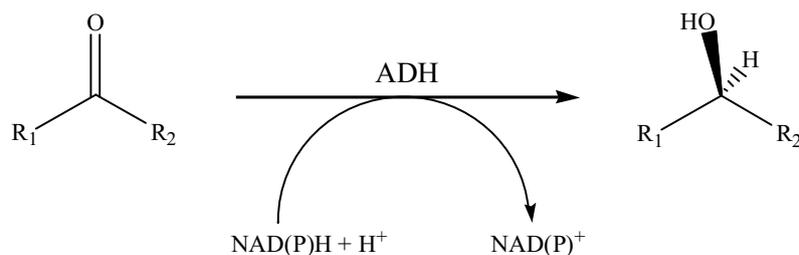


Abbildung 7: Allgemeine Reaktionsgleichung für eine ADH-katalysierte Ketonreduktion.

Entsprechend der in Abbildung 7 dargestellten allgemeinen Reaktionsgleichung für die Ketonreduktion durch ADHs wird die Konzentrationsabnahme des reduzierten Cofaktors NAD(P)H gemessen, der im stöchiometrischen Verhältnis zum Keton umgesetzt wird. NAD(P)H absorbiert Licht der Wellenlänge 340 nm. Die ADH-Enzymaktivität wurde, beruhend auf der Absorptionsänderung, nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Der molare Extinktionskoeffizient für NADPH beträgt 6,22 mM⁻¹cm⁻¹.

$$U = \frac{\Delta E \cdot V}{d \cdot \varepsilon \cdot v}$$

ε Extinktionskoeffizient ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
 ΔE Extinktionsänderung
 V Gesamtvolumen des Ansatzes (ml)
 v Enzymvolumen (ml)
 d Schichtdicke der Küvette (cm)

Die Aktivitätsbestimmung der ADHs beruhte auf der photometrisch gemessenen Abnahme der NAD(P)H-Menge bei 340 nm. Die Messungen erfolgten in Küvetten oder Mikrotiterplatten bei 30°C über einen Zeitraum von mindestens einer Minute. Der Testansatz enthielt, wenn nicht anders angegeben, 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,0, 10 mM ADH-Substrat und 0,2 mM NADP(H) bzw. NAD(H). Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 1 ml in Küvetten und 200 μl in Mikrotiterplatten.

2.4.3 Nachweis von chiralen Alkoholen durch Gaschromatographie

Die Analyse präparativer Umsetzungen von Acetophenon zu (R,S)-1-Phenylethanol und von 4-Chlor-Ethylacetoacetat zu (R,S)-4-Chlor-3-Hydroxy-buttersäureethylester erfolgte am Gaschromatographen GC-17A (Shimadzu). Hierfür wurde die chirale Säule CP-Chirasil-DEX CB (Chrompack, 25 m x 0,25 mm ID) verwendet. Als Trägergas wurde Helium (1,3 ml/min) eingesetzt. Das Temperaturprogramm war folgendes: 60°C (5 min), 60 – 195°C (5°C/min). Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 37°C und 1200 rpm im Heizblock. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben, wenn nicht anders angegeben 50 μl , entnommen und mit 100 μl Essigsäureethylester gründlich gemischt. Zur Phasentrennung wurde 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert, die organische Phase wurde abgenommen und mittels Gaschromatographie analysiert.

2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), (Laemmli, 1970)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS nach (Laemmli, 1970). Verwendet wurden NuPAGE® 4-12 %ige Bis-Tris Gele der Firma Invitrogen (Karlsruhe) und 1 x MES-Puffer. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur „XCell SureLock™ Electrophoresis Cell“ der Firma Novex (Frankfurt) bei einer Spannung von 200 V. Als Größenstandard wurde der SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein-Standard der Firma Invitrogen verwendet. 20-25 μg Gesamtprotein wurden in 10 μl NuPAGE® SDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95 °C inkubiert. Die aufgetrennten Proteine wurden mit SimplyBlue SafeStain Comassie-Färbelösung (Invitrogen) nach Herstellerangaben gefärbt.

2.5 Chromatographische Methoden

2.5.1 Anionenaustausch-Chromatographie

Als Material für die Anionenaustausch-Chromatographie wurde Q-Sepharose FF (Pharmacia) verwendet. Das jeweilige Enzympräparat wurde auf eine mit Puffer A (meist 50 mM TEA-Puffer pH 7,0) äquilibrierte Q-Sepharose FF-Säule aufgetragen. Nach dem Auftragen des Rohextraktes wurde die Säule mit dem gleichen Puffer gespült. Die Elution der gebundenen Proteine gelang durch Verwendung eines linearen Gradienten mit 1 M NaCl (Puffer B: Puffer A + 1 M NaCl). Die Detektion erfolgte UV-spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Aktivität geprüft. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt.

2.5.2 Gelfiltrations-Chromatographie

Für die Gelfiltration, welche die Auftrennung von Proteinen und zugleich die Bestimmung ihres nativen Molekulargewichts erlaubt, wurde als Matrix HiLoad 16/60 Superdex 200 (Pharmacia) verwendet. Die Säule hatte ein Volumen von 125 ml sowie einen Durchmesser von 1,6 cm. Der Trennbereich umfasst Proteine mit einem Gewicht von 10 bis 600 kDa. Die Eichung der Säule erfolgte mit Thyroglobulin, Catalase, Albumin, Chymotrypsinogen A, Ferritin, Aldolase, Ovalbumin und Ribonuclease A. Als Puffer für die Gelfiltration wurde 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 + 150 mM NaCl verwendet.

2.5.3 Affinitäts-Chromatographie (IMAC), (Porath *et al.*, 1975)

Bei diesem weit verbreiteten System werden die Zielproteine mit einem kurzen Poly-Histidin-*tag* fusioniert und nach erfolgter Synthese mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt. Die IMAC basiert auf der Interaktion zwischen immobilisierten, divalenten Kationen (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) und den Seitenketten bestimmter Aminosäuren, üblicherweise Histidinen. Nitrilo-3-Essigsäure (NTA) stellt heute die gebräuchlichste Chelatgruppe für die Reinigung von Proteinen mit Histidinresten dar (Hochuli *et al.*, 1987). NTA kann vier der sechs Bindungsstellen eines Ni^{2+} -Ions belegen, wodurch dieses sehr stabil an die Matrix gebunden wird und selbst unter stringenten Reinigungsbedingungen nicht von der Matrix gewaschen wird. Zur Elution der gebundenen Poly-Histidin-Fusionsproteine bestehen zwei Möglichkeiten. Durch Senkung des pH-Werts werden die Seitenketten der Histidine protoniert (pH 4,5-5,3) und können nicht mehr als Elektronendonator mit der Ni^{2+} -NTA-Matrix interagieren. Darüber hinaus können die Histidinreste der Fusionproteine durch Waschen mit Imidazol-haltigen Puffern von der Ni^{2+} -NTA-Matrix verdrängt werden.

2.6 Enzymatische Synthesen von Alkoholen mit Cofaktorregenerierung

2.6.1 Synthese mit substratgekoppelter Cofaktorregenerierung

Bei der ADH-katalysierten Synthese von Alkoholen in Systemen mit substratgekoppelter Cofaktorregenerierung wurden, wenn nicht anders angegeben, 20 % 2-Propanol (v/v) als Cosubstrat eingesetzt. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. In der Regel wurden 30 mM Keto-Substrat, 1-5 U ADH (in der Regel GZE oder

hitzenaturierter GZE) eingesetzt. Die Umsetzungen fanden ausnahmslos bei 37 °C im Heizblock bei 1000 rpm statt.

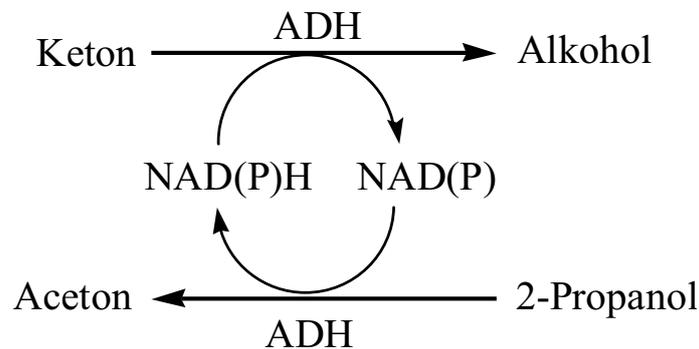


Abbildung 8: Substratgekoppelte Cofaktorregenerierung.

Beide Reaktionen werden durch die gleiche ADH katalysiert.

2.6.2 Synthese mit enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung

Bei der ADH-katalysierten Synthese von Alkoholen in Systemen mit enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung wurde Glucose-Dehydrogenase (GDH) eingesetzt. Der Reaktionsmechanismus ist in

Abbildung 9 schematisch dargestellt. In der Regel wurden 30 mM Keto-Substrat, 1-5 U ADH (in der Regel GZE oder hitzenaturierter GZE) eingesetzt. Die Umsetzungen fanden ausnahmslos bei 37 °C im Heizblock bei 1000 rpm statt. Bei Einsatz der GDH wurden 100 mM β -D-Glucose als Co-Substrat eingesetzt. Die GDH aus *B. subtilis* wurde heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und elektrophoretisch zur Homogenität aufgereinigt. Die Enzymaktivität der GDH wurde unmittelbar vor der Synthesereaktion gemessen (100 mM β -D-Glucose, 0,1 mM NAD(P), 30 °C) – in die Synthesereaktion wurden in der Regel 5 U GDH eingesetzt.

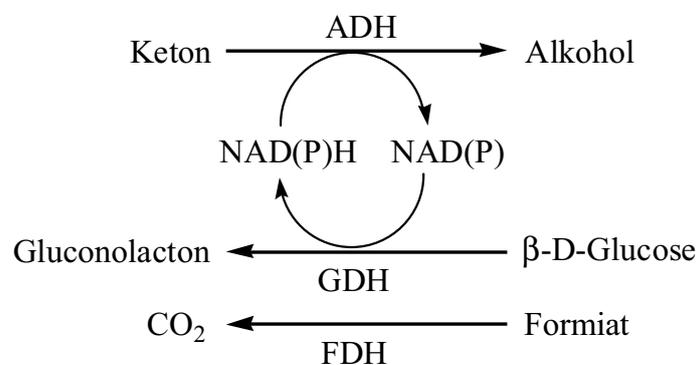


Abbildung 9: Enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung.

ADH = Alkohol-Dehydrogenase, GDH = Glucose-Dehydrogenase, FDH = Formiat-Dehydrogenase.

2.7 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen wurde durch die Computerprogramme „CLONE Manager for Windows 7“ (Scientific and Educational Software), dem „VectorNTI“-Programm (Invitrogen) und diversen Anwendungen des „Expert Protein Analysis“-Systems (<http://www.expasy.org/>) unterstützt. Abbildungen von Proteinstrukturen wurden mit dem Programm „UCSF Chimera“ (University of California, San Francisco, USA) (Pettersen *et al.*, 2004) dargestellt. Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit dem PSIPred Algorithmus erstellt (Jones, 1999; McGuffin *et al.*, 2000). Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1997) oder ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) (Larkin *et al.*, 2007). Als Enzym-Informations-Portal diente in den meisten Fällen BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.info/>) (Barthelme *et al.*, 2007).

2.8 Hochdurchsatz-Screening

Sowohl die Zellanzucht als auch die automatisierten Enzymaktivitäts-Messungen in der TECAN Workstation wurden in 96-well Polystyrol MTPs mit F-Boden (Greiner Bio One, Artikel 655101) durchgeführt. Kulturvolumen und Assayvolumen jeweils 200 μ l. Das vollständige Programmierungs-Protokoll der Workstation befindet sich im Anhang.

3 Ergebnisse

3.1 Suche nach neuen Biokatalysatoren im Metagenom-Ansatz

Nachdem es durch Sequenzierung der 16S rRNA möglich wurde, auch nicht kultivierbare Mikroorganismen in einem metagenomischen Ansatz zu beschreiben (Woese, 1987), wurde gezeigt, dass nur ca. 1 % oder weniger der mikrobiellen Diversität aus einer Umweltprobe mit Standardkulturtechniken isolierbar sind (Amann *et al.*, 1995). Um die mikrobielle Diversität auch bei der Suche nach neuen Biokatalysatoren zu gewährleisten, wurde im Metagenomansatz die gesamte DNA (das Metagenom) einer Probe, in diesem Fall eines benutzten Spültuches, direkt isoliert und nach partieller Hydrolyse in ein geeignetes Vektorsystem kloniert, wobei die erzeugte Metagenombibliothek für ein Aktivitätsscreening nach Biokatalysatoren zur Verfügung stand (Lorenz *et al.*, 2002). Das Spültuch wurde über mehrere Monate mit 2-Hexanol inkubiert, um Mikroorganismen einen Selektionsvorteil zu verschaffen, die Alkohole umsetzen können. Dabei spricht man von einer so genannten Anreicherungskultur (Entcheva *et al.*, 2001; Voget *et al.*, 2003).

3.1.1 Isolierung und Klonierung metagenomischer DNA (Weckbecker, 2005b)

Für die Konstruktion einer eigenen Metagenom-Bank wurde ein benutztes Spültuch über mehrere Monate mit Wasser, verschiedenen Medien und 2-Hexanol inkubiert. Nach der Zerkleinerung des Spültuchs erfolgte die Isolierung der DNA nach der Methode der direkten Lyse der Zelle, modifiziert nach (Zhou *et al.*, 1996). Der Vorteil der Methode der direkten Lyse liegt darin, dass dabei wesentlich höhere Ausbeuten an DNA erzielt werden als nach indirekter DNA-Isolierung.

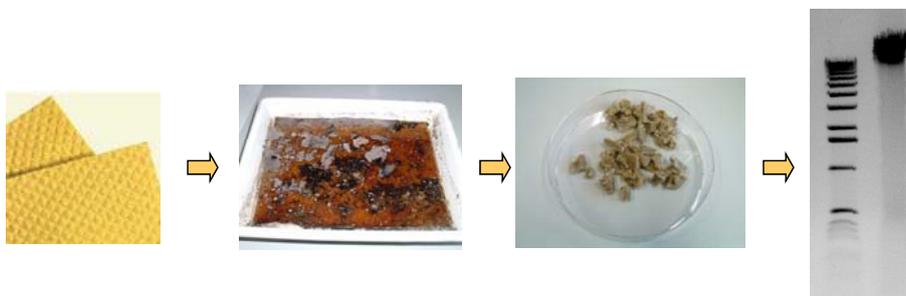


Abbildung 10: Schritte der DNA-Isolierung aus einem Spültuch.

Von links nach rechts: unbenutztes Spültuch; Spültuch nach Gebrauch und Inkubation mit verschiedenen Medien und 2-Hexanol; zerkleinertes Spültuch vor der DNA-Isolierung; Agarosegel-Elektrophorese der isolierten metagenomischen DNA. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Andrea Weckbecker.

Nach Reinigung der DNA mittels DNeasy Tissue Kit (Qiagen) erfolgte die Klonierung in das *high-copy* Plasmid pZErO-2 (2.3.4). Hierzu wurde die DNA sowie das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* partiell verdaut, um Fragmente zwischen 2 kb und 10 kb Länge zu erzeugen und diese dann in den Selektionsvektor pZErO-2 zu klonieren. pZErO-2 verfügt über einen Promotor, der in *E. coli* erkannt wird und unter dessen Kontrolle die metagenomische DNA exprimiert wird. Optimale Insertion der DNA-Fragmente in pZErO-2 wurden bei einem Vektor:Insert-Verhältnis von 1 zu 2 in der Ligationsreaktion erreicht. Ebenso wurden als mögliche Transformationsarten die Transformation mittels Hitzeschock und die Elektroporationsmethode gegenübergestellt. Die Anzahl der Klone nach Hitzeschock-Transformation war dabei um ein Vielfaches höher. Zur Charakterisierung der Metagenom-Bank wurde die Größe der integrierten DNA-Fragmente in den rekombinanten Plasmiden überprüft. Die durchschnittliche Größe lag bei ca. 2,4 kb, wobei die minimale Größe bei ca. 0,4 kb und die maximale Größe bei ca. 6 kb lag. 80 % aller isolierten Plasmide hatten metagenomische DNA integriert. Nach Transformation von *E. coli* TOP10 (2.1.1) mit der so generierten Metagenom-DNA-Bibliothek wurden zur Konservierung ca. 1000 Klone mithilfe eines Pickroboters (2.1.5) in mit LB-Km⁵⁰-Medium gefüllte Mikrotiterplatten überimpft. Diese wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet und mit 20 % Glycerin zur dauerhaften Lagerung bei -80°C versetzt.

3.1.2 Reaktivierung und Expression der Metagenom-Klone

Die in Abschnitt 3.1.1 generierten Metagenom-Klone konnten auch nach mehreren Monaten aus ihren Gefrier-Kulturen heraus in LB-Km⁵⁰-Medium mit 0,25 g/l Glucose (w/v) in Mikrotiterplatten reaktiviert werden (2.2.1). Aus dieser Vorkultur heraus wurde die eigentliche Expressionskultur in Autoinduktionsmedium (2.2.3) inokuliert. Nach Kultivierung über Nacht bei 30 °C wurden die Zellen lysiert (2.2.4) und einem aktivitätsbasierten Screening zugeführt.

Die im Vorfeld generierten Metagenom-Klone konnten auch nach mehreren Monaten der Lagerung bei -80 °C in geeignetem Medium reaktiviert werden.

3.1.3 Entwicklung eines geeigneten Hochdurchsatz-Screening-Assays

Um eine große Anzahl von Klonen testen zu können, sollte ein Screeningsystem im Hochdurchsatzverfahren etabliert werden. Dazu eignen sich prinzipiell sowohl Assays auf festem Nährboden, bei denen die Umsetzung von Substrat bzw. Cofaktor oder beispielsweise die Änderung des pH-Wertes optisch detektierbar sind, als auch photometrische Assays, die unter Umständen direkt eine quantitative Aussage über die gemessene Aktivität zulassen.

Bei dem in dieser Arbeit entwickelten Assay handelt es sich um einen photometrischen Aktivitätstest, der in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten parallel durchgeführt werden kann. Dazu wurden die Metagenom-Klone zunächst wie in (3.1.2) beschrieben angezogen und die plasmidcodierten, metagenomischen Gene im Autoinduktionsmedium exprimiert. Als „Negativkontrolle“ und zur Bestimmung möglicherweise messbarer Hintergrundaktivität wurde ein *E. coli* TOP10 Stamm mit dem Leervektor pZErO-2 gleichbehandelt mitgeführt. Als Positivkontrolle zur Überprüfung der Expressionsleistung der Zellen und der Funktionalität des Assays wurde *E. coli* TOP10 mit dem Plasmid pZErO-2_ *adh-Lk* (Weckbecker, 2005b) transformiert, welches für die ADH aus *Lactobacillus kefir* codiert. Nach Expression über Nacht bei 30 °C wurde die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mit jeweils 150 µl TEA-Lysozypuffer pro *well* aufgeschlossen (2.2.4). Nach erneuter Zentrifugation zur Sedimentierung von Zelltrümmern und Membranbestandteilen, die in Lösung den photometrischen Assay stören könnten, wurden 20 µl des Rohextraktes durch ein automatisches Pipettiersystem (2.1.5) mit 180 µl Substratlösung (30 mM Substrat, 0,1 mM NADH, 0,1 mM NADPH in 100 mM TEA) versetzt und die Aktivität durch Abnahme der Cofaktorkonzentration bei 340 nm bestimmt (2.4.2). Die Messung im Mikrotiterplatten-Photometer lief über 6:42 min, während dieser Zeit wurde für jede Kavität eine Kinetik bestehend aus 8 Messpunkten aufgenommen. Als Substrate in diesem Screening wurden eingesetzt: (1) Aceton, (2) Acetophenon, (3) Hexanal und (4) Acetessigsäureethylester. Alle Klone wurden mit sämtlichen Substraten gemessen, d. h. es wurden ca. 4000 Aktivitätstests durchgeführt.

Nach entsprechender Konzentrations-Abstimmung der im Assay eingesetzten Komponenten wurde die komplette Metagenom-Bank in einem speziell entwickelten, automatisierten photometrischen Aktivitätsscreening mit 4 unterschiedlichen Substraten durchgemustert.

3.1.4 Identifizierung von Klonen mit Dehydrogenase-Aktivität

Die Funktionalität des Assays konnte durch eine Aktivität von ca. 500 mU/ml mit der Positivkontrolle ADH-*Lk* und dem Substrat Hexanal bestätigt werden. Aus den 4000 Aktivitätsmessungen wurden 30 Klone ausgewählt, die nach Abzug der leichten Hintergrundaktivität (speziell mit NADH) zunächst den Anschein erweckt haben, als würden sie das angebotene Substrat umsetzen. Dabei handelte es sich um 19 Klone, die Aktivität mit Hexanal zeigten, 10 Klone, die Aktivität mit Acetessigsäureethylester (EAA) aufwiesen, und ein Klon, der scheinbar beide Substrate umzusetzen vermochte.

Bei dem Versuch, die gefundenen Aktivitäten nach erneuter Expression in einem Aktivitätstest im Küvettenmaßstab (2.4.2) zu reproduzieren, konnten lediglich 9 der 19 Klone, die zunächst Aktivität mit dem Substrat Hexanal gezeigt haben, die initialen Werte reproduzieren. Die gemessenen Aktivitäten lagen dabei im Bereich zwischen 23 und 140 mU/ml. Weder mit den 10 Klonen, die im ersten Screening Aktivität mit EAA zeigten, noch mit dem Klon, der Aktivität mit EAA und Hexanal zeigte, konnte die gemessene Aktivität reproduziert werden. Die Plasmid-DNA der 9 Klone, die reproduzierbare Aktivität mit Hexanal zeigten, wurde isoliert (2.3.1) und einer Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* und *NotI* unterzogen (2.3.3). Die Restriktionsanalyse (2.3.2, ohne Abbildung) ergab, dass in allen 9 pZErO-2 Vektoren metagenomische DNA zwischen 1 kb und 4 kb Länge inseriert war. Die Plasmid-DNA wurde sequenziert (2.3.6). Das Ergebnis des Screenings ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Lediglich in zwei der Sequenzen konnten Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) identifiziert werden (*blastx*, 2.7), die für Proteine codieren, welche in logischem Zusammenhang mit der gemessenen Aktivität stehen könnten. Dabei handelt es sich um Proteine, die Sequenzhomologien zum Einen zu einer NADPH-abhängigen Sulfitreduktase aus *Rhodospirillum rubum* und zum Anderen zu einer putativen Oxidoreduktase aus *Burkholderia pseudomallei* aufweisen. Letztendlich ist aber keiner der ORFs, der die Homologie-Treffer lieferte, komplett sequenziert, da die in die Vektoren inserierten DNA-Fragmente zu groß sind, um eine Sequenzüberlappung bei der Sequenzierung mit MCS-flankierenden Primern zu erzeugen. Diese Ansätze konnten daher nicht weiter verfolgt werden. Nichtsdestotrotz konnte in einem der Metagenomplasmide ein kompletter *open reading frame* identifiziert werden, der für eine putative Oxidoreduktase ohne signifikante Homologien zu bereits annotierten Oxidoreduktasen codiert. Dieses Gen (*ormI*) sowie das entsprechende Genprodukt wurden im Folgenden näher untersucht.

Tabelle 8: Übersicht über die Entwicklung des Metagenomscreenings. Die im 2. Screening ermittelten Aktivitäten wurden durch den Einsatz von 50 µl GZE nach Kultivierung der entsprechenden Klone in Autoinduktionsmedium mit 30 mM Hexanal und je 0,1 mM NADH und NADPH bei 30 °C in der Küvette (1ml-Maßstab) gemessen. Dabei war keine signifikante Hintergrundaktivität, verursacht durch den E.coli Rohextrakt, zu messen. Die Insertgröße ist ein Ergebnis der Sequenzierung mit M13 forward und M13 reverse Primern. Sind 2 Werte angegeben, so kam es zu keiner Überlappung der Sequenzen und das Insert ist größer als die Summe der Einzelsequenzen. Die Restriktionsanalyse von Klon 26 ergab, dass das Insert ca. 1800 bp groß ist, jenes von Klon 19 etwa 4500 bp. Aus diesem Klon (Fett) wurde dann letztendlich auch das Gen *orm1* isoliert.

Nr.	Klon	Aktivität im 1. Screening mit	Aktivität im 2. Screening	Insertgröße	ORFs > 200 AS
1	AW1H7	Hexanal	-/-	-/-	-/-
2	AW1H9	Hexanal	-/-	-/-	-/-
3	AW1H10	EAA	-/-	-/-	-/-
4	AW4E2	Hexanal	-/-	-/-	-/-
5	AW2F2	Hexanal	-/-	-/-	-/-
6	AW2F3	EAA	-/-	-/-	-/-
7	AW3B2	EAA	-/-	-/-	-/-
8	AW3B3	Hexanal	32 mU/ml	1561 bp	3
9	AW3B4	Hexanal	-/-	-/-	-/-
10	AW3C3	Hexanal + EAA	-/-	-/-	-/-
11	AW3C5	Hexanal	-/-	-/-	-/-
12	AW3E4	EAA	-/-	-/-	-/-
13	AW3E9	Hexanal	38 mU/ml	1013 + 985 bp	5
14	AW3F10	Hexanal	38 mU/ml	1142 bp	3
15	AW3F12	EAA	-/-	-/-	-/-
16	AW3H10	EAA	-/-	-/-	-/-
17	AW4H9	Hexanal	-/-	-/-	-/-
18	AW4H12	Hexanal	25 mU/ml	1796 bp	1
19	AW5D2	Hexanal	33 mU/ml	966 + 995 bp	5
20	AW6D2	Hexanal	23 mU/ml	1006 + 997 bp	2
21	AW7G2	Hexanal	-/-	-/-	-/-
22	AW7H1	Hexanal	-/-	-/-	-/-
23	AW7H3	EAA	-/-	-/-	-/-
24	AW8E3	EAA	-/-	-/-	-/-
25	AW8E5	Hexanal	140 mU/ml	961 bp	2
26	AW8H2	Hexanal	120 mU/ml	kein Sequenzierergebnis	
27	AW9D2	Hexanal	92 mU/ml	1809 bp	1
28	AW9E8	EAA	-/-	-/-	-/-
29	AW10D1	EAA	-/-	-/-	-/-
30	AW10E2	Hexanal	-/-	-/-	-/-

Alle Sequenzierergebnisse befinden sich im Anhang.

Über das Aktivitätsscreening wurden einige Klone identifiziert, die reproduzierbare Aktivität mit dem Substrat Hexanal aufwiesen. Restriktionsanalysen und Sequenzierung führten zu der Identifizierung des Gens der putativen Oxidoreduktase *orm1*.

3.1.5 Sequenzbetrachtungen zur putativen Oxidoreduktase ORM1

Nukleotidsequenz von *orm1*

ATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTA
 CTAGTGGATCTGCCGCGCAAGGCGCTGCACGCCCGCGCCCGACCGCGAAACTCACCACGGCCA
 GCGCGAGCATCAGGTCGCCGATGCCGGCGCTCGAAAGCCCCACGCCGGGGTGGCTCAACACCACC
 GCGGCCACACCGGCAAAGCCCAGCGCCACGCCGAGCATGCGTCGTGGTGTGAAGCGCTCGTGAA
 CACCAGCGCAGCCGTCAGCGCCGAGACCAGTGGGCTCAGCGCCATGATGAGCGCGCCATTGGTGG
 CGGTGGAGCGCAGCAGCCCCTGCGCAAACAGGATCTGGTTCGCATAGACCATGAGGAACGCGCAG
 CCCGTCATGCCCGCGAACTGCCTGGCGCCCAGCACGGGCAGCCCAGCGCCGCCACAGCACGAT
 GGCCGTGAGCGCCACGCAGGCCATCACCATGCGCAGTGCCGCGAGCGGCAGCGACTCGAAGGACG
 TGGTGAGCGCCTTCACGGCGGACACATTCACGCCCCACAACAGCATGGCCAGCAGCATCCAGCCTT
 GCACCGATGCGGGCGTGGCGCCCCTGGGGCGCGCCGGGGCGGTACATCAGCTTTCGAGGGCGTT
 CCACATTTTCATGTCGCGCTCCGCCGTCCAGATGCGCGGATGCACATGGCCCGTGGCCTCGTCGTA
 GGCGCGGGTCACGTGAAGGGCATGCAGTGGTTCGAAGATCACCCAGTGGCCGTAGGTCGGGCGCA
 GCGCGGCCACGGTTTCCTTGTAGATGA

Aminosäuresequenz von ORM1

MHARAAASVMDICRIPAHWRPLLVDLPRKALHARAADRETHHGQREHVADAGARKPHAGVAQHHR
 GHTGKAQRHAEHASWCEALAEHQRSRQRDQWAQRHDERAIGGGGAQQPLRKQDLVRIDHEERAAR
 HARELPGAQHGQPAAPPQHDGRERHAGHHHAQCRERQRLEGRGERLHGGHHIAPQQHGQHPALHR
 CGRGARGARRGGHISFRGRSTFRRCRPPSRCADAHGPWPRRRRGSRRRACSGRRSPSGRRSGAARPRF
 CR

Der *open reading frame* des Gens *orm1* (810 bp) codiert für ein 269 AS Protein (ORM1 – OxidoreduktaseMetagenom1) mit einer berechneten Masse von 30,4 kDa.

Molekulargewicht und AS-Kettenlänge deuten in diesem Zusammenhang auf ein Protein aus der Gruppe der *short-chain* Dehydrogenasen hin (Jörnvall, 1995; Filling *et al.*, 2003). Allerdings weist ORM1 nicht das höchstkonservierte Tyrosin (Y156) auf. Ein Charakteristikum, das ebenfalls für eine *medium-chain* Dehydrogenase spricht, ist das Glycin-reiche **GXGXXG**-Motiv sowie dessen Position innerhalb der Sequenz (Tabelle 1). Dieses Motiv ist Teil des so genannten „Rossmann *folds*“ und ist an der Cofaktorbindung direkt beteiligt (Duine, 1991; Carugo & Argos, 1997; Perozich *et al.*, 2001; Persson *et al.*, 2003; Pletnev *et al.*, 2004). Etwa 20-25 Aminosäuren C-terminal des Glycin-reichen Motivs befindet sich in NADP(H)-abhängigen Dehydrogenasen eine positiv geladene Region aus 2-4 AS, die mit dem negativen Phosphatrest des NADP(H) interagiert. Dies ist auch hier der Fall und deutet somit darauf hin, dass das funktionelle Protein eine Präferenz für NADP gegenüber NAD haben könnte (Abbildung 11).

• • • +
 195 - LHRCGRGARGARRGGHISFRGRSTFRCRAPP SRCADAHG - 235

Abbildung 11: Teil der Primärstruktur von ORM1.

Aufgrund der Ladungsverteilung im Bereich ca. 20 AS C-terminal (+) des GxGxxG-Motives (•) kann man davon ausgehen, dass es sich um ein Enzym mit einer Präferenz für NADP handelt.

Ebenso lassen sich aus der Sequenz mit diversen Vorhersage-Programmen (2.7) keine Hinweise auf ein Metallion-Bindemotiv ableiten. Die meisten *short-chain* Dehydrogenasen sind im Gegensatz zu *medium-chain* Dehydrogenasen metallunabhängig (Jörnvall *et al.*, 1999).

Möglicherweise ist das Gen eukaryotischen Ursprungs, da bei der Vorhersage posttranslationaler Modifikationen aufgefallen ist, dass das Protein an einigen Positionen Phosphorylierungs-Sequenzabschnitte aufweist (Abbildung 12). Diese Vorhersage ist allerdings meist relativ unzuverlässig und zeigt auch in manchen prokaryotischen Proteinen Phosphorylierungsmuster an. Die Tatsache, dass reproduzierbare Aktivität bei heterologer Expression in *E. coli* TOP10 gemessen wurde, spricht dafür, dass das Protein entweder gar nicht posttranslational modifiziert wird oder diese Modifikationen für die Funktionalität nicht entscheidend sind.

Laut bioinformatischer Vorhersagetools (2.7) ist das Gen Intron-frei.

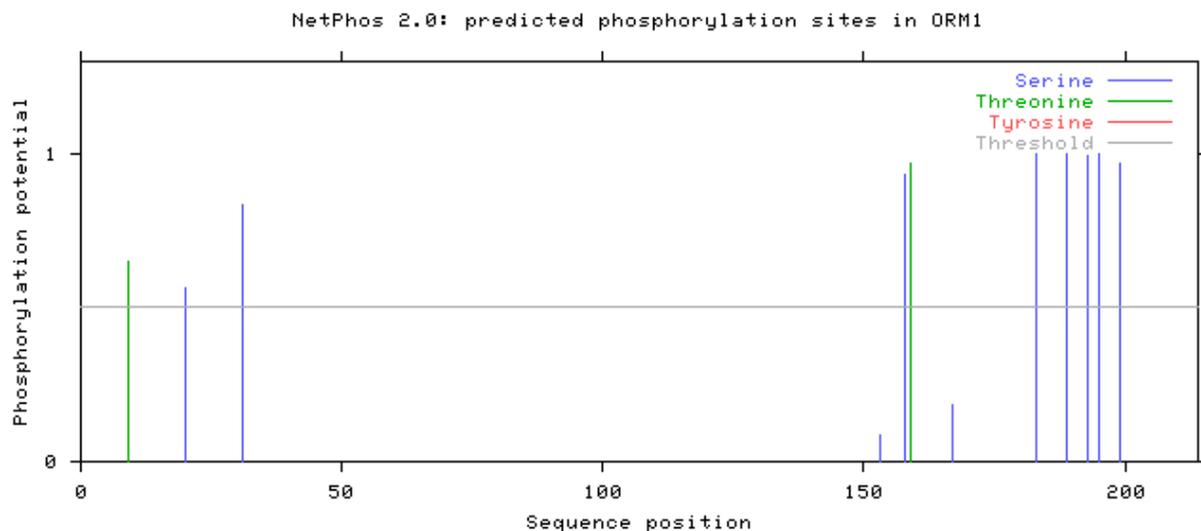


Abbildung 12: Vorhersage von posttranslationalen Modifikationen für ORM1 - Phosphorylierung.

Die Vorhersage wurde mit dem NetPhos 2.0 Tool erstellt.

Des Weiteren wurde überprüft, ob und in welchem Ausmaß seltene Codons in *orm1* vorkommen. Als Referenz diente *Escherichia coli* K12 (Fuhrmann *et al.*, 2004). *orm1* besteht aus 270 Codons, von denen 23 (8,5 %) in *E. coli* K12 seltener als 20 % und davon 7 (2,6 %) sogar seltener als 5 % verwendet werden.

Tabelle 9: In *orm1* vorkommende Codons, die in *E. coli* K12 nicht häufig genutzt werden.

Codon	Aminosäure	Nutzung in <i>E. coli</i> K12 [%]
AGA	R	5
AGG	R	7
ATA	I	12
CGA	R	16
CGG	R	16
CTA	L	11

Sequenzbetrachtungen von ORM1 deuten darauf hin, dass es sich um eine eher kurze *medium-chain* Dehydrogenase mit NADP-Präferenz handeln könnte, die möglicherweise eukaryotischen Ursprungs ist.

3.1.6 Isolierung, Amplifizierung und Klonierung einer putativen Oxidoreduktase aus der metagenomischen DNA-Bibliothek

In einem nächsten Schritt sollte das Gen, dessen Genprodukt mittels Aktivitätsnachweis gefunden und durch Sequenzierung identifiziert werden konnte, zur heterologen T7-basierten Expression in *E. coli* in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Dazu wurde zunächst die Plasmid-DNA des entsprechenden Metagenom-Klons isoliert (2.3.1). Dieses Plasmid diente als Matrize für eine Standard-PCR (2.3.7) mit spezifischen Oligonukleotiden für *orm1* (2.1.3), an die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* bzw. *HindIII* angehängt wurden (2.3.3). Der PCR-Erfolg konnte durch Agarose-Gelelektrophorese (2.3.2) kontrolliert werden (Abbildung 13). Das erhaltene PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und in einen mit gleichen Enzymen hydrolysierten Expressionsvektor pET-21a(+) (2.1.2) unter Kontrolle des PT7_{lac} kloniert (2.3.3).

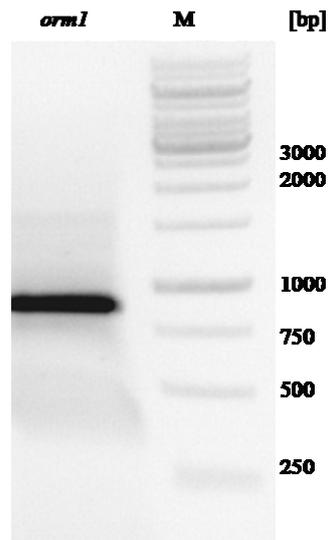


Abbildung 13: Agarosegelelektrophorese des PCR-Produkts *orm1*.

Die erwartete Produktgröße beträgt 810 bp. M = Marker (Fermentas 1kb-Ladder).

Die erfolgreiche und mutationsfreie Insertion des *orm1*-Gens in den Expressionsvektor wurde durch eine Kolonie-PCR (2.3.9) mit genspezifischen Oligonukleotiden und eine anschließende Sequenzierung (2.3.6) verifiziert. Das so erstellte Konstrukt wurde pAS-30 genannt.

Das Gen *orm1* konnte erfolgreich amplifiziert und in einen Expressionsvektor unter Kontrolle von PT7_{lac} kloniert werden.

3.1.7 Expression und Aktivität der putativen Oxidoreduktase

In einer Expression des Gens der putativen Oxidoreduktase *orm1* in *E. coli* TOP10 im Autoinduktions-System (2.2.3) bei 30 °C über Nacht konnte nach Abzug der leichten Hintergrund-Aktivität (30 mU/ml) im Rohextrakt (2.2.4) eine Aktivität (2.4.2) von 610 mU/ml mit 30 mM Hexanal als Substrat und 0,2 mM NADPH als Cofaktor gemessen werden. Mit 0,2 mM NADH als Cofaktor betrug die Aktivität nach Subtraktion der Hintergrundaktivität (280 mU/ml) 360 mU/ml.

Daraufhin wurde das Gen in *E. coli* BL21 (DE3) in LB-Medium exprimiert. Die Expression wurde für 3 Stunden bei 37 °C nach Induktion mit 0,5 mM IPTG durchgeführt. Nach Gewinnung des Rohextraktes konnten hier allerdings keine Aktivität gemessen werden. Eine anschließende Expressionskontrolle durch SDS-PAGE (2.4.4) konnte diesen Befund insofern bestätigen, dass in Höhe des ORM1-Molekulargewichtes von ca. 30 kDa weder in der

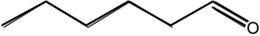
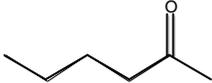
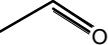
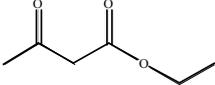
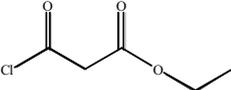
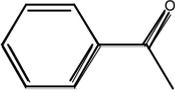
löslichen, noch in der unlöslichen Proteinfraction eine prominente Bande im Vergleich zur Leervektorkontrolle detektiert werden konnte (ohne Abbildung). Die SDS-PAGE Analyse der konstitutiven Expression in *E. coli* TOP10, also der Expressionskultur, mit der aktives Protein produziert worden war, führte zu dem Ergebnis, dass ebenfalls keine eindeutige Proteinbande entsprechenden Molekulargewichts zu erkennen war. Ursächlich hierfür könnte sein, dass die ORM1-Bande von einer relativ stark ausgeprägten Proteinbande eines *E. coli*-eigenen Proteins, das auch in der Kultur mit dem entsprechenden Leervektors vorhanden ist, überlagert wird.

Eine Bildung von *inclusion bodies* wurde auch bei konstitutiver *orm1*-Expression nicht beobachtet.

Mit dem Rohextrakt der konstitutiven Expression wurde ein Substratspektrum aufgenommen (Tabelle 10) und das Reaktionsprodukt der Acetophenon-Reduktion gaschromatographisch untersucht (2.4.3). Dazu wurden 100 μ l GZE in eine Umsetzungsreaktion mit 30 mM Acetophenon, 1 mM NADPH, 100 mM β -D-Glucose, 5 U GDH (aus *B. subtilis*, gereinigt nach heterologer Expression in *E. coli* BL21 (DE3)) in 100 mM Tris-HCl pH 7,0 bei 37 °C und 1000 rpm eingesetzt. Das eingesetzte Acetophenon war nach 16 Stunden komplett umgesetzt. Anhand von Referenz-Substraten konnte gezeigt werden, unter dabei (*S*)-1-Phenylethanol entstand. Eine Bildung von (*R*)-1-Phenylethanol konnte unter den gewählten Bedingungen (GC-Analyse von 1 μ l der organischen Phase, wie beschrieben in 2.4.3) nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Aktivitäten von ORM1 nach konstitutiver Expression in *E. coli* TOP10.

Von den Aktivitäten wurde die mit der Leervektorkontrolle gemessene Hintergrundaktivität (280 mU/ml mit NADH, 30 mU/ml mit NADPH) abgezogen. Der Aktivitätstest wurde mit Rohextrakt bei 30 °C durchgeführt.
n.m. = nicht messbar, ausschließlich Hintergrundaktivität.

Substrat [30 mM]	Strukturformel	mU/ml [0,2 mM NADH]	mU/ml [0,2 mM NADPH]
Hexanal		360	610
2-Hexanon		90	280
Acetaldehyd		290	490
Aceton		n. m.	80
Diacetyl		n. m.	n. m.
EAA		60	100
4-Cl-EAA		n. m.	70
Acetophenon		70	175

Bei konstitutiver Expression von *orm1* unter Kontrolle des *lac*-Promoters im Autoinduktionsmedium mit *E. coli* TOP10 wurden Aktivitäten von 600 mU/ml (NADPH) respektive 300 mU/ml (NADH) mit dem Standardsubstrat Hexanal (30 mM) gemessen. Eine T7-basierte und mit IPTG induzierte Expression in *E. coli* BL21 (DE3) lieferte kein aktives Protein. ORM1 zeigt eine ca. 2-fache Präferenz für NADP gegenüber NAD. ORM1 reduziert Acetophenon (*S*)-selektiv.

3.2 Kombination biokatalytisch relevanter Eigenschaften zweier Alkohol-Dehydrogenasen in chimären ADHs

Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit ist die Kombination biokatalytisch relevanter Eigenschaften zweier Alkohol-Dehydrogenasen in einem synthetischen Protein, einer Chimäre aus den beiden parentalen ADHs. Bei diesen ADHs handelt es sich zum einen um die so genannte ADH105, die einem isländischen Metagenom-Isolat entstammt und mit freundlicher Genehmigung der Firma Codexis (Redwood City, CA, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Bei der anderen parentalen ADH handelt es sich um die bereits gut charakterisierte Alkohol-Dehydrogenase ADH-Lb aus *Lactobacillus brevis* (Niefind *et al.*, 2003; Schlieben *et al.*, 2005). Tabelle 11 zeigt eine Gegenüberstellung einiger Charakteristika der beiden Enzyme.

Tabelle 11: Gegenüberstellung einiger Charakteristika von ADH105 und ADH-Lb.

	ADH105	ADH-Lb
ADH-Klassifizierung	<i>short-chain</i> ADH	<i>short-chain</i> ADH
Größe / Molekulargewicht	249 AS, 26,6 kDa	252 AS, 26,7 kDa
Coenzym-Präferenz	NAD	NADP
Substrat-Präferenz	aliphatisch	aromatisch
Stereo-Selektivität	(<i>R</i>)	(<i>R</i>)
2-Propanol-Akzeptanz	nein	ja

Als für die Biokatalyse sinnvolle Kombination der in Tabelle 11 aufgelisteten Eigenschaften soll das synthetisch erzeugte Protein (ADH-Chimäre, ADH-C) NAD-abhängig sein, aromatische Substrate akzeptieren und diese (*R*)-spezifisch umsetzen. Eine substratgekoppelte Coenzymregenerierung (2.6.1) mit 2-Propanol als Cosubstrat ist dabei die Methode der Wahl.

3.2.1 Klonierung, heterologe Expression und Substratspektrum der ADH105

Matrizen-DNA in Form eines Rhamnose-induzierbaren pJOE-Derivats sowie Sequenzdaten des Gens *adh105* stellte die Firma Codexis (Redwood City, CA, USA) mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung. Anhand der Gensequenz wurden spezifische Oligonukleotide (2.1.3) zur Amplifizierung des Gens durch eine Standard-PCR (2.3.7) entwickelt. An diese Oligonukleotide wurden die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BamHI* angehängt. Das Ergebnis der PCR konnte durch Agarosegelelektrophorese (2.3.2)

kontrolliert werden. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde durch die Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BamHI* hydrolysiert und in den gleich behandelten Expressionsvektor pET-19b unter Kontrolle des PT7_{lac} kloniert (2.1.2; 2.3.3). Die erfolgreiche Klonierung und fehlerfreie Amplifikation des Gens konnte durch DNA-Sequenzierung (2.3.6) bestätigt werden. Das so erstellte Expressionsplasmid wurde pAS-18 genannt.

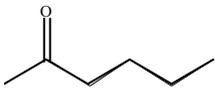
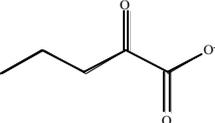
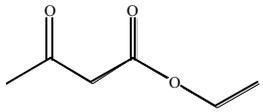
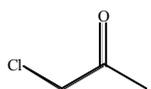
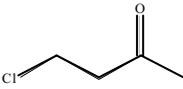
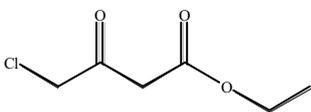
In umfangreichen Versuchen wurden zunächst die optimalen Expressionsbedingungen (variable Parameter: Expressionsstamm, Expressionsdauer, Temperatur) für das Gen *adh105* unter Kontrolle des T7-Promoters evaluiert. Bei einer Expression des Gens *adh105* im Stamm *E. coli* BL21 (DE3) bei 30°C über Nacht (Induktion der Genexpression mit 0,5 mM IPTG) werden wenig bis gar keine *inclusion bodies* gebildet (ohne Abbildung). Diese Bedingungen wurden somit als Standardbedingungen für weitere Expressionsversuche definiert. Zwar akkumuliert auch bei höheren Expressionstemperaturen (37 °C) und gesteigerter Induktorkonzentration (bis 1 mM IPTG) ADH105 nur zu geringen Anteilen in Form von *inclusion bodies*, jedoch wird bei den evaluierten Bedingungen die höchste volumetrische Aktivität im Rohextrakt erreicht.

Innerhalb der Aminosäuresequenz finden sich keine „Zinkfinger“-Bindemotive, die durch alternierende Folgen von Cysteinen und/oder Histidinen charakterisiert sind. Dementsprechend konnte in einem weiteren Versuch belegt werden, dass der Zusatz von Magnesium-, Zink- bzw. Cobaltionen (je 0,2 mM) zum Expressionsmedium keinerlei Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hatte.

Zum Substratspektrum der ADH105 gehören in erster Linie aliphatische Ketone und Ketoester. Mit gesteigerter Aktivität werden halogenierte Substrate wie 4-Cl-EAA oder Substrate mit hoch-polaren Funktionen wie das Ethylpyruvat umgesetzt. Tabelle 12 zeigt eine Übersicht mit den zugehörigen Aktivitäten.

Tabelle 12: Substratspektrum der ADH105.

Dargestellt sind unterschiedliche aliphatische Substrate, ihre Strukturformeln sowie die spezifische Aktivität der ADH105 für die Reduktion von 50 mM Substrat (Coenzym 0,2 mM NADH). In den Aktivitätstest (2.4.2) eingesetzt wurden 10 µl hitzedenaturiertes GZE, welches wie in 2.2.4 beschrieben gewonnen wurde.

Substrat	Strukturformel	spezifische Aktivität [U/mg]
2-Hexanon		3,2
Ethylpyruvat		88
EAA		16
Mono-Cl-Aceton		94
4-Cl-Butanon		28,4
4-Cl-EAA		96

Um zu überprüfen, ob der Einsatz von hohen Konzentrationen (> 100 mM) halogenierten Substrates zu Enzyminaktivierung führen kann, wurde eine Umsetzung mit enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung (2.6.2) mit der ADH105 durchgeführt. In die Reaktion eingesetzt wurden 250 mM 4-Cl-EAA, wobei das Coenzym NADH durch ein GDH-System unter β -D-Glucose-Oxidation regeneriert wurde. In definierten Zeitabständen wurden Proben aus der Umsetzungsreaktion entnommen und in ihrer Zusammensetzung gaschromatographisch untersucht (2.4.3). In Abbildung 14 ist die Menge an gebildetem (*S*)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester über der Zeit aufgetragen.

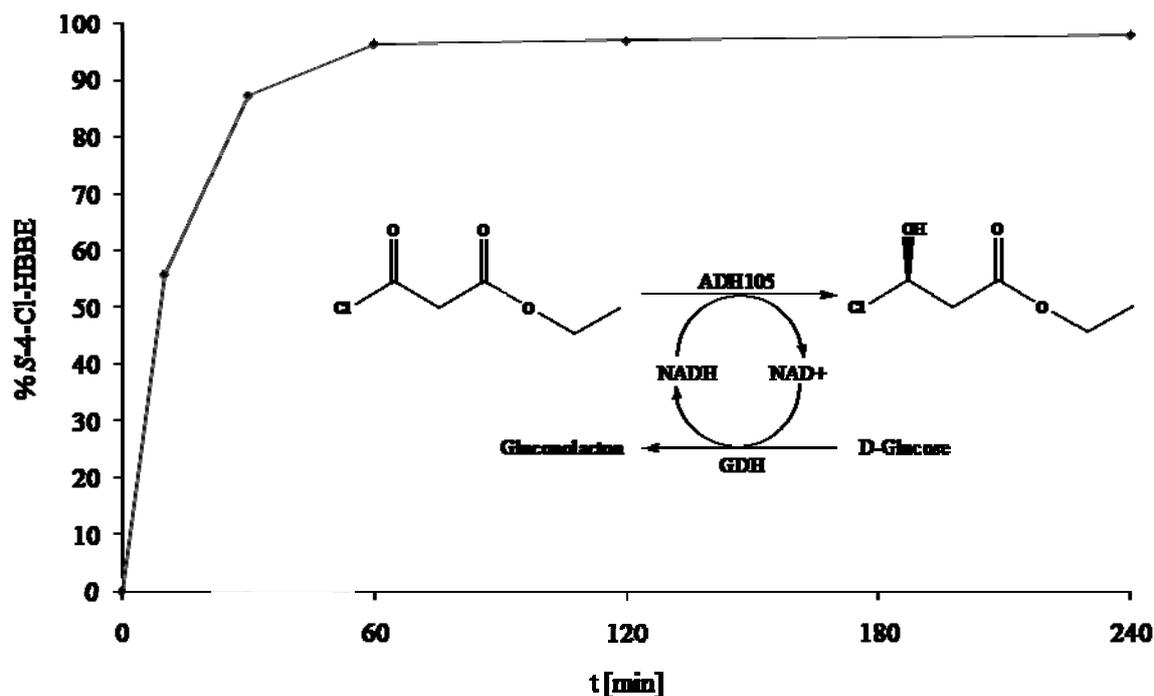


Abbildung 14: ADH105-katalysierte Umsetzung von 4-Cl-EAA zu (S)-4-Cl-3-HBEE.

Eingesetzt wurden 250 mM 4-Cl-EAA, 300 mM β -D-Glucose, 1 mM NAD⁺, 5 U ADH105, 5 U GDH, 37 °C. Die Umsatzrate betrug 97,96 %. In die Reaktion eingesetzt wurde hitzedenaturierter ADH105-GZE, welches wie in 2.2.4 beschrieben gewonnen wurde. Im Falle der GDH wurde ein elektrophoretisch zur Homogenität aufgereinigtes Präparat einer heterolog in *E. coli* exprimierten *Bacillus subtilis* GDH eingesetzt.

Die Menge an halogeniertem Substrat wurde unter regenerativen Bedingungen nach 4 Stunden nahezu vollständig (~98%) und enantiomerenrein umgesetzt. Die Bildung von (R)-4-Cl-HBEE konnte nicht nachgewiesen werden. Dementsprechend konnte festgestellt werden, dass die ADH105 nicht durch 250 mM 4-Cl-EAA inhibiert wird.

Das Gen *adh105* konnte erfolgreich amplifiziert und in pET-19b unter Kontrolle von PT7_{lac} kloniert werden. Die Expression in *E. coli* BL21 (DE3) bei 30 °C über Nacht nach Induktion der Genexpression mit 0,5 mM IPTG wurde als optimal evaluiert. ADH105 ist eine NAD-abhängige *short-chain* Dehydrogenase mit einer Substratpräferenz für halogenierte aliphatische Ketone und Ketoester und wird nicht durch hohe Konzentrationen halogenierten Substrats (250 mM 4-Cl-EAA) inhibiert.

3.2.2 Reinigung der ADH105

Zur genaueren biochemischen Charakterisierung, wie z. B. zur Aufnahme von K_m -Werten, sollte das Protein in aufgereinigter Form vorliegen.

Die ADH105 ist ein Enzym, dessen Gen aus den isländischen „heißen Quellen“ isoliert wurde. Dementsprechend ist es sehr thermostabil. Diese Eigenschaft ermöglicht es, einen relativ guten Reinigungseffekt durch eine Hitzedenaturierung des GZE nach der Expression zu erzielen (2.2.4). Der dabei erhaltene, hitzedenaturierte Rohextrakt (hGZE) wurde durch eine nachgeschaltete Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF als Säulenmaterial (2.5.1) weiter gereinigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt.

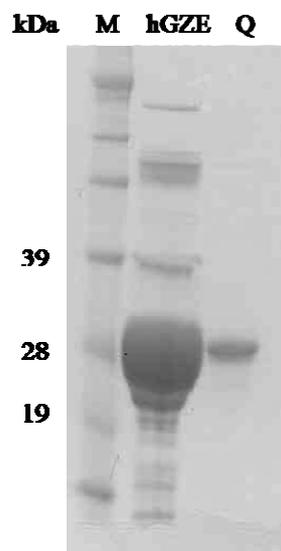


Abbildung 15: SDS-PAGE ADH105 nach Anionenaustauschchromatographie.

M = Massenstandard, hGZE = hitzedenaturierter Rohextrakt nach Expression in *E. coli* BL21 (DE3),
Q = aufgereinigte ADH105.

Die spezifische Aktivität der ADH105 (30 mM 4-Cl-EAA, 0,2 mM NADH) betrug im Rohextrakt 22 U/mg, nach Hitzedenaturierung 71 U/mg und nach der Anionenaustauschchromatographie 96 U/mg. Der Aufreinigungsfaktor liegt bei 4,4.

Eine weitere Aufreinigungs-Strategie bestand darin, *adh105* in Form eines Fusionsproteins zu exprimieren, an das C-terminal 6 Histidin-Reste angehängt sind. Dieses Fusionsprotein kann dann durch IMAC (2.5.3) von den restlichen Proteinen des Rohextraktes, die über keinen C-terminalen His₆-tag verfügen, abgetrennt und somit aufgereinigt werden. Dazu wurde das Gen *adh105* ohne Stopp-Codon in einer Standard-PCR (2.3.7) mit Oligonukleotiden amplifiziert, an die die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *HindIII*

angehängt wurden. Das Ergebnis der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese (2.3.2) kontrolliert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde durch die Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *HindIII* hydrolysiert und in den gleich behandelten Expressionsvektor pET-22b unter Kontrolle des $PT7_{lac}$ kloniert (2.1.2; 2.3.3). Die erfolgreiche Klonierung und fehlerfreie Amplifikation des Gens wurde durch DNA-Sequenzierung (2.3.6) bestätigt. Durch diese Klonierungsstrategie ist gewährleistet, dass die *adh105* als C-terminales Hexahistidin-Fusionsprotein exprimiert wird. Das so erstellte Expressionsplasmid wurde pAS-19 genannt.

Nach erfolgreicher Expression von ADH105::His₆ wurde eine IMAC (2.5.3) mit Ni²⁺-NTA als Säulenmaterial durchgeführt. Der Reinigungsverlauf wurde durch SDS-PAGE (2.4.4) dokumentiert und ist in Abbildung 16 dargestellt. Durch IMAC konnte die ADH105 nahezu elektrophoretisch homogen aufgereinigt werden. Leider war das Fusionsprotein ADH105::His₆ inaktiv, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde. Möglicherweise behindert der C-terminale Hexahistidin-*tag* eine korrekte Multimerisierung der ADH105, die zur Ausbildung eines katalytisch aktiven Proteins essentiell ist (s. 3.2.3).

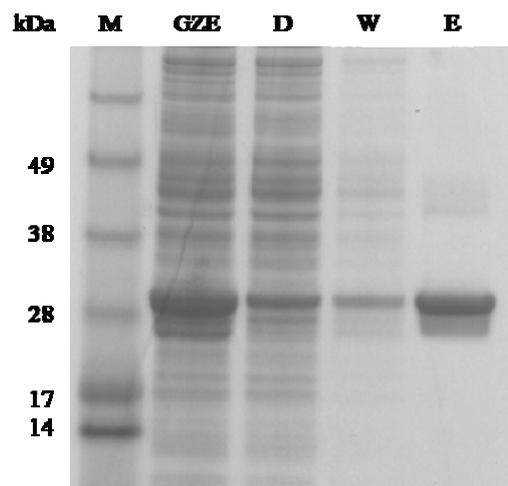


Abbildung 16: SDS-PAGE des IMAC-Reinigungsverlaufs ADH105::His₆.

M = Massenstandard, GZE = Rohextrakt nach Expression in *E. coli* BL21 (DE3), D = Durchlauf,
W = Waschfraktion, E = Elutionsfraktion.

Die ADH105 in aktiver Form konnte durch Anionenaustausch-Chromatographie elektrophoretisch homogen aufgereinigt werden. ADH105 als Fusionsprotein mit einem C-terminalen Hexahistidin-*tag* ist katalytisch inaktiv.

3.2.3 Bestimmung der Masse des nativen Holoenzymmultiplex ADH105

Die meisten der bislang beschriebenen *short-chain* Dehydrogenasen sind Dimere oder Tetramere (Jörnvall, 1995; Filling *et al.*, 2003). Um zu überprüfen, in welchem Quartärstruktur das native ADH105-Enzym vorliegt, wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie (2.5.2) durchgeführt. In die Gelfiltrations-Chromatographie wurde hitzedenaturierter Rohextrakt eingesetzt (3.2.2). Der relevante Ausschnitt des Chromatogramms ist in Abbildung 17 dargestellt. Über die Messung der Enzym-Aktivität (2.4.2) konnte bestimmt werden, dass die ADH105 nach einer Retentionszeit von 74 Minuten von der Säule eluiert. Gemäß der Eichgeraden, mit der die Säule im Vorfeld kalibriert wurde, entspricht eine Retentionszeit von 74 Minuten einem mittleren Molekulargewicht von 115 kDa. Da die Masse eines ADH105-Monomers bei berechneten 26,6 kDa liegt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem nativen Enzym ADH105 mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Homo-Tetramer handelt. Diese Erkenntnis wird durch Strukturvorhersagen (2.7) gestützt.

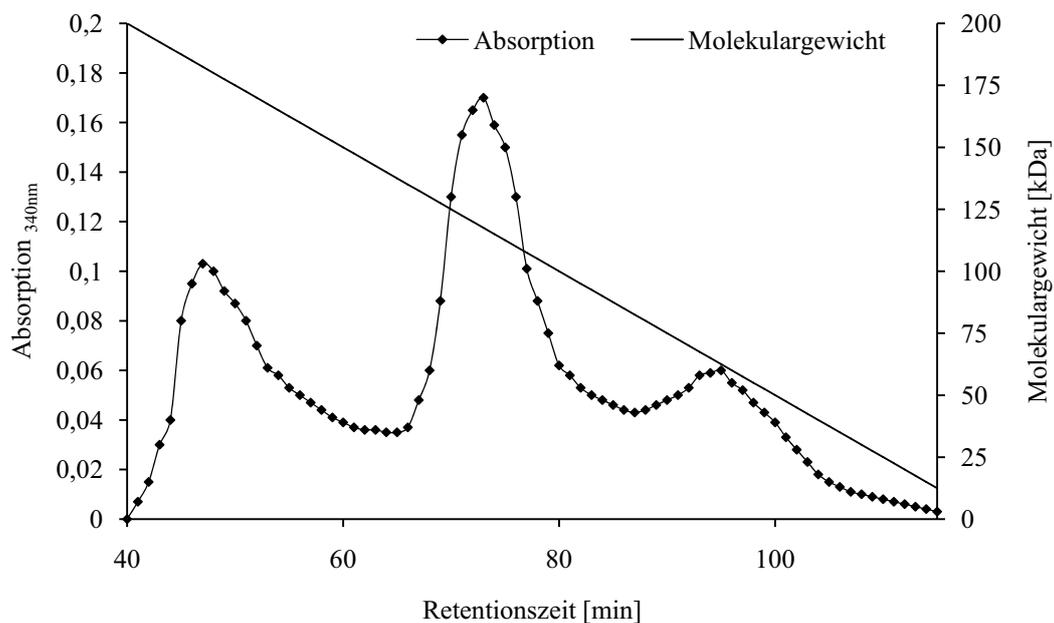


Abbildung 17: Ausschnitt aus dem Gelfiltrations-Chromatogramm von ADH105.

Das Aktivitätsmaximum der ADH105 wurde nach einer Retentionszeit von 74 min gemessen. Dies entspricht einem mittleren Molekulargewicht von 115 kDa.

Durch Gelfiltrations-Chromatographie konnte gezeigt werden, dass die katalytisch aktive Konformation der ADH105 homo-tetramerisch ist.

3.2.4 Sequenz- und Strukturanalyse von ADH105 und ADH-Lb

Wie erwähnt besteht das Ziel dieses Teil der vorliegenden Arbeit in der Konstruktion einer synthetischen Oxidoreduktase, die die gewünschten, biokatalytisch interessanten Eigenschaften zweier parentaler ADHs, ADH105 und ADH-Lb, in sich vereint (siehe Tabelle 11). Auf den ersten Blick mag die Auswahl dieser beiden ADHs ungewöhnlich wirken, denn die Homologie auf Aminosäure-Ebene beträgt lediglich 30 %. Ebenso gibt es keine größeren Abschnitte, die Homologien aufweisen (siehe Abbildung 18).

```

ADH105      -MAMTTQRIALVTGAMGGIGTAICQELAKEGYRVVANCIPGFPOKKEWLAAQKAQGDFV 59
ADH-Lb      MSNRLDGKVAIITGGTLGIGLAIATKVFVEEGAKVMITGRHSDVGEKAAKSVGTPDQIQFF 60
              ::*::**  *** **  :::** * : . . . : . . : :**

ADH105      AAEADVADYDQCKTMVAKIEAEVGPIDILVNNAGITRDKFFHKMEKAQWDAVLRVNLDSM 119
ADH-Lb      QHDS--SDEDGWTKLFDATEKAFGPVSTLVNNAGIAVNKSVEETTTAEWRKLLAVNLGDV 118
              : : * * . . . * .** . ***** : * . . : .** : * ****.

ADH105      FNVTRDIAPKMAERGWR-IINISSVNGVKQAGQTNYSAAKAGILGFTKALALELAAKG 178
ADH-Lb      FFGTRLGIQRMKNKGLGASINMSSIEGFVGDPSLGAYNASKGAVRIMSKSAALDCALKD 178
              * ** : * : * * ** : ** : * . . . * . * . . : : * : * * .

ADH105      --VTVNAIAPGYVATDMVMAIR-EDIRQAIIDTVPMKRLAKPEEIAACVAFLASEKAAYI 235
ADH-Lb      YDVRVNTVHPGYIKTPLVDDLPGAEEAMSQRKTTPMGHIGEPNDIAYICVYLASNESKFA 238
              * ** : : ** : * : * : : : . . ** : : : * : : * . : : ** : : :

ADH105      TGATLNVNGGLHMY 249
ADH-Lb      TGSEFVVDGGYTAQ 252
              ** : : * : **
    
```

Abbildung 18: Alignment von ADH105 und ADH-Lb.

Die Sequenzhomologie der beiden Proteine liegt bei 30 %. Das Glycin-reiche Motiv der Cofaktorbindestelle ist N-terminal durch (□) gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit Hilfe des ClustalW2 Sequence Alignment Tools erstellt (2.7). * = identische Aminosäuren, : = Aminosäuren gleicher Ladung; . = Aminosäuren gleicher

Die Auswahl dieser beiden ADHs als Basis für die chimäre ADH hat mehrere Gründe. So gehören beide ADHs zur Familie der *short-chain* Dehydrogenasen, weisen in etwa gleiche Größe auf und reduzieren prochirale Ketone (*R*)-selektiv zu den korrespondierenden Alkoholen. Der Hauptgrund für die Auswahl dieser beiden ADHs zur Erstellung einer synthetischen Chimäre liegt trotz der relativ geringen Homologie auf Proteinebene in der außergewöhnlichen Ähnlichkeit beider Sekundärstrukturen begründet (Abbildung 19).

Konkretes Ziel ist es, die Coenzym-Präferenz der ADH105 (NAD-abhängig) mit dem Substratspektrum der ADH-Lb (aromatische Substrate, 2-Propanol) zu kombinieren. Wie man in der Sekundärstruktur-Vorhersage erkennen kann, erstreckt sich der Bereich der Coenzym-Bindung N-terminal bis in die zweite α -Helix hinein. Das katalytisch aktive Zentrum der ADH-Lb befindet sich hingegen mittig im Protein im Bereich der sechsten α -Helix.

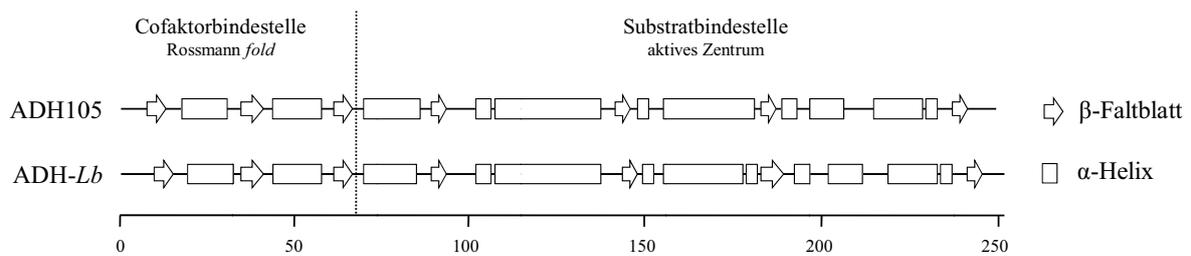


Abbildung 19: Vergleich der Sekundärstrukturen von ADH105 und ADH-Lb.

Trotz relativ geringer Homologie auf Aminosäure-Ebene (~ 30 %) sind die Sekundärstrukturmerkmale nahezu identisch. Vorhersage erstellt mit PsiPred (2.7). Der unten im Bild stehende Zahlenstrahl beschreibt die Aminosäureposition innerhalb der Primärstruktur.

Die ADH aus *L. brevis* ist im Gegensatz zur ADH105 ein Mg^{2+} -abhängiges Enzym und koordiniert das katalytisch essentielle Ion über die C-terminale Aminosäure Glutamin, die aus diesem Grunde ebenfalls zum aktiven Zentrum gezählt wird (Schlieben *et al.*, 2005).

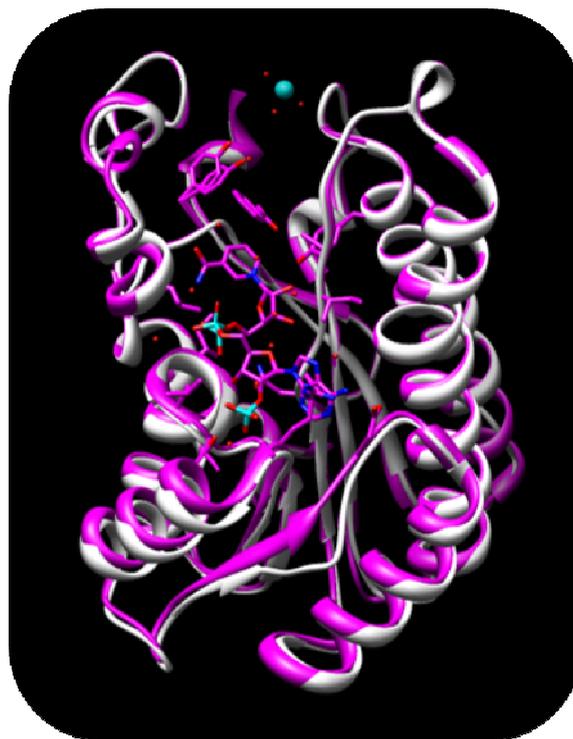


Abbildung 20: Strukturüberlagerung von ADH105 (weiß) und ADH-Lb (pink).

Die Strukturen sind annähernd deckungsgleich. Ebenfalls zu sehen ist das katalytisch essentielle Mg^{2+} -Ion sowie der in die *active-site* inkorporierte Cofaktor NADP und das aromatische Substrat (*R*)-1-Phenylethanol.

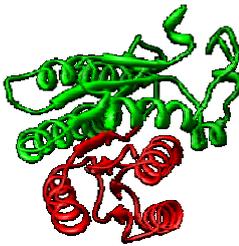
Auch eine Tertiärstruktur-Vorhersage der ADH105 kann mit der bekannten Tertiär-Struktur der ADH-Lb (Schlieben *et al.*, 2005) annähernd zur Deckung gebracht werden. Die Strukturüberlagerung der beiden Proteine ist in Abbildung 20 visualisiert.

Die zu konstruierenden chimären ADHs (ADH-C) sollen entsprechend der gewünschten biokatalytischen Eigenschaften aus dem N-Terminus der ADH105 und dem C-Terminus der ADH-Lb aufgebaut sein.

Es wurden *in silico* basierend auf der in Abbildung 19 dargestellten Sekundärstruktur-Vorhersage zwei ADH-C Modelle entwickelt. Diese Modelle stellen beide ein 253 AS langes Protein dar und unterscheiden sich durch den Anteil von ADH105 und ADH-Lb. Einen Überblick verschafft Tabelle 13.

Tabelle 13: Komposition und Struktur der geplanten synthetischen ADH-Chimären.

In der Struktur grün gezeichnet sind die Anteile der ADH-Lb (Substrat-Bindestelle), in rot dargestellt ist der Anteil ADH105 (Cofaktor-Bindestelle).

Synthetisches Protein	Anteil ADH105	Anteil ADH-Lb	Tertiär-Struktur
ADH-C1	54 Aminosäuren	199 Aminosäuren	
ADH-C2	99 Aminosäuren	154 Aminosäuren	

Es konnten zwei biokatalytisch relevante ADHs (ADH105 und ADH-Lb) ausgewählt werden, die zwar nur geringe Homologien auf Aminosäure-Ebene aufweisen, in ihrer Sekundärstruktur und Tertiärstruktur laut Vorhersage aber nahezu identisch sind. Anhand dieser Vorhersagen und von *in silico* Modelling wurde die Grundlage für zwei chimäre ADHs (ADH-C1/C2) geschaffen.

3.2.5 Erstellung und Klonierung von zwei chimären *adh*-Genen

Auf Basis der in 3.2.4 dargestellten Strukturinformationen wurden geeignete Oligonukleotide (2.1.3) für eine *overlap-extension* PCR (2.3.10) erstellt. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 21 dargestellt.

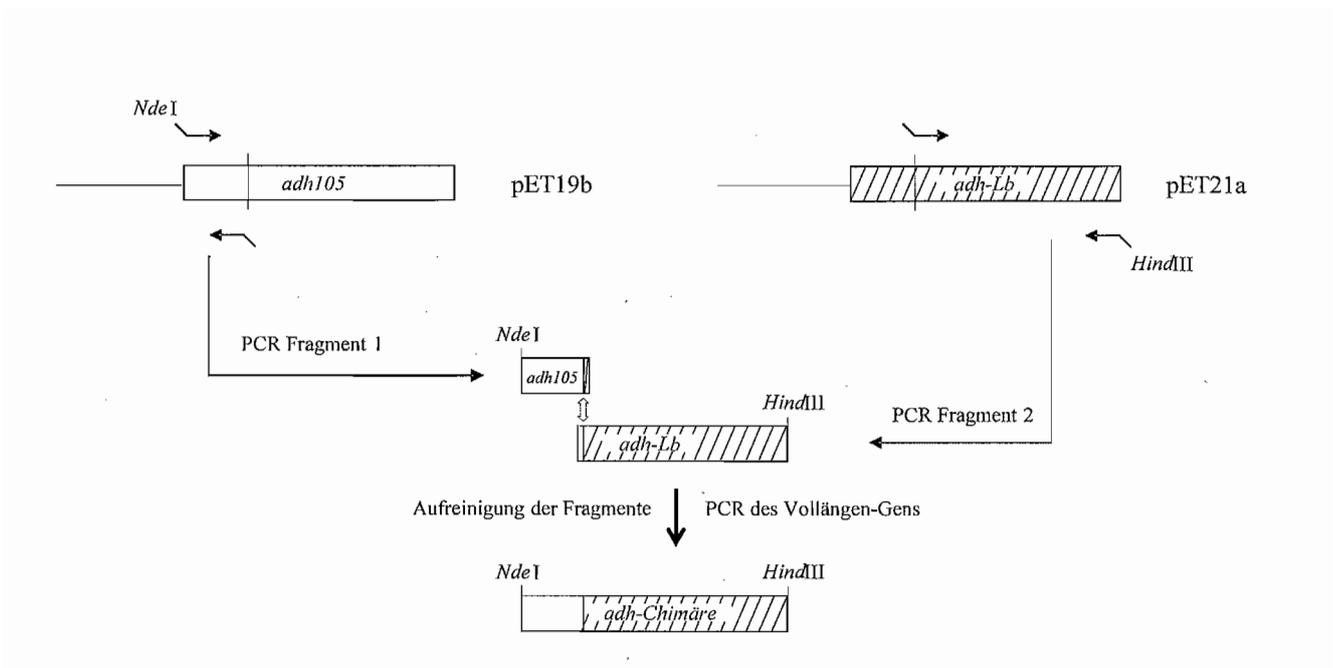


Abbildung 21: Exemplarisches Klonierungsschema des chimären *adh*-Gens.

Zunächst werden die Fragmente 1 (*adh105*-Anteil) und 2 (*adh-Lb*-Anteil) durch Standard-PCR (2.3.7) amplifiziert und aufgereinigt. Nach der Aufreinigung dienen die Fragmente 1 und 2, deren Einzelstränge über einen Bereich von ca. 20 Nukleotiden komplementär zueinander sind, als Matrize in der *overlap-extension* PCR (2.3.10) mit flankierenden Oligonukleotiden zur Amplifizierung des Vollängen-Gens.

Das Ergebnis der einzelnen PCR-Schritte wurde durch Agarosegel-Elektrophorese dokumentiert und ist in Abbildung 22 exemplarisch für die Chimäre *adh-C2* dargestellt.

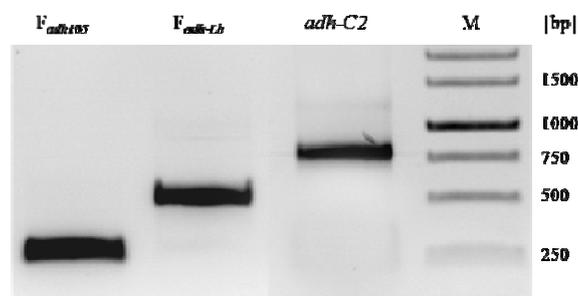


Abbildung 22: Agarosegel-Elektrophorese der einzelnen PCR-Schritte zur Erstellung von *adh-C2*.

Schema siehe Abbildung 21. Erwartete Fragmentgrößen: F *adh105*: 282 bp, F *adh-Lb*: 477 bp, *adh-C2*: 759 bp.
M = Größenstandard

Die so erhaltenen Amplifikate *adh-C1* und *adh-C2* wurden durch Gelelektion aufgereinigt (2.3.1) und mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* hydrolysiert. Im Anschluss an die Ligation (2.3.3) mit einem gleichbehandelten Expressionsvektor pET-21a (+) (2.1.2) wurde der Stamm *E. coli* DH5 α (2.1.1) mit dem Ligationsansatz transformiert (2.3.5) und auf Selektivagar ausplattiert (2.2.1). Mittels Kolonie-PCR (2.3.9) und Restriktionsanalysen (2.3.3) wurde überprüft, ob die angewachsenen Transformanten das gewünschte Insert enthielten. Die mutationsfreie Amplifizierung und die Plasmid-Integration des Inserts *in frame* unter Kontrolle von PT7_{lac} wurden durch DNA-Sequenzierung (2.3.6) verifiziert. Der Expressionsvektor, auf dem das Gen *adh-C1* integriert ist, wurde pAS-27 und jener, auf dem das Gen *adh-C2* integriert ist, pAS-29 genannt.

Die Gene *adh-C1* und *adh-C2* konnten erfolgreich durch *overlap-extension* PCR generiert und mutationsfrei unter Kontrolle von PT7_{lac} in pET-21a (+) kloniert werden.

3.2.6 Heterologe Expression, Expressionsoptimierung und Stabilitätsbetrachtungen der chimären ADHs

Zur heterologen, PT7_{lac}-basierten Expression der chimären *adh*-Gene wurden unterschiedliche Stämme mit den Vektoren pAS-27 bzw. pAS-29 transformiert. Dazu zählten

E. coli BL21 (DE3)
E. coli BL21 Star (DE3)
E. coli C43 (DE3)
E. coli Rosetta (DE3)
E. coli JM 109 (DE3)
E. coli XL1 blue (DE3)
E. coli Origami (DE3)
E. coli BLR (DE3)
E. coli Tuner (DE3) und
E. coli TOP10 (konstitutive Expression).

In den jeweiligen Stämmen wurde die Genexpression (2.2.3) bei Erreichen einer O.D._{580nm} von 0,5 durch Zusatz von 0,4 mM IPTG induziert und nach 3 bzw. 18 Stunden durch Zellernte (2.2.4) abgestoppt. Die so gewonnenen Rohextrakte wurden durch Aktivitätstests (2.4.2) und SDS-PAGE (2.4.4) analysiert.

Lediglich die Expression für 3 Stunden (30 °C) in *E. coli* BL21 (DE3) führte zur Produktion aktiven Proteins, in allen anderen Fällen konnte keine Aktivität und auch keine dem Molekulargewicht von ADH-C1/2 entsprechende Bande im SDS-Gel nachgewiesen werden. Die vorgenannten Bedingungen wurden somit als Standard definiert.

Die SDS-PAGE Analyse der Expression in *E. coli* BL21 (DE3) zeigte, dass der Großteil des translatierten Proteins in *inclusion bodies* akkumuliert (Abbildung 23). Die chimäre ADH ließ sich ausschließlich über die Aktivität detektieren, eine aussagekräftige Proteinbande im SDS-Gel war nicht zu finden. Diesem Vorgang konnte durch Herabsetzen der Temperatur auf 25 °C und einer Absenkung der Induktorkonzentration auf 0,1 mM IPTG nicht entgegengewirkt werden.

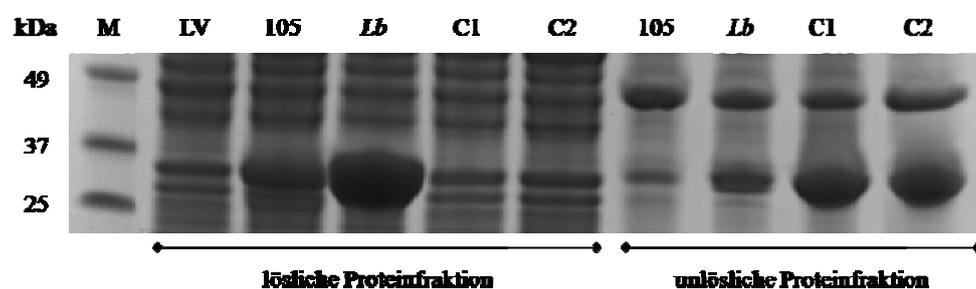


Abbildung 23: SDS-PAGE Analyse der Expression chimärer *adh*-Gene in *E. coli* BL21 (DE3).

Die Expressionsdauer betrug 3 Stunden bei 30 °C. Deutlich zu erkennen ist, dass die gebildeten chimären Proteine C1/C2 (ca. 28 kDa) in der unlöslichen Proteinfraction in Form von *inclusion bodies* vorliegen. M = Massenstandard, LV = Leervektorkontrolle, 105 = ADH105, *Lb* = ADH-*Lb*, C1 = ADH-C1, C2 = ADH-C2

Um an dieser Stelle ein transkriptionelles Problem, welches zu geringen Proteinausbeuten führen kann, auszuschließen, wurde mit den Expressionskulturen eine quantitative RT-*real time*-PCR zur Bestimmung der jeweiligen Transkriptmengen der spezifischen Zielgene durchgeführt (2.3.11 und 2.3.12). Die berechneten Transkriptmengen wurden in Bezug gesetzt zur mRNA-Menge von *rpoD*, einem *E. coli*-Gen, das für eine Untereinheit der RNA-Polymerase codiert und daher als *housekeeping*-Gen zur Verfügung steht. Das ausgewertete Ergebnis ($\Delta\Delta C_t$) der RT-*real time*-PCR ist in Abbildung 24 dargestellt. Alle 4 Gene werden in *E. coli* BL21 (DE3) in gleicher Größenordnung exprimiert. Somit konnte festgestellt werden, dass kein transkriptionelles Problem bei der Expression der chimären *adh*-Gene vorliegt. Verminderte Proteinausbeuten stehen in keinem ursächlichen Zusammenhang mit verminderten Transkriptmengen.

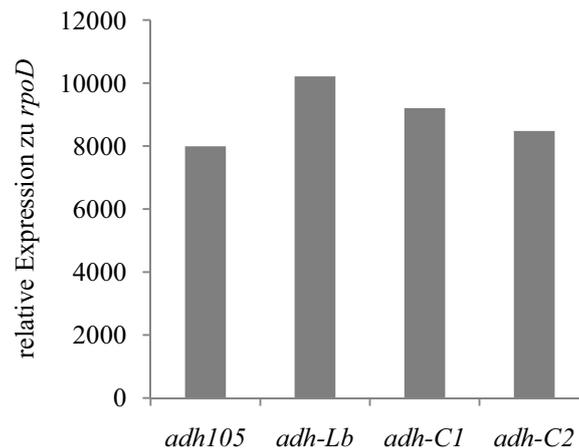


Abbildung 24: Auswertung der RT-*real time*-PCR.

Alle vier untersuchten Gene werden in *E. coli* BL21 (DE3) größenordnungsmäßig gleich stark exprimiert. Die Werte wurden in Bezug zur konstitutiven Expression von *rpoD* gesetzt.

Da der Anteil an löslichem Protein respektive die Aktivität durch die Standard-Maßnahmen Temperaturabsenkung und Herabsetzen der Induktorkonzentration nicht gesteigert werden konnte, wurden zwei weitere Ansätze mit gleichem Ziel verfolgt. Zum einen sollten die chimären *adh*-Gene mit Chaperonen coexprimiert werden (2.2.3), zum anderen sollte eine Expression in dem kalteadaptierten Stamm *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL (2.1.1) bei extrem abgesenkter Temperatur (11 °C) zur Erhöhung der Menge an löslicher ADH-C führen.

Bei der Coexpression mit molekularen Chaperonen soll die Löslichkeit des Proteins durch die Anwesenheit cytoplasmatischer Faltungshelfer erhöht werden. Molekularbiologisch wird dies durch die gleichzeitige Aufnahme von 2 Plasmiden in die Expressionszelle bewerkstelligt. Dabei handelt es sich zum einen um ein Expressionsplasmid mit dem Gen von Interesse, in diesem Fall pAS-27 bzw. pAS-29, zum anderen um jeweils ein „Chaperon-kodierendes Plasmid“ aus dem „TaKaRa Chaperone Plasmid Set“ (2.2.3). Bei den plasmidcodierten Chaperon-Genen sind Kombinationen der bekanntesten Faltungsmediatoren, namentlich *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groES*, *groEL* und *tig* erhältlich. Insgesamt werden in dem „TaKaRa Chaperone Plasmid Set“ fünf Plasmidvarianten, die die einzelnen Chaperone miteinander kombinieren, zur Verfügung gestellt:

Plasmid 1 *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groES*, *groEL*

Plasmid 2 *groES*, *groEL*

Plasmid 3 *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*

Plasmid 4 *groES*, *groEL*, *tig*

Plasmid 5 *tig*

Alle Coexpressionen wurden in *E. coli* BL21 (DE3) nach Herstellerprotokoll durchgeführt (2.2.3). Nach Gewinnung der Rohextrakte (2.2.4) wurden die Proben einem Aktivitätstest (2.4.2) unterzogen und durch SDS-PAGE (2.4.4) analysiert. In keiner der Proben konnte ADH-Aktivität nachgewiesen werden. Eine Erklärung dafür lieferte die SDS-PAGE Analyse (Abbildung 25).

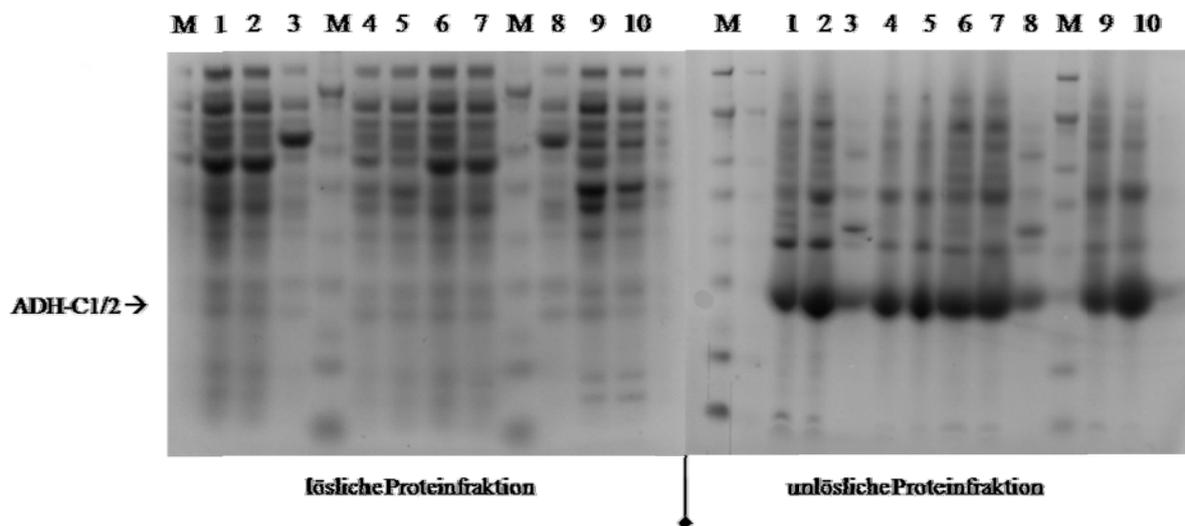


Abbildung 25: SDS-PAGE Analyse der *adh-C1/2*-Chaperon-Coexpression.

Die gebildete chimäre ADH konnte in allen Fällen ausschließlich in der unlöslichen Proteinfraction in Form von *inclusion bodies* detektiert werden. M = Molekulargewichtsstandard, 1-5 = Kombination *adh-C1* mit den 5 TaKaRa-Chaperon-Plasmiden, 6-10 = Kombination von *adh-C2* mit den 5 TaKaRa-Chaperon-Plasmiden.

Daraufhin wurde der zweite Ansatz zur Erhöhung der Menge an löslichem Protein, die Expression bei 11 °C in dem kälteadaptierten Stamm *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL (2.1.1), durchgeführt. Dieser Stamm trägt plasmidcodiert zum einen die Gene für die Chaperone Cpn10 und Cpn60 aus *Oleispira antarctica*, die *E. coli* ermöglichen, bei niedrigen Temperaturen (11 °C) mit unverminderter Teilungsrate zu wachsen, zum anderen die Gene für 3 zusätzliche tRNAs (*argU*, *ileY*, *leuW*) zur Vermeidung von Translationsabbrüchen durch seltene Codons. Die Transformation des Stammes sowie die Prozedur zur Genexpression wurde streng nach Herstellerangaben entsprechend des „ArcticExpress™ RIL Competent Cells Instruction Manuals“ durchgeführt. Nach Genexpression und Gewinnung der Rohextrakte (2.2.4) konnte für keines der beiden chimären Proteine Dehydrogenase-Aktivität gemessen werden. Die Proben wurden zusätzlich durch SDS-PAGE (2.4.4) analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 dargestellt.

Während ADH-C1 beinahe ausschließlich in der unlöslichen Proteinfraction in Form von *inclusion bodies* zu finden ist, liegt ein kleiner Teil ADH-C2 in löslicher Form vor, der allerdings katalytisch inaktiv ist.

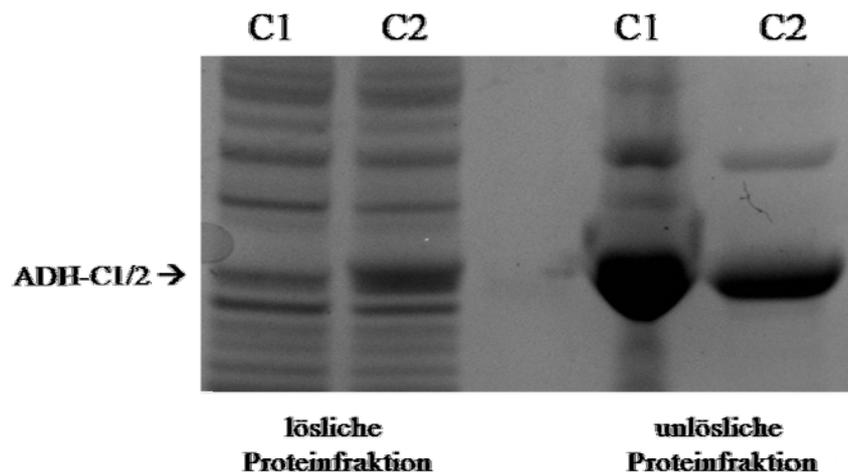


Abbildung 26: SDS-PAGE der Expression von *adh-C1/2* in *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL.

In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass die ADH-Chimären vornehmlich in der unlöslichen Proteinfraction in Form von *inclusion bodies* detektiert werden. Ein kleiner Teil von ADH-C2 befindet sich in der löslichen Proteinfraction, ist aber katalytisch inaktiv. Aktivitätstest unmittelbar nach Zellernte und – aufschluß mit 50 µl Rohextrakt, 30 mM Acetophenon, 0,2 mM NADH, 30 °C. C1 = ADH-C1, C2 = ADH-C2

Da durch die Expression von *adh-C1/2* im ArcticExpress-System die Menge an löslicher und aktiver ADH im Vergleich zum Standard-System *E. coli* BL21 (DE3) nicht gesteigert werden konnte, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

An diesem Punkt angelangt konnte festgestellt werden, dass in Bezug auf die chimären *adh*-Gene kein transkriptionelles Problem vorliegt. Die Transkriptmengen befinden sich auf dem erwarteten Niveau (Abbildung 24). Ein Problem mit der *codon usage* kann ebenfalls nicht ursächlich für die *inclusion bodies*-Bildung sein, da die parentalen Proteine ADH105 und ADH-Lb in löslicher Form gebildet werden (Abbildung 23).

Um die Stabilität der chimären Proteine während der Expression zu untersuchen, wurden einer Expressionskultur im Autoinduktionsmedium (2.2.3) in definierten Zeitabständen Proben entnommen, die O.D._{580nm} bestimmt und nach Zellaufschluss (2.2.4) die Dehydrogenase-Aktivität gemessen (2.4.2). Die maximal gemessene Aktivität jeder beteiligten ADH wurde auf die gemessene O.D._{580nm} normiert und auf 100% gesetzt sowie die Aktivitätsentwicklung als Maß für die Proteinestabilität über der Zeit aufgetragen (Abbildung 27). In Abbildung 27 ist deutlich zu erkennen, dass die Expression aller 4 *adh*-Gene in etwa zeitgleich induziert wurde und die Proteine dementsprechend parallel ihre Aktivität entwickeln. Ca. 4-6 Stunden nach Inokulation der Expressionskultur wird von allen ADHs ein Aktivitätsmaximum, normiert auf die O.D._{580nm}, erreicht. Während ADH105 und ADH-Lb weitestgehend stabil bleiben, nimmt die Aktivität der chimären ADHs bei länger andauernder Expression dramatisch ab. Nach 24-stündiger Kultivierung der Expressionskultur betrug die gemessene Enzymaktivität lediglich noch 7,5 % (ADH-C1) bzw. 21 % (ADH-C2) der maximal gemessenen Aktivität.

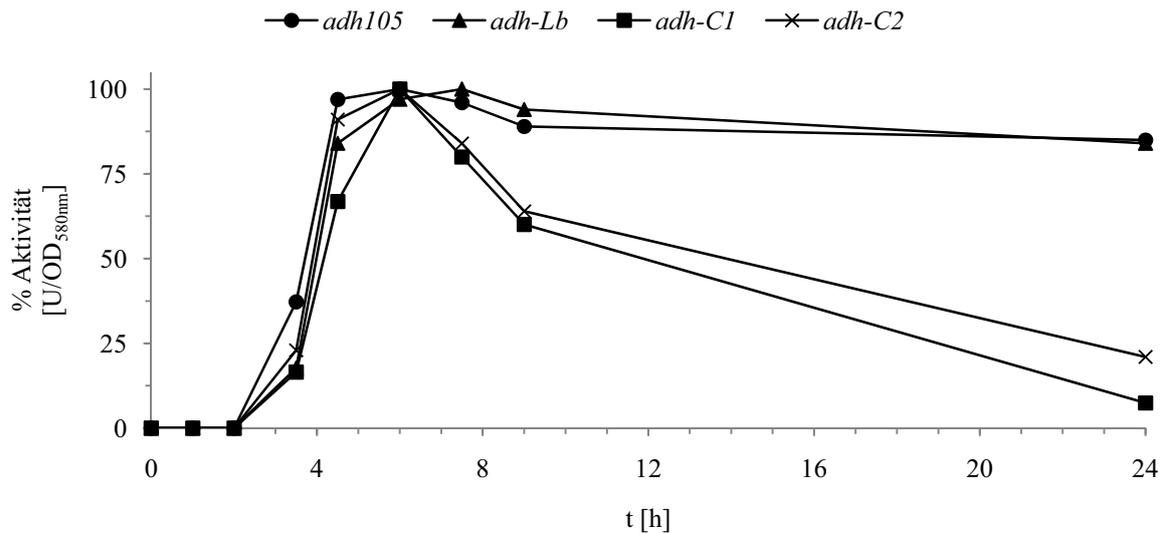


Abbildung 27: Grafische Darstellung des Aktivitätsverlaufs nach Expression von 4 unterschiedlichen *adh*-Genen in *E. coli* BL21 (DE3) im Autoinduktionsmedium.

Die Aktivitäten wurden auf die O.D._{580nm} normiert. Die höchste gemessene Aktivität wurde für jedes Enzym auf 100 % gesetzt. Die Aktivität wurde mit 10 mM Acetophenon und 0,2 mM NADH gemessen und betrug ADH105: 0,8 U/O.D._{580nm}, ADH-Lb: 4,1 U/O.D._{580nm}, ADH-C1: 0,9 U/O.D._{580nm}, ADH-C2: 1,1 U/O.D._{580nm}.

Hitzedenaturierungsversuche ergaben, dass die beiden chimären ADHs C1 und C2 im Gegensatz zur ADH105 nicht thermostabil sind. Nach 7-minütiger Inkubation des enzymhaltigen Rohextraktes nach Expression in *E. coli* BL21 (DE3) (2.2.4) bei 70 °C konnte weder lösliches Protein ADH-C1/2 in der SDS-PAGE (2.4.4), noch Dehydrogenase-Aktivität (2.4.2) gemessen werden. Densitometrische Peakflächenintegration nach SDS-PAGE Analysen haben in diesem Zusammenhang ergeben, dass die ADH105 als thermostabiles Protein nach besagter Inkubationszeit zu 100 % in Lösung und aktiv bleibt, die ADH-Lb zu 11 % (ohne Abbildung). Diese Ergebnisse führen zu der Feststellung, dass die größten und aktivsten Mengen an chimärer ADH für weitere biochemische Charakterisierungen durch 2-stündige Expression bei 37 °C nach IPTG-Induktion (0,4 mM) von entsprechend transformierten *E. coli* BL21 (DE3) erzielt werden.

Die Expression von *adh-C1* und *adh-C2* in *E. coli* BL21 (DE3) resultiert in relativ geringen Mengen löslichen und aktiven Proteins. Weder durch Expression in einem kälteadaptierten *E. coli*-Stamm bei 11 °C noch durch Coexpression mit Chaperonen, die als Faltungsmediatoren zur Verfügung standen, konnte die Menge an katalytisch aktivem Protein erhöht werden. Durch RT-*real time*-PCR und SDS-PAGE Analysen mit densitometrischer Peakflächenintegration konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsraten denen der parentalen *adh*-Gene entsprechen, die gebildeten chimären Proteine allerdings relativ instabil sind. Beide chimären ADHs sind nicht thermostabil.

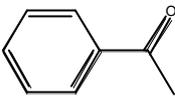
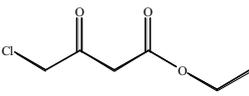
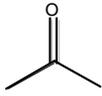
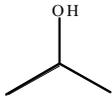
3.2.7 Biochemische Charakteristika der chimären ADHs

Nachdem in umfangreichen Versuchen die optimalen Expressionsbedingungen für die chimären *adh*-Gene evaluiert wurden (3.2.6), konnte nun ein vergleichendes Aktivitätsprofil mit den jeweiligen Standardsubstraten der beteiligten Enzyme zuzüglich Aceton und 2-Propanol in Bezug auf die parentalen ADHs aufgenommen werden. Eine Übersicht bietet

Tabelle 14. Es ist für beide chimären ADHs gelungen, im gewünschten Sinne die vorteilhaften Eigenschaften der parentalen ADHs in ADH-C1/2 zu vereinigen. Speziell ADH-C2 zeigt eine um den Faktor 4 gesteigerte Aktivität mit dem aromatischen Substrat Acetophenon. Viel wichtiger für biokatalytische Anwendungen ist allerdings, dass beide chimären ADHs im Gegensatz zur ADH105 2-Propanol als Substrat akzeptieren und somit eine kosteneffiziente substratgekoppelte Cofaktorregenerierung (2.6.1) ermöglichen.

Tabelle 14: Übersicht über die Aktivitäten der chimären ADHs und der parentalen Proteine.

Die Proteinkonzentrationen, auf die sich die spezifischen Aktivitäten beziehen, wurden durch densitometrische Peakflächenintegration berechnet. In den Aktivitätstest (2.4.2) eingesetzt wurden 10 µl hitzedenaturiertes GZE, welches wie in 2.2.4 beschrieben gewonnen wurde. Als Cofaktor wurde NADH (NAD⁺ bei 2-Propanol) in einer Konzentration von 0,2 mM eingesetzt. In Klammern angegeben ist die jeweilige Aktivität bezogen auf diejenige der ADH105 in Prozent.

	ADH105	ADH-Lb	ADH-C1	ADH-C2
 30 mM Acetophenon	4,4 U/mg 100 %	11,9 U/mg 270 %	6,2 U/mg 140 %	16,2 U/mg 370 %
 30 mM 4-Cl-EAA	90 U/mg 100 %	33,2 U/mg 37 %	6,8 U/mg 8 %	11,3 U/mg 13 %
 30 mM Aceton	2,5 U/mg 100 %	18,6 U/mg 760 %	12,2 U/mg 500 %	22 U/mg 900 %
 20 % (v/v) 2-Propanol	0,2 U/mg 100 %	2,3 U/mg 1150 %	1,1 U/mg 550 %	2,6 U/mg 1300 %

Nachfolgend wurden die kinetischen Konstanten der ADH105 und der ADH-C1/2 für den Cofaktor NADH aufgenommen.

Tabelle 15: Kinetische Konstanten für den Cofaktor NADH von ADH105 und ADH-C1/2.

Die Konstanten der ADH-Lb (NADP-abhängig) wurden nicht erfasst. In den Aktivitätstest (2.4.2) eingesetzt wurden 10 µl hitzedenaturiertes GZE (ADH105) respektive GZE (ADH-C), welches wie in 2.2.4 beschrieben gewonnen wurde. Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford und densitometrische Peakflächenintegration berechnet. Als Substrat diente 30 mM Acetophenon.

Kinetische Konstanten für NADH	ADH105	ADH-C1	ADH-C2
K_m [mM]	0,026	0,054	0,040
V_{max} [U/mg]	4,76	7,58	15,99
k_{cat} [min ⁻¹]	508	823	1719
k_{cat}/K_m [mM ⁻¹ min ⁻¹]	$2,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$

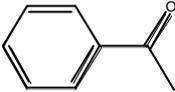
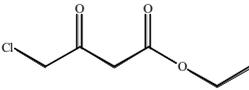
Beide Chimären akzeptieren ebenfalls NADP(H) als Cofaktor, die Aktivität beträgt dabei ca. 10 % bezogen auf die Aktivität mit NADH.

Aus den Werten der Tabelle 15 lassen sich mehrere Rückschlüsse ziehen. Die ähnlich niedrigen K_m -Werte der chimären ADHs im Vergleich zur ADH105 lassen auf eine hohe Bindungsaffinität zum Cofaktor schließen. Bei ADH-C1/2 handelt es sich folglich ebenfalls um NAD-abhängige Enzyme. Die Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} und schlussendlich die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m zeigen, dass die chimären ADHs, im speziellen ADH-C2, das angebotene Substrat (Acetophenon) mit dem Cofaktor NADH schneller und effizienter umsetzen als die ADH105.

Im Folgenden wurden die kinetischen Konstanten der beteiligten ADHs für die einzelnen Substrate bei konstanter Cofaktor-Konzentration aufgenommen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Kinetische Konstanten von ADH105, ADH-Lb und ADH-C1/2 für verschiedene Substrate.

In den Aktivitätstest (2.4.2) eingesetzt wurden 10 µl hitzedenaturiertes GZE (ADH105) respektive GZE (ADH-Lb, ADH-C), welches wie in 2.2.4 beschrieben gewonnen wurde. Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford und densitometrische Peakflächenintegration berechnet. Die Cofaktorkonzentration betrug konstant 0,2 mM NADH. Die Werte sind in folgenden Einheiten angegeben: K_m [mM], V_{max} [U/mg], k_{cat} [min^{-1}], k_{cat}/K_m [$\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$].

Substrat		ADH105	ADH-Lb	ADH-C1	ADH-C2
 Acetophenon	K_m	216	49	31	26
	V_{max}	5,1	17,0	7,8	19,6
	k_{cat}	542	1815	851	2102
	k_{cat}/K_m	2,5	37	27	81
 4-Cl-EAA	K_m	41	141	47	74
	V_{max}	101	36,0	5,3	15,7
	k_{cat}	10798	3859	571	1692
	k_{cat}/K_m	263	27	12	23
 Aceton	K_m	106	281	121	143
	V_{max}	2,3	23,5	13,3	25,4
	k_{cat}	245	2513	1439	2730
	k_{cat}/K_m	2,3	9	12	19

Aus Tabelle 16 lässt sich in Verbindung mit den Informationen aus Tabelle 15, insbesondere durch die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m , ablesen, dass die chimären ADHs C1 und C2 die Eigenschaften der parentalen ADHs miteinander kombinieren. Es sind NAD-abhängige Enzyme (Cofaktorbindetasche ADH105), die aromatische Substrate im Vergleich zur ADH105 mit dramatisch gesteigerter Effektivität umsetzen und Aceton respektive 2-Propanol zur substratgekoppelten Cofaktor-Regenerierung akzeptieren (Substratbindedomäne ADH-Lb).

Um zu überprüfen, ob die synthetisierten chimären ADHs in Biotransformationsansätzen angewendet werden können, sollten 30 mM Acetophenon in einer kontinuierlichen Umsetzungsreaktion reduziert werden. In die Reaktion eingesetzt wurde 1 mM NADH, welches über eine substratgekoppelte Rückreaktion mit 20 % (v/v) 2-Propanol regeneriert werden sollte (2.6.1). In definierten Abständen wurden dem Ansatz Proben entnommen und auf die Produktbildung hin gaschromatografisch untersucht (2.4.3). Die gebildete relative Produktmenge wurde in Abbildung 28 als Funktion der Zeit aufgetragen.

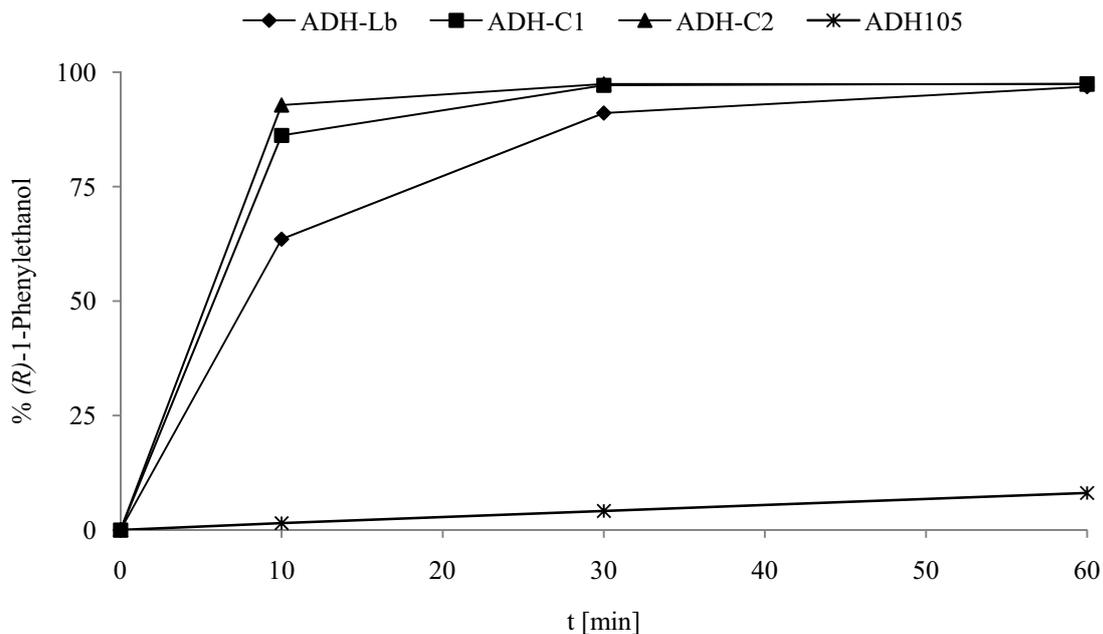


Abbildung 28: Grafische Darstellung der (*R*)-1-Phenylethanol-Bildung durch Acetophenon-Reduktion, katalysiert durch ADH105, ADH-*Lb* sowie ADH-C1/2.

Eingesetzt in die Reaktion (37 °C) wurden 30 mM Acetophenon, 20 % (v/v) 2-Propanol, 1 mM NADH und 1 U ADH, gemessen mit 30 mM Acetophenon und 0,2 mM NADH (30 °C). In den Aktivitätstest (2.4.2) eingesetzt wurden 10 µl hitzedenaturiertes GZE (ADH105) respektive GZE (ADH-*Lb*, ADH-C), welches wie in 2.2.4 beschrieben gewonnen wurde. Die relative Menge an (*R*)-1-Phenylethanol wurde durch GC bestimmt. In allen 4 Fällen war *ee* > 99,9 %.

Wie in Abbildung 28 deutlich zu erkennen ist, setzen sowohl die ADH-*Lb* als auch die chimären ADHs C1 und C2 das Substrat Acetophenon beinahe vollständig zu (*R*)-1-Phenylethanol um (Umsatzrate ca. 98 %), der *enantiomeric excess* liegt dabei > 99,9 %. Die ADH105 setzt unter den gleichen Bedingungen das angebotene Substrat lediglich zu knapp 10 % um. Ursächlich hierfür ist sicherlich die unzureichende Akzeptanz von Acetophenon und insbesondere 2-Propanol (Tabelle 14).

Die Eigenschaften der chimären ADHs C1 und C2 stellen eine Kombination aus den biochemischen Charakteristika der parentalen Proteine dar. Es ist mit molekulargenetischen Methoden gelungen, zwei NAD-abhängige und (*R*)-selektive Enzyme zu synthetisieren, die aromatische Substrate akzeptieren. In kontinuierlichen Umsetzungen kann der eingesetzte Cofaktor mit 2-Propanol regeneriert werden. Das Substrat wird beinahe vollständig umgesetzt, die *ee*-Werte liegen bei > 99,9 %.

3.3 Änderung der Cofaktor-Spezifität der 2°ADH aus *Thermoanaerobacter* sp. von NADP(H) zu NAD(H) mit Methoden der gerichteten Evolution

Die Rolle des Coenzym bei der ADH-katalysierten Umsetzung von Ketonen zu chiralen Alkoholen wurde in den vorangegangenen Abschnitten bereits ausführlich diskutiert. Forschungsobjekt dieses Teils der vorliegenden Arbeit war die strikt NADP-abhängige 2°ADH (ADH-T) aus dem thermophilen Bakterium *Thermoanaerobacter* sp. (vormals *Thermoanaerobium* sp.). Ziel der Arbeiten war zunächst, das Gen *adh-T* ausgehend von genomischer DNA zu amplifizieren, zu klonieren und heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Nach erfolgter Expressionsoptimierung sollte die ADH-T aufgereinigt und auf ihre biochemischen Charakteristika hin untersucht werden. Bezugnehmend auf die gut aufgelöste 3D-Struktur des hoch homologen Proteins ADH-Tb aus *T. brockii* wurden die *hot spots* identifiziert, die für die deutliche NADP-Präferenz verantwortlich sind. Durch iterative Sättigungsmutagenese an diesen Positionen sollte die Umkehr der Coenzym-Spezifität zu Gunsten von NAD erreicht werden.

3.3.1 Klonierung, heterologe Expression, Reinigung und biochemische Charakteristika der 2°ADH aus *Thermoanaerobacter* sp. (ADH-T)

Als Matrize für die Amplifizierung des Gens *adh-T* mit spezifischen Primern (2.1.3) diente genomische DNA von *Thermoanaerobacter* sp., die mit freundlicher Genehmigung von der Fa. Jülich Chiral Solutions – a codexis company (Jülich) zur Verfügung gestellt wurde. Bei dem Genprodukt von *adh-T* handelt es sich um ein Protein mit einer Masse von 37,3 kDa, welches in katalytisch aktiver Form als Homo-Tetramer vorliegt. Die ADH-T ist strikt NADP-abhängig, gehört mit 352 Aminosäuren zu der Klasse der *medium-chain* Dehydrogenasen (Jörnvall *et al.*, 1999) und weist mit 93% Homologie auf Aminosäure-Ebene einen extrem hohen Verwandtschaftsgrad zu den gut charakterisierten ADHs aus *T. brockii* und *T. ethanolicus* auf (Peretz & Burstein, 1989; Bogin *et al.*, 1997; Burdette *et al.*, 1997; Shim *et al.*, 2003).

Das Gen konnte durch Standard-PCR (2.3.7) mit den entsprechenden Oligonukleotiden amplifiziert werden. An diese Oligonukleotide wurden die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *XhoI* angehängt. Das Ergebnis der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese (2.3.2) kontrolliert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde durch die Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *XhoI* hydrolysiert und in den gleich behandelten Expressionsvektor pET-19b unter Kontrolle des PT7_{lac} kloniert (2.1.2; 2.3.3). Die erfolgreiche

Klonierung und fehlerfreie Amplifikation des Gens wurde durch DNA-Sequenzierung (2.3.6) bestätigt. Das so erstellte Expressionsplasmid wurde pAS-9 genannt.

Zunächst wurden die optimalen Expressionsbedingungen evaluiert. Das Gen *adh-T* wurde nicht nur in dem „Standard“-Stamm *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert, sondern auch in dem Stamm *E. coli* Rosetta (DE3). Dieser trägt plasmidcodiert die Gene für 6 zusätzliche tRNAs (pRARE, AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA), die in *E. coli* selten verwendet werden. Dadurch sollten Limitationen durch unterschiedliche *codon usage* von *E. coli* und *Thermoanaerobacter* sp. ausgeschlossen werden.

In der Tat werden um ca. 20 % gesteigerte volumetrische Aktivitäten (1:5 Zellaufschluss mit Tris-HCl, pH 7,0) der ADH-T nach Genexpression in *E. coli* Rosetta (DE3) (ca. 100 U/ml) im Vergleich zu BL21 (DE3) (ca. 80 U/ml) gemessen (2.2.1, 2.2.3, 2.2.4). Als Standard-Substrat in den Aktivitätstest wurde 10 mM Aceton eingesetzt, als Coenzym diente 0,2 mM NADPH. Als weitere Parameter für eine Expression mit höchstmöglicher Enzymausbeute wurden die Induktion mit 0,6 mM IPTG und die Genexpression nach Induktion für 3 Stunden bei 37°C evaluiert.

Da es sich bei der ADH-T um ein Enzym aus einem thermophilen Organismus handelt, erreicht man durch Hitzedenaturierung (7 Minuten, 70 °C) des Rohextraktes (2.2.4) bereits einen guten Reinigungseffekt. Eine Proteinmengenbestimmung (2.4.1) vor und nach Hitzedenaturierung mit anschließender Abtrennung der unlöslichen Proteinfraction ergab, dass ca. 80 % der ausgefallenen hitzelabilen *E. coli*-Proteine aus dem Ansatz entfernt wurden. Dieser Befund wird visuell durch SDS-PAGE (2.4.4) bestätigt (Abbildung 29, „hGZE“). Durch die Hitzedenaturierung wurde die spezifische Aktivität im Rohextrakt von 40 U/mg auf 135 U/mg gesteigert (Assay 10 mM Aceton, 0,2 mM NADPH).

Im Anschluss an die Hitzebehandlung konnte die ADH-T durch Anionenaustausch-Chromatographie (2.5.1) bis zur elektrophoretischen Homogenität hin aufgereinigt werden (Abbildung 29, „Q“). Dabei wurde eine spezifische Aktivität von 160 U/mg für die ADH-T gemessen (Assay 10 mM Aceton, 0,2 mM NADPH). Mit der so aufgereinigten ADH-T wurden spezifische Aktivitäten für die gängigsten Substrate aufgenommen (2.4.2). Das Ergebnis ist in Tabelle 17 dargestellt.

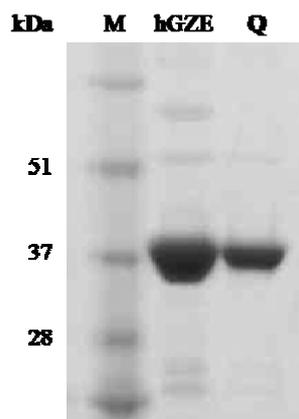


Abbildung 29: SDS-PAGE ADH-T nach Hitzedenaturierung und Anionenaustausch-Chromatographie.

Die Expression von pAS-9 wurde in *E. coli* Rosetta (DE3) durchgeführt. M = Molekulargewicht-Standard, hGZE = hitzedenaturierter Rohextrakt, Q = lösliche Proteinfraction des hGZE nach Q-Sepharose (Anionenaustausch-Chromatographie)

Tabelle 17: Übersicht über die Aktivitäten der ADH-T.

In den Aktivitätstest (2.4.2) eingesetzt wurden 10 µl hitzedenaturiertes GZE, welches wie in 2.2.4 beschrieben gewonnen wurde. Eingesetzt wurden jeweils 10 mM Substrat und 0,2 mM NADPH. Fortsetzung nächste Seite.

Substrat	Strukturformel	spezifische Aktivität [U/mg]
Aceton		87
EAA		19
4-Cl-EAA		40
Acetophenon		25
Diacetyl		124
Pyruvat		1,5

Die ADH-*T* ist ein Zn²⁺-abhängiges Enzym. Pro Untereinheit wird ein strukturelles Zn²⁺ fest in die Struktur integriert, ein weiteres, das katalytische Zn²⁺, ist in der Nähe der Substratbindetasche lokalisiert und koordiniert dort das Substrat in die richtige Position (Bryant *et al.*, 1988; Bogin *et al.*, 1997). Das katalytische Zink ist in aller Regel weniger fest im Enzym gebunden. Durch Experimente mit dem Chelatbildner EDTA, der zweiwertige Kationen und somit auch Zn²⁺ komplexiert, konnte gezeigt werden, dass die ADH-*T* nach 15 minütiger Inkubation mit 5 mM EDTA ihre katalytische Aktivität komplett verliert. Dabei wurde mit einem durch Anionenaustausch-Chromatographie (2.5.1) aufgereinigten Enzympräparat der ADH-*T* gearbeitet. Der Aktivitätsverlust ist auf die Komplexbildung des katalytischen Zink zurückzuführen. Durch Entfernung des EDTA aus dem Ansatz und nachträgliche Zugabe von 1 mM Zn²⁺ konnte die Aktivität auf ca. 80% ihres Ausgangswertes wieder hergestellt werden.

In Hochzell-dichte-Fermentationen wird dem Expressionsmedium, einem definierten Mineralsalzmedium, Zn²⁺ in Form von ZnSO₄ in einer Konzentration von 0,35 mM zugesetzt. Dadurch konnten die Aktivitätsausbeuten pro g Zellfeuchtmasse deutlich gesteigert werden. Ein Zusatz von Zinksalzen bei einer Expression im Schüttelkolbenmaßstab in komplexem LB-Medium brachte keine signifikante Aktivitätssteigerung, da die Zinkkonzentrationen offensichtlich ausreichend sind. Zusätzlich wurde überprüft, inwiefern die Aktivität der ADH-*T* durch den Einsatz alternativer Metallionen gesteigert werden kann. Dazu wurden sowohl LB-Medium als auch M9-Minimalmedium (2.2.1) unterschiedliche Metallionen (Mg²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺) in Form ihrer löslichen Salze in einer Konzentration von 0,35 mM zugesetzt. Nach Expression (2.2.3) von *adh-T* in *E. coli* Rosetta (DE3) wurde nach Zellaufschluss (2.2.4) die spezifische Aktivität mit dem Standard-Substrat Aceton (10 mM) bestimmt (2.4.2). Lediglich durch den Zusatz von Cobalt-Ionen zum LB-Medium konnte die spezifische Aktivität der ADH-*T* im Vergleich zum Zusatz von Zn²⁺-Ionen um ca. den Faktor 2 auf knapp 200 U/mg gesteigert werden (Aktivitätsassay 10 mM Aceton, 0,2 mM NADPH). Dieser Ansatz wurde allerdings nicht weiter verfolgt, da Cobalt sich negativ auf das Zellwachstum der Expressionskultur auswirkt. Zudem ist der Einsatz im großtechnischen Maßstab problematisch und die Entsorgung kostenintensiv, da Cobalt und seine bioverfügbaren Verbindungen (in Form atembare Stäube/Aerosole) nach der MAK¹-Werte-Liste (2004) als krebserzeugend (Kategorie 2) und keimzellmutagen (Kategorie 3A) eingestuft sind. Diese Eigenschaften treffen auf Zinkverbindungen nicht zu.

Die Expression von *adh-T* im Autoinduktionsmedium (2.2.1) bei 30 °C über Nacht liefert ebenfalls gute Enzymsausbeuten mit hohen spezifischen Aktivitäten. Allerdings können diese Expressionen nicht in *E. coli* Rosetta (DE3) durchgeführt werden, da dieser Stamm auf Grund seiner *lacY*-Defizienz Lactose (als Induktor) nicht in die Zellen transportieren kann. Aus diesem Grund wurde bei Arbeiten im Autoinduktionsmedium *E. coli* BL21 (DE3) benutzt.

¹ Maximale Arbeitsplatz-Konzentration

Das Gen *adh-T* (1056 bp) konnte erfolgreich amplifiziert und in pET-19b unter Kontrolle von PT_{7lac} kloniert werden. Die Expression in *E. coli* Rosetta (DE3) bei 37 °C für 3 Stunden nach Induktion der Genexpression mit 0,6 mM IPTG wurde als optimal evaluiert. Die ADH-T (352 Aminosäuren) ist eine strikt NADP-abhängige *medium-chain* Dehydrogenase mit einer Substratpräferenz für aliphatische Ketone und Diketone. Funktionell liegt die ADH-T als Homo-Tetramer vor und zeichnet sich durch eine hervorragende Thermostabilität aus. Auf Grund der hoch aufgelösten Struktur des zu 93 % homologen Proteins aus *T. Brockii* lassen sich zuverlässige Vorhersagen über Cofaktor- und Substrat-Interaktionen mit der ADH-T machen.

3.3.2 Sequenz- und Strukturanalyse der ADH-T

Die aus 352 Aminosäuren bestehende Sequenz der ADH-T weist alle klassischen Merkmale von *medium-chain* Dehydrogenasen auf, so zum Beispiel das für die koordinative Bindung des Zn²⁺-Ions charakteristische „Zinkfinger“-Bindemotiv (**GHEAVGEVVEVGSEV**) und ein Glycin-reiches Motiv (**GXGXXG**), das an der Interaktion mit dem Coenzym NADP(H) beteiligt ist (Jornvall *et al.*, 1987; Sun & Plapp, 1992). 20 AS-Positionen C-terminal dieses Motives befindet sich die Aminosäure R200, welche ausschlaggebend für die strikte NADP-Präferenz ist.

Die positiv geladene Aminosäure Arginin wechselwirkt dabei mit der negativ geladenen Phosphatgruppe des NADP(H). Ein katalytischer Beleg für diese Struktur-Funktions-Vorhersage konnte erbracht werden, indem durch *overlap extension* PCR (2.3.10) gezielt die Ladung an dieser Position von Positiv zu Negativ durch Austausch gegen die Aminosäure Aspartat (ADH-T R200D) umgekehrt wurde. *E. coli* Rosetta (DE3) wurde mit dem entsprechend konstruierten Plasmid pAS-12 (*adh-T* R200D) transformiert und das mutierte *adh*-Gen wurde wie in 3.3.1 beschrieben exprimiert. Es konnte lediglich eine Restaktivität (10 mM Aceton, 0,2 mM NADPH) von ca. 1% im Vergleich zur wildtypischen ADH-T gemessen werden. Die Akzeptanz von NADH wurde durch diese einzelne Punktmutation nicht erhöht.

Das Ergebnis wird zudem durch die hoch aufgelöste 3D-Struktur (Korkhin *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1999) des im Bereich der Cofaktor-Bindedomäne vollständig homologen Proteins ADH-T_b aus *T. Brockii* untermauert. Eine Betrachtung der Interaktionspartner des NADP im Bereich des mit dem am Adenosin in 2'-Position veresterten Phosphatrests zeigt, dass mindestens 4 Aminosäuren direkt an der Koordination des Cofaktors beteiligt sind und somit auch für die strikte NADP-Abhängigkeit verantwortlich gemacht werden können. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren G198, S199, R200 und Y218 (Abbildung 30).

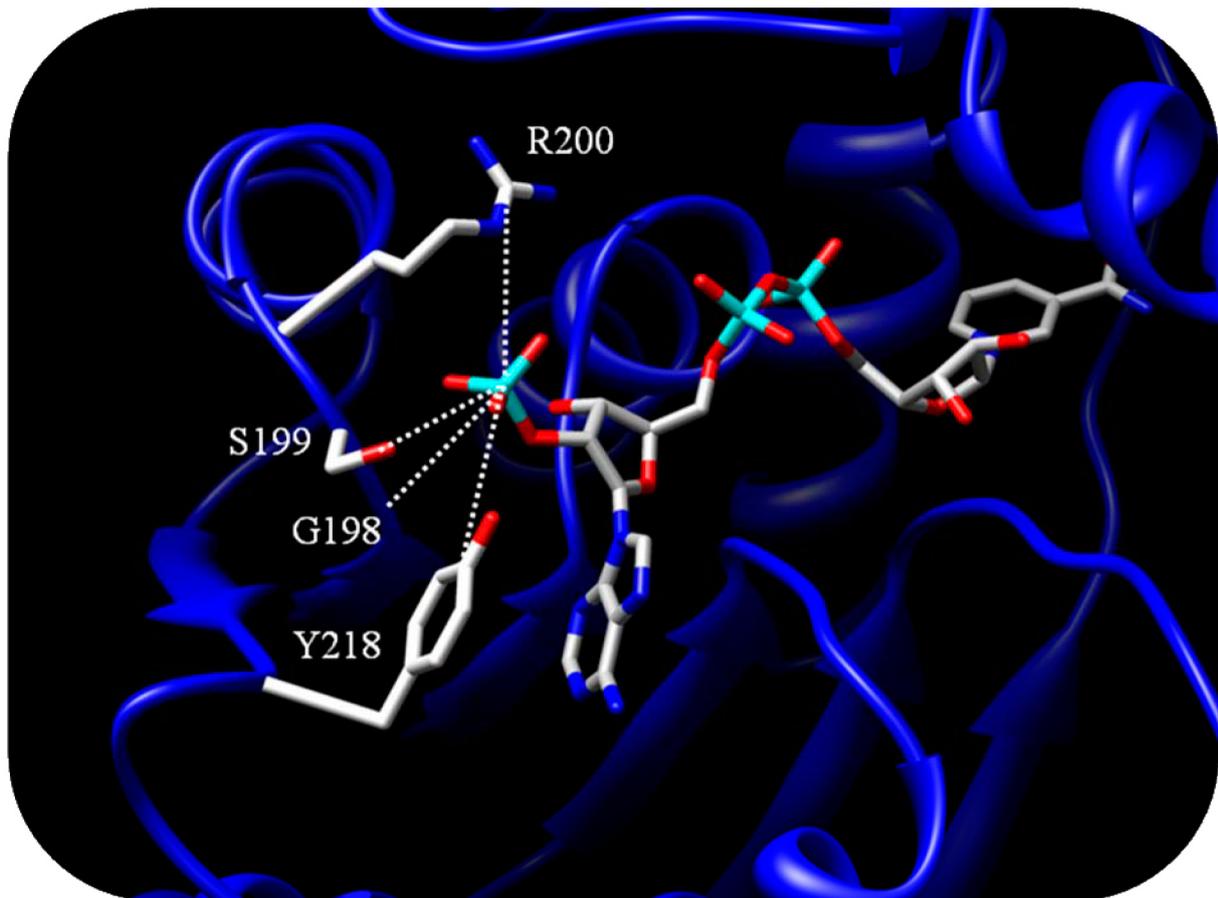


Abbildung 30: 3D-Strukturvorhersage der NADP-Koordination in ADH-T.

Mit dem am Adenosin in 2'-Position veresterten Phosphatrests können die Aminosäurereste G198, S199, R200 und Y218 interagieren.

Anhand der hoch aufgelösten Struktur des zu 93 % homologen Proteins ADH-Tb aus *Thermoanaerobacter brockii* konnten diejenigen Aminosäurereste in der Sequenz der ADH-T identifiziert werden, die mit dem an 2'-Position am Adenosin veresterten Phosphat-Rest wechselwirken und für die strikte NADP-Präferenz verantwortlich sein könnten.

3.3.3 Iterative Sättigungsmutagenese von ADH-T

Durch das Verfahren der iterativen Sättigungsmutagenese (ISM, siehe 2.3.8), modifiziert nach (Reetz & Carballeira, 2007), kann die Erzeugung zufälliger Punktmutation an definierten Positionen zu einer grundlegenden Veränderung der katalytischen und physikalischen Eigenschaften des Enzyms führen. Die ISM beruht auf einer kartesischen Betrachtung der räumlichen Proteinstruktur selbst sowie in ihrer Interaktion mit dem Substrat bzw. Cofaktor. So genannte *hot spots* innerhalb der Struktur, die für die Proteinestabilität oder

Substrataffinität/-koordination verantwortlich sind, müssen zunächst, gestützt durch die rationale Analyse der 3D-Struktur, identifiziert werden (Obradovic *et al.*, 2003; Radivojac *et al.*, 2004; Reetz *et al.*, 2005; Reetz *et al.*, 2006a; Reetz *et al.*, 2006b; Radivojac *et al.*, 2007). Durch Mutageneseprimer, die degenerierte Codons (Tabelle 18) enthalten, können via QuikChange™-PCR (2.3.8) zufällige Mutationen an diesen definierten Positionen in einem Ein-Schritt-Prozess eingefügt werden.

Tabelle 18: Nomenklatur für degenerierte DNA nach NC-IUB. (Liebecq, 1997)

Name	Spezifikation	Base	Name	Spezifikation	Base
A	Adenin	A	K	Keto	T G
T	Thymin	T	M	Amino	A C
G	Guanin	G	B	nicht A	T G C
C	Cytosin	C	D	nicht C	A T G
Y	Pyrimidin	T C	H	nicht G	A T C
R	Purin	A G	V	nicht T	A G C
S	<i>strong</i> (3H)	G C	N	alle	A T G C
W	<i>weak</i> (2H)	A T			

Das degenerierte Codon NNK ([ATGC][ATGC][TG]) steht folglich für 32 unterschiedliche Codons, die für alle 20 natürlichen Aminosäuren zzgl. Stopp-Codon codieren. Beim Design der Oligonukleotide muss entsprechend der Aminosäure, die mutagenisiert werden soll, ein degeneriertes Codon gesetzt werden. So lassen sich via QuikChange™-PCR (2.3.8) Mutanten-Bibliotheken erzeugen, bei denen je nach Wahl des degenerierten Codons die ausgewählten AS-Positionen in unterschiedlichen Stufen gesättigt werden.

So ist es der Arbeitsgruppe von Prof. Reetz mittels ISM beispielsweise gelungen, die Thermostabilität der *Bacillus subtilis* Lipase A dramatisch zu erhöhen (50 % Aktivitätserhalt nach 60-minütiger Inkubation bei 93 °C (T_{50}^{60} 93 °C), das bedeutet eine Steigerung ΔT_{50}^{60} um 45 °C. Darüber hinaus konnte durch Mutagenese an den Substratbindestellen der Epoxid-Hydrolase aus *Aspergillus niger* der E-Wert um den Faktor 25 von 4,6 auf 115 erhöht werden (Reetz *et al.*, 2006b; Reetz *et al.*, 2006c).

Die in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Aminosäure-Reste, welche mit dem negativ geladenen Phosphatrest des NADP(H) wechselwirken, waren Ziel der ISM für die ADH-T. Dabei wurden die Positionen G198, S199, R200 und Y218 in 3 Bibliotheken aufgeteilt, wobei die Positionen G198 und S199 zu einer Bibliothek zusammengefasst sind:

Bibliothek A	G198 + S199
Bibliothek B	R200
Bibliothek C	Y218

An den für die QuikChange™-PCR (2.3.8) eingesetzten Oligonukleotiden (2.1.3) wurden die zu mutagenisierenden Basen-Triplets durch das degenerierte Codon NNK ersetzt. Das Produkt einer solchen PCR ist exemplarisch in Abbildung 31 dargestellt. Man erzeugt ein PCR-Produkt, welches dem linearisierten Einzelstrang des Expressionsplasmides entspricht. Durch die Zusammenlagerung komplementärer DNA-Bereiche kommt es zu einer Ausbildung von ringförmigen DNA-Komplexen, welche über 2 Einzelstrang-Brüche verfügen. Chemisch kompetente *E. coli* Stämme lassen sich dennoch problemlos mit diesen DNA-Komplexen transformieren (2.3.5). Die Einzelstrangbrüche werden nach Aufnahme der DNA in die Zelle durch zelleigene Reparaturmechanismen beseitigt, so dass replikative Expressionsplasmide, die die erzeugten Mutationen tragen, in den Zellen vorliegen.

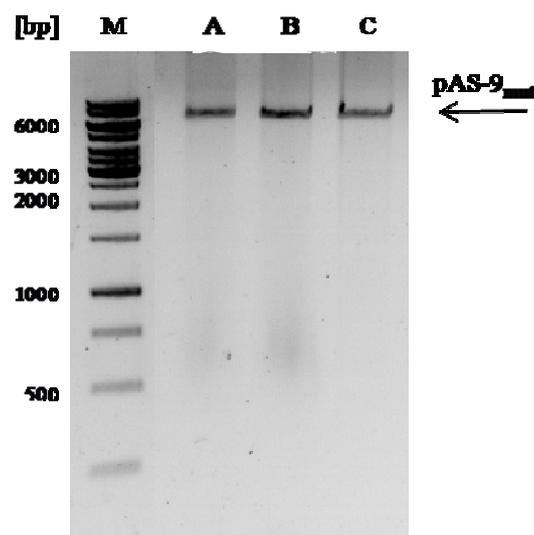


Abbildung 31: Agarosegel-Elektrophorese der QuikChange™-PCR *adh-T_{mut}*.

Als Matrize für die PCR diente das *adh-T* Expressionsplasmid pAS-9 (6708 bp). M = Marker, A = Bibliothek A (G198 S199), B = Bibliothek B (R200), C = Bibliothek C (Y218).

Mittels QuikChange™-PCR konnten 3 Mutanten-Bibliotheken erzeugt werden. In den generierten Plasmiden (pAS-9_{mut}) wurden durch den Einsatz von Oligonukleotiden mit degenerierten Codons an den Stellen, die für die Aminosäuren G198, S199, R200 und Y218 codieren, die entsprechenden Basen-Triplets in sämtlichen möglichen Kombinationen ausgetauscht. Dadurch wurde eine vollständige Sättigungsmutagenese durch eine Ein-Schritt-PCR an den so genannten *hot spots* erreicht.

3.3.4 Expression und Screening der ADH-*T* Mutantenbibliotheken

E. coli BL21 (DE3) wurde mit den in 3.3.3 erzeugten Mutanten-Bibliotheken transformiert (2.3.5). Der Transformationsansatz wurde auf Selektiv-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 96-well MTP [200 µl Autoinduktionsmedium (2.2.1) pro Kavität] mit den auf dem Nährboden befindlichen Klonen mit Hilfe des Kolonie-Pickroboters QPix2 (Firma Genetix, München) inokuliert. Nach Wachstum über Nacht bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mittels Lysozym aufgeschlossen (2.2.4). Nach erneuter Zentrifugation zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde der erhaltene Rohextrakt in einen automatisierten Enzymtest (Genesis Workstation, Firma Tecan, Mainz) eingesetzt. Ziel des Screenings war, mit 2-Propanol und NAD respektive Aceton und NADH aktive Klone ADH-*T*_{mut} zu finden. Die optimalen Reaktionsbedingungen (Enzym- und Substratkonzentrationen) wurden in umfangreichen Vorversuchen mit der wildtypischen ADH-*T* und dem Cofaktor NADP evaluiert. Die Problematik bestand darin, dass zwischen dem automatisierten Zusammenführen von Substrat-/Cofaktor-Gemisch und Rohextrakt und dem Transfer der Mikrotiterplatte in das Photometer zum Beginn der Aktivitätsmessung ca. 60 Sekunden vergehen. Setzt man zu viel Rohextrakt, gleichbedeutend mit zu viel aktivem Enzym, ein, so ist unter Umständen der Großteil des Cofaktors schon oxidiert bzw. reduziert. Im Photometer wird dieses Ereignis als „keine Aktivität“ ausgewertet. Dies war der Fall, wenn 50 µl Rohextrakt in einen 200 µl Assay-Ansatz eingesetzt wurden. Dieser Problematik kann man unter Beachtung der Michaelis-Menten-Gesetzmäßigkeiten ausschließlich durch Herabsetzung der Enzymkonzentration, sprich Verringerung der Menge respektive Verdünnung des Rohextraktes entgegenwirken.

Eingesetzt in das Screening wurden letztendlich 0,15 mM Cofaktor NADH bzw. NAD sowie 30 mM Aceton bzw. 20 % (v/v) 2-Propanol in einem Gesamtvolumen von 180 µl pro Kavität. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl unverdünntem Rohextrakt gestartet, welcher wie vorher beschrieben gewonnen wurde. Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten bei 30 °C in einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Innerhalb dieser Messdauer wurden für jede Kavität 5 Messpunkte zur Bestimmung der Absorptionsänderung durch Cofaktor-Reduktion bzw. -Oxidation aufgenommen. Insgesamt hat sich das Isopropanol/NAD-Screening als zuverlässiger erwiesen, da die allgemeine Hintergrundaktivität mit NAD deutlich niedriger ist als mit NADH und somit die Wahrscheinlichkeit von „Falsch-Positiven“-Treffern verringert ist. Als „Negativ“-Kontrolle wurde in den MTP stets wildtypische ADH-*T* mitgeführt, die mit NAD(H) keinerlei Reaktion zeigt. Sind im Screening Klone identifiziert worden, welche Aktivität mit dem Cofaktor NAD und dem Substrat 2-Propanol zeigten, so wurde der entsprechende Rohextrakt in einen Aktivitätstest mit Aceton und NADH im Küvetten-Maßstab eingesetzt (2.4.2). War die zuvor

gemessene Aktivität reproduzierbar, so wurde das Plasmid pAS-9_{mut} aus dem Klon isoliert und die in das Gen *adh-T* eingebrachte Mutation durch Sequenzierung identifiziert (3.3.5).

Ein automatisiertes Aktivitätsscreening zur Identifizierung von NAD-abhängigen ADH-*T*-Mutanten konnte erfolgreich entwickelt werden. Durch umfangreiche Feinabstimmungen von Cofaktor-, Substrat- und Enzymkonzentrationen konnte die Zahl der „Falsch“-Positiven Treffer deutlich minimiert werden.

3.3.5 Identifizierung und Isolierung NAD-abhängiger ADH-*T* Mutanten

Bereits in der ersten Mutagenese-Runde (Screening von ca. 3000 Klonen) der Bibliothek A (G198 + S199) konnten ca. 20 Klone identifiziert werden, die im Vergleich zum Wildtyp eine gesteigerte Aktivität mit NAD und 2-Propanol aufwiesen. Allerdings lag die Aktivität von lediglich zwei Klonen annähernd auf dem Niveau wildtypischer ADH-*T* in Reaktion mit 2-Propanol und NADP. Aus diesem Grund wurde lediglich die Plasmid-DNA dieser beiden Klone isoliert (2.3.1) und das *adh-T*_{mut} Insert sequenziert (2.3.6). Nach Expression der Mutanten-Bibliotheken B und C (Screening von ca. 500 Klonen pro Bibliothek) konnten keine Klone identifiziert werden, die im Gegensatz zur Wildtyp-ADH-*T* gesteigerte Aktivität mit 2-Propanol und NAD zeigten.

Die identifizierten Mutationen der beiden Klone der Bibliothek A wurden in neuen Oligonukleotiden fixiert und die Plasmid-DNA dieser Klone diente in der nächsten Mutagenese-Runde als Matrize für die QuikChange™-PCR. Durch die Kombination von Mutationen aus Bibliothek A₁/A₂ + B bzw. A₁/A₂ + C sollte eine weitere Aktivitätssteigerung erreicht werden. Gescreent wurden jeweils ca. 2000 Klone.

Die Kombination von Bibliothek A₁/A₂ + B in der zweiten Mutagenese-Runde brachte leider keine Verbesserung der Aktivität, einige Klone verloren sogar ihre katalytische Aktivität wieder. Die Kombination von Bibliothek A₁ + C hingegen brachte zwei Klone hervor, deren Aktivität mit 2-Propanol und NAD im Vergleich zu der Aktivität des Klons A₁ nochmals gesteigert war. Durch Kombination von Bibliothek A₂ + C konnte keine weitere Aktivitätssteigerung erreicht werden. Der Verlauf der ISM sowie eine Übersicht über die identifizierten Mutationen ist in Abbildung 32 dargestellt.

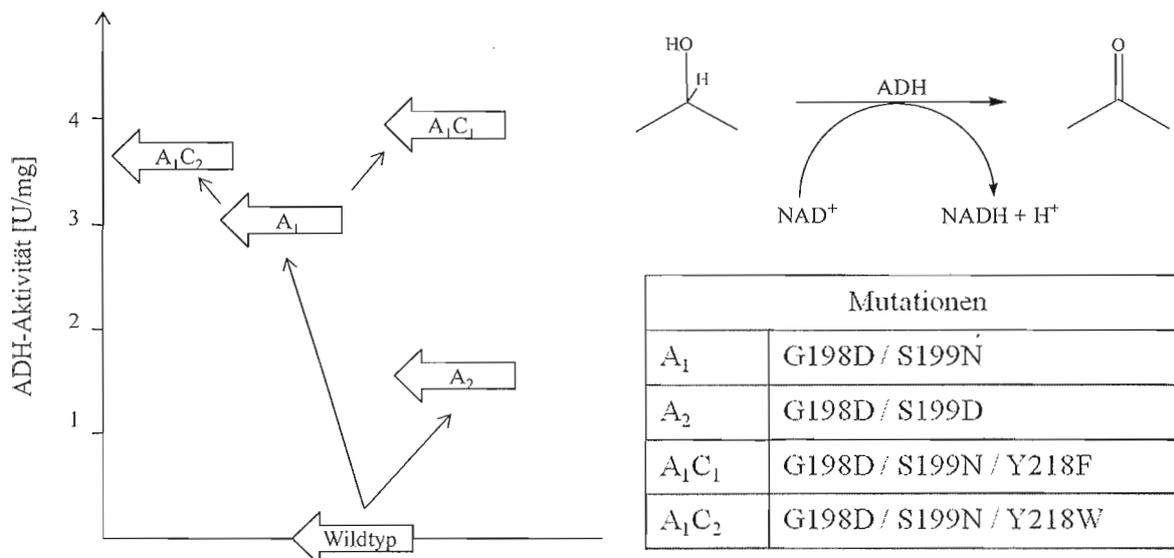


Abbildung 32: Schematischer Ablauf der ISM ADH-T und eine Übersicht über die identifizierten Mutanten.

Erläuterungen im Text

Mit dem automatisierten Aktivitätsscreening wurden insgesamt ca. 8000 Klone untersucht. Es konnten 4 unterschiedliche NAD-abhängige ADH-T-Mutanten identifiziert werden, deren Aktivität mit NAD und 2-Propanol in etwa in der gleichen Größenordnung lag wie die Aktivität wildtypischer ADH-T mit NADP und 2-Propanol.

3.3.6 Biochemische Charakterisierung NAD-abhängiger ADH-T Mutanten

An die Identifizierung der insgesamt 4 unterschiedlichen ADH-T-Mutanten schloss sich deren biochemische Charakterisierung an. Globales Ziel der ISM war, eine NAD-abhängige Variante der ADH-T zu erzeugen, die sich im Bezug auf die übrigen prozessrelevanten Parameter (katalytische Effizienz, Stabilität, Stereo-Selektivität, Substratspektrum) nicht vom Wildtyp unterscheidet.

Zunächst wurden sowohl das Gen der wildtypischen ADH-T als auch die 4 Mutanten in *E. coli* BL21 (DE3) in Autoinduktionsmedium über Nacht bei 30 °C exprimiert. Nach Ultraschall-Zellaufschluss wurden die Proben einer Hitzedenaturierung für 7 Minuten bei 70 °C ausgesetzt (2.2.1, 2.2.3, 2.2.4). Lösliche und unlösliche Proteinfraction wurden durch Zentrifugation voneinander getrennt. Die Zusammensetzung der löslichen Proteinfraction wurde durch SDS-PAGE analysiert (2.4.4). Nach Bestimmung der jeweiligen Proteinmengen (2.4.1) im hGZE wurden mit dem hitzedenaturierten Rohextrakt die spezifischen

Enzymaktivitäten der Wt-ADH-*T* sowie der Mutanten mit 0,2 mM NADPH respektive NADH und 10 mM Aceton als Standard-Substrat bestimmt. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Abbildung 33 dargestellt. Die Aktivitäten der Mutanten mit Aceton und NADH liegen in etwa in der gleichen Größenordnung (zwischen 32 % und 82 %) wie die Aktivität der Wt-ADH-*T* mit Aceton und NADPH. Die SDS-PAGE zeigt deutlich, dass alle 4 ADH-*T*-Mutanten thermostabil sind und nach Hitzebehandlung in Lösung bleiben.

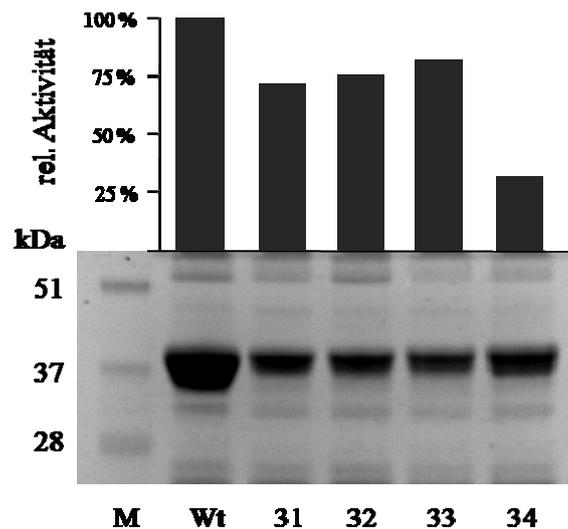


Abbildung 33: SDS-PAGE und Aktivitäts-Analyse wildtypischer ADH-*T* sowie der 4 Mutanten.

Expression der Gene in *E. coli* BL21 (DE3), Autoinduktionsmedium ü. N. 30 °C. Zellaufschluss durch Ultraschall, Hitze-denaturierung für 7 Minuten bei 70 °C. Aktivitätstest mit 0,2 mM Cofaktor (Wt = NADPH, Mutanten = NADH) und 10 mM Aceton. Aktivität Wt = 100 %. M = Marker, Wt = ADH-*T*-Wildtyp, 31 34 = ADH-*T*-Mutanten, siehe

Abbildung 32.

Die Mutanten 31-34 zeigten keinerlei Aktivität im Enzymtest mit 10 mM Aceton und 0,2 mM NADPH bzw. 20 % (v/v) 2-Propanol und 0,2 mM NADP.

Im Anschluss wurden die kinetischen Konstanten für den Cofaktor NAD aufgenommen, als Substrat diente 2-Propanol in einer konstanten Konzentration von 20 % (v/v). Das Ergebnis ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Kinetische Konstanten von ADH-*T* und den 4 NAD-abhängigen Mutanten.

Die kinetischen Konstanten wurden aufgenommen für ihre funktionellen Cofaktoren. Die Aktivitäten wurden mit hitzedenaturiertem GZE gemessen (2.2.4). Die 2-Propanol-Konzentration betrug konstant 20 % (v/v). Die Werte sind in folgenden Einheiten angegeben: K_m [mM], V_{max} [U/mg], k_{cat} [min^{-1}], k_{cat}/K_m [$\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$].

ADH- <i>T</i>	Wildtyp (NADP)	G198D S199N (NAD)	G198D S199N Y218W (NAD)	G198D S199N Y218F (NAD)	G198D S199D (NAD)
K_m	0,020	0,022	0,020	0,010	0,030
V_{max}	4,73	3,42	3,55	3,87	1,52
k_{cat}	706	510	530	578	227
k_{cat}/K_m	35301 (100 %)	23204 (66 %)	26494 (75 %)	57764 (164 %)	7563 (21 %)

Anhand der ermittelten K_m -Werte kann man feststellen, dass es sich bei den identifizierten ADH-*T*-Varianten tatsächlich um Proteine handelt, die eine hohe Affinität für den Cofaktor NAD aufweisen. Diese Affinität liegt auf dem Niveau der Wildtyp-ADH-*T* für den Cofaktor NADP. Eine tatsächliche Aussagekraft über die Verwendbarkeit eines biokatalytisch relevanten Enzyms stellt die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m dar. Diese katalytische Effizienz liegt bei zwei der vier Mutanten in der gleichen Größenordnung (ca. 70 %) wie diejenige des Wildtyps und ist nur bei einer Mutante signifikant reduziert (21 %). Die katalytische Effizienz der 3-fach-Mutante ADH-*T* G198D S199N Y218F hingegen ist signifikant erhöht (164 %).

Um zu überprüfen, ob die vier ADH-*T*-Varianten die gleiche Enantioselektivität ((*S*)-spezifische Reduktion prochiraler Ketone) wie die wildtypische ADH-*T* aufweisen, wurden 30 mM Acetophenon in einer kontinuierlichen Umsetzungsreaktion reduziert. In die Reaktion eingesetzt wurde 1 mM NAD für die 4 Varianten bzw. zusätzlich 1 mM NADP für den Wildtyp als „Positiv“-Kontrolle. Zudem sollte gezeigt werden, dass der eingesetzte Cofaktor durch eine substratgekoppelte Rückreaktion mit 2-Propanol regeneriert werden kann (2.6.1). In definierten Abständen wurden dem Ansatz Proben entnommen und auf die Produktbildung hin gaschromatografisch untersucht (2.4.3). Die gebildete relative Produktmenge ist in Abbildung 34 als Funktion der Zeit aufgetragen.

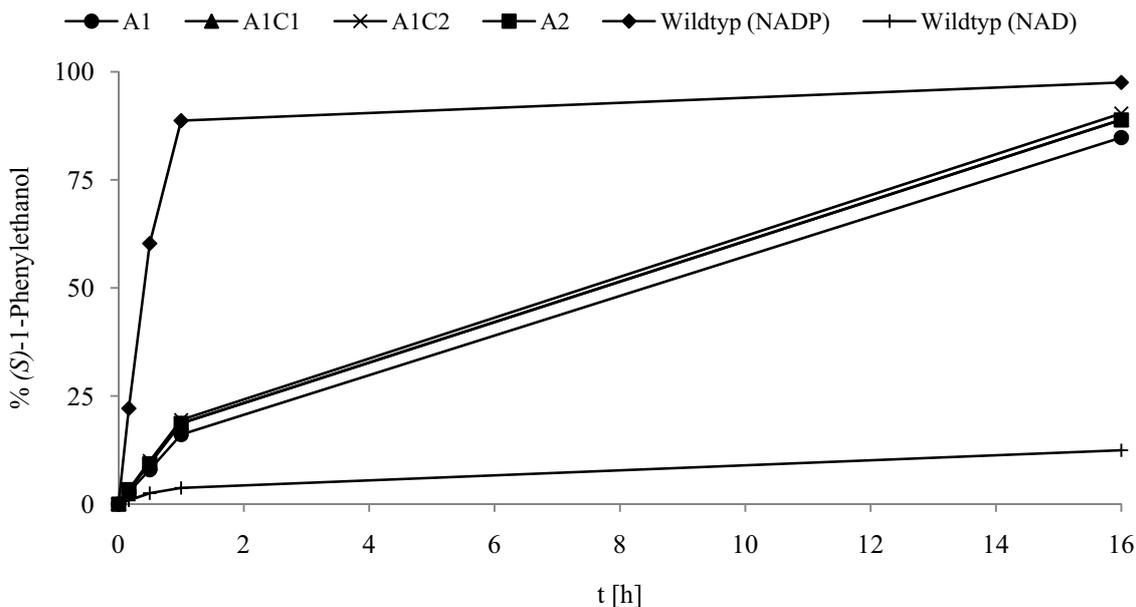


Abbildung 34: (S)-1-Phenylethanol-Bildung durch die ADH-T und 4 NAD-abhängigen ADH-T Mutanten.

Eingesetzt in die Reaktion (37 °C) wurden 30 mM Acetophenon, 20 % (v/v) 2-Propanol zur kontinuierlichen Cofaktor-Regenerierung, 1 mM NAD bzw. NADP und 1 U ADH (hitzenaturierter GZE), gemessen mit 30 mM Acetophenon und 0,2 mM NADH (30 °C). Die relative Menge an (S)-1-Phenylethanol wurde durch GC bestimmt. In allen 4 Fällen war $ee > 99,9\%$. Die Umsatzrate der Wt-ADH-T mit NADP lag bei 97 %, mit NAD bei 12 %. Die Umsatzraten der 4 NAD-abhängigen ADH-T-Mutanten lagen zwischen 85 % und 91 %.

Die NAD-abhängigen Varianten der ADH-T liefern in den Bereichen Expressierbarkeit, Thermostabilität, katalytische Effizienz, Enantioselektivität und Akzeptanz von 2-Propanol zur Cofaktorregenerierung annähernd die gleichen Werte wie die wildtypische ADH-T mit dem Cofaktor NADP.

Da durch *in vitro* Evolution erzeugte Mutanten oft eine geringere Stabilität aufweisen als die wildtypischen Proteine wurde die Aktivität der einzelnen Enzyme über einen Zeitraum von 7 Tagen kontinuierlich bestimmt. Trotz ihrer Thermostabilität ist die Lagerstabilität der ADH-T bei 4 °C relativ schlecht. Durch Zusatz von 1 M NaCl bei 4 °C-Lagerung oder durch Zusatz von 50 % Glycerin (v/v) bei -20 °C-Lagerung kann das Enzym hingegen über einen langen Zeitraum stabil gelagert werden (persönliche Mitteilung Dr. Hennemann, Codexis).

Dieser Umstand scheint auch für die 4 Varianten zu gelten, da nach 14 Tagen, entsprechend zur Wt-ADH-T, keinerlei Aktivitätsverlust bei -20 °C-Lagerung nach Glycerin-Zusatz zu verzeichnen war. In Abbildung 35 ist die relative Aktivität der unterschiedlichen ADH-T-Varianten über der Zeit aufgetragen. Die vier Mutanten verhalten sich auch in Bezug auf ihre Lagerstabilität nahezu identisch zum Wildtyp.

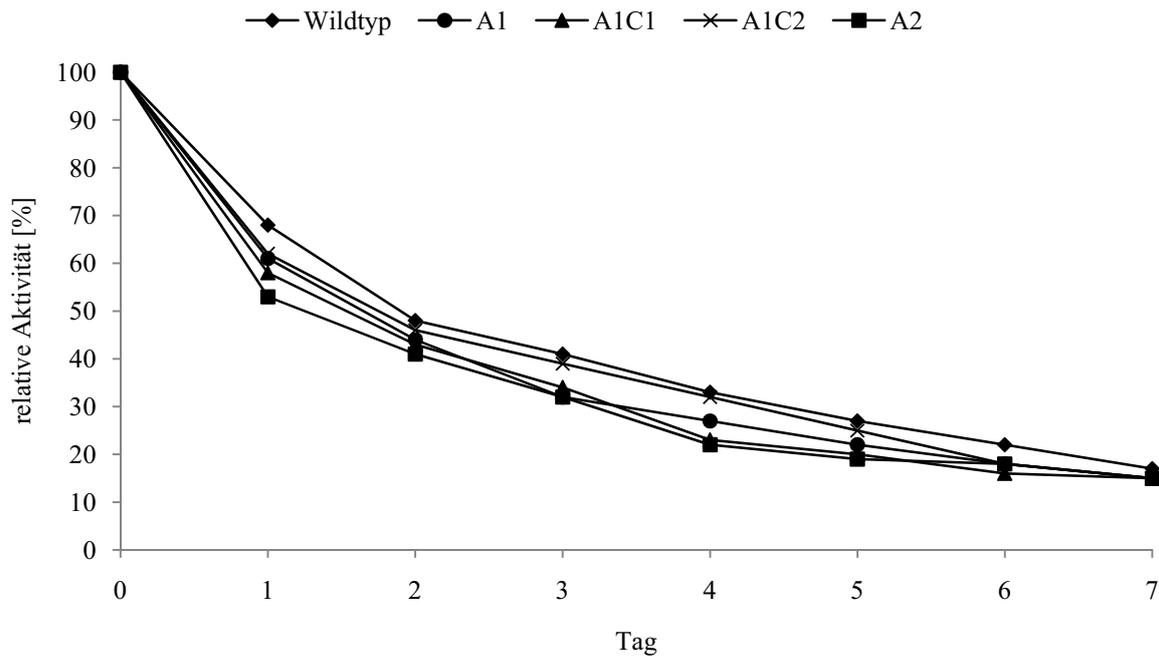


Abbildung 35: Lagerstabilität der Wt-ADH-T sowie der 4 ADH-T-Mutanten bei 4 °C.

Die Aktivität wurde photometrisch mit 10 mM Aceton und 0,2 mM NADH (Wt NADPH) bestimmt. In den Aktivitätstest (2.4.2) eingesetzt wurden 10 µl hitzedenaturierter Rohextrakt, der aus einer Expression der entsprechenden Gene in *E. coli* BL21 (DE3) in Autoinduktionsmedium erhalten wurde. Initiale Aktivitäten (100%-Werte): Wildtyp: 8,69 U/ml, A1: 6,01 U/ml, A1C1: 6,24 U/ml, A1C2: 6,30 U/ml, A2: 5,20 U/ml.

Die im Screening identifizierten vier NAD-abhängigen ADH-T-Mutanten wurden in Bezug auf wichtige biochemische und physikalische Charakteristika untersucht. Sie sind mit hohen Proteinausbeuten in *E. coli* BL21 (DE3) exprimierbar und mindestens in gleichem Maße wie die Wt-ADH-T thermostabil. Die K_m -Werte der 4 Varianten für den Cofaktor NAD liegen auf dem gleichen Niveau wie der entsprechende Wert der Wt-ADH-T für NADP. Die katalytische Effizienz einer Variante ist dabei signifikant gesteigert. Die Varianten sind ebenfalls (*S*)-selektiv und erzielen mit dem Cofaktor NAD bei reduzierter Reaktionsgeschwindigkeit Umsatzraten, die nur knapp unter Wildtyp-Niveau mit NADP liegen, *ee* ist dabei > 99,9 %. Auch in puncto Lagerstabilität verhalten sich alle vier Varianten identisch zum Wildtyp.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Das Metagenom als Quelle für neue Biokatalysatoren

Nach einer Studie der Unternehmensberatung McKinsey & Company sollen im Jahre 2010 10 – 20 % aller benötigten Chemikalien durch biotechnologische Prozesse hergestellt werden, wobei im Bereich der Feinchemikalien der Anteil der Produkte, an deren Synthese ein enzymatischer Schritt beteiligt ist, bis zu 60 % betragen kann (Bachmann, 2003). Dementsprechend hoch sind nicht nur die gestellten Erwartungen, sondern auch die Investitionen, die im Bereich der Biotechnologie getätigt werden (Lawrence, 2008). Der Bedarf an neuen oder optimierten Biokatalysatoren nimmt ständig zu. Mikroorganismen bergen das größte Potential an neuen Biokatalysatoren. Die Biosphäre wird durch Mikroorganismen dominiert (Whitman *et al.*, 1998), die sogar Umgebungen unter extremsten Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert und Druck besiedeln. Der größte Teil der Mikroorganismen ist bis heute noch nicht untersucht worden oder gänzlich unbekannt. So wird geschätzt, dass sich die globale Vielfalt an mikrobiellen Arten in einem Bereich von 10^6 - 10^7 bewegt (Cowan, 2000; Burton *et al.*, 2002). In einem Gramm einer Bodenprobe befinden sich bis zu 10 Milliarden Mikroorganismen, die zu über tausend verschiedenen Arten gehören können (Rondon *et al.*, 2000). Beim klassischen Ansatz werden die Mikroorganismen kultiviert und auf die gesuchte Enzymaktivität untersucht. Jedoch sind weniger als 1 % der Mikroorganismen durch Standardkultivierungstechniken erfassbar und repräsentieren daher nur ein kleines Feld der mikrobiellen Diversität. So liegt der vermutete Anteil an kultivierbaren Mikroorganismen im Boden bei nur 0,3 %, im Meerwasser sind es lediglich 0,001-0,1 % und im Seewasser bei 0,1 - 1 % (Torsvik *et al.*, 1990; Torsvik *et al.*, 1998; Torsvik & Ovreas, 2002). Die Diskrepanz zwischen dem *in situ* beobachtetem mikrobiellen Reichtum und der durch Kultivierung *in vitro* erhaltenen Kolonienzahl wird auch als „*great plate count anomalie*“ bezeichnet (Staley & Konopka, 1985).

Durch den so genannten Metagenom-Ansatz kann theoretisch die komplette biokatalytische Diversität einer mikrobiellen Population, die sich in einem gegebenen Habitat befindet, erschlossen werden (Handelsman *et al.*, 1998). Indem man sich Zugang zu der metagenomischen DNA verschafft, bekommt man auch Zugang zu den Genen der nicht-kultivierbaren Mikroorganismen. Diese Gene können in geeignete Expressionsvektoren (meist Plasmide, Cosmide, Fosmide oder *BACs* (*bacterial artificial chromosome*)) kloniert und heterolog exprimiert werden. Die Genprodukte können durch ein auf das jeweilig gesuchte Enzym abgestimmtes Aktivitätsscreening identifiziert werden.

Die Methodik der DNA-Gewinnung und die Art der Vektoren, in die die gewonnene DNA eingebracht werden soll, ist in erster Linie von der Größe der Gene abhängig, die man isolieren möchte.

Sollen im Metagenom neue Sekundärmetabolite identifiziert werden, deren Produktion in aller Regel an die Expression eines kompletten Genclusters (teilweise bis 100 kb) gekoppelt ist, so ist es notwendig, große DNA-Fragmente zu gewinnen, welche in Form von *BAC*-Bibliotheken untersucht werden können (Schwecke *et al.*, 1995; Rondon *et al.*, 2000; Gillespie *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 2002).

Sucht man „einfache“ Enzyme, dann ist es oft ausreichend metagenomische DNA-Fragmente zwischen 3 kb und 10 kb zu erzeugen und in eine Plasmid- oder Cosmid-basierte Bibliothek zu klonieren. Aber auch hier gibt es deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Enzymklassen, die identifiziert werden sollen. Als Maß für diesen Unterschied kann die mittlere statistische Größe einer Bibliothek (in Mbp) herangezogen werden, die durchmustert werden muss, um einen Treffer für die jeweilige Enzymklasse zu erzielen (Lorenz & Eck, 2005).

Grundsätzlich gilt, dass umso mehr Klone durchmustert werden müssen, je kleiner die klonierten DNA-Fragmente sind. Der Grund dafür liegt darin, dass die statistische Wahrscheinlichkeit bei großen Metagenom-DNA-Fragmenten intakte Leserahmen (von Start- bis Stopp-Codon) zu finden größer ist, als bei kleinen Fragmenten. Eben solchen Einfluss hat natürlich auch die Größe des Leserahmens selbst, der für das entsprechende Enzym codiert. Gene, die 500 – 800 bp groß sind (z. B. Lipasen), bleiben bei der Isolierung und Klonierung der metagenomischen DNA statistisch häufiger intakt erhalten als Gene, die über 1 kb groß sind (z. B. Alkohol-Dehydrogenasen) (Knietsch *et al.*, 2003b; Knietsch *et al.*, 2003a). Zudem kommen einige Enzyme generell seltener in einem Pool von Proteinen vor oder lassen sich auf Grund ihrer cytotoxischen Eigenschaften schlechter als andere Enzyme exprimieren (Lorenz & Eck, 2005).

Ausschlaggebend für die erfolgreiche Identifizierung neuer Biokatalysatoren in einem Metagenom-Ansatz ist zudem ein zuverlässiges Screening-System, mit dem in kürzester Zeit im Hochdurchsatzverfahren teilweise bis zu einer Million Klone durchmustert werden können (Henne *et al.*, 1999; Knietsch *et al.*, 2003b).

Einen gewissen Grad der Vorselektion kann man dabei erreichen, in dem man metagenomische DNA einer Anreicherungskultur isoliert. Durch kontinuierliche Zugabe eines geeigneten Substrates zu einer mikrobiellen Population ermöglicht man denjenigen Mikroorganismen einen Wuchsvorteil, die das Substrat – bedingt durch einen entsprechenden enzymatischen Status – effektiver verwerten können. Nach dieser Methode ist es beispielsweise gelungen, verschiedene Biotin-Operons und Agarasen aus einem Metagenom-Ansatz zu isolieren (Entcheva *et al.*, 2001; Voget *et al.*, 2003).

Eine solche Anreicherungskultur wurde von Frau Dr. Andrea Weckbecker angelegt (Weckbecker, 2005b). Das Populationshabitat stellte ein benutztes Spültuch aus der Küche des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie dar. Über einen längeren Zeitraum wurde die Kultur mit dem Substrat 2-Hexanol inkubiert. Das Ziel der Anreicherung bestand darin, ADHs zu identifizieren, die langkettige aliphatische Substrate umsetzen können.

Nach der mechanischen Zerkleinerung des Spültuches wurde die metagenomische DNA nach dem Prinzip der direkten Lyse (Zhou *et al.*, 1996) isoliert und durch Restriktion mit dem Enzym *EcoRV* fragmentiert. Enzymkonzentration und Inkubationsdauer wurden dabei so gewählt, dass die Fragmente zwischen 2 kb und 10 kb groß waren.

Nach Klonierung dieser Fragmente in den Selektions-Vektor pZErO-2 wurde *E. coli* TOP10 mit der Plasmid-Bank transformiert und auf Selektivagar kultiviert. So wurden etwa 1000 Klone generiert, die metagenomische DNA aus dem Spültuch plasmidcodiert in *E. coli* exprimieren konnten.

Eine Restriktionsanalyse hat ergeben, dass die durchschnittliche Größe der klonierten Metagenom-DNA-Fragmente bei 2,4 kb lag. Die Größe der kompletten Bibliothek lag somit bei 2,4 Mbp. In Anbetracht der Tatsache, dass Metagenom-Bibliotheken in der Regel eine Größe zwischen 100 und 2000 Mbp aufweisen (Lorenz & Eck, 2005) und dass die mittlere statistische Größe der Bibliothek zur Identifizierung einer ADH aus einem Metagenom-Ansatz 160 Mbp groß sein muss (Knietsch *et al.*, 2003a), rangiert die Wahrscheinlichkeit in dieser Bibliothek eine ADH zu finden in der Größenordnung von ca. 2 %.

Diese Metagenom-Bank wurde dennoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus einer Gefrierkultur heraus rekultiviert und einem Aktivitätsscreening unterzogen. Die effektivsten Puffersysteme und -konzentrationen für den Zellaufschluss sowie die optimalen Substrat- und Cofaktor-Konzentrationen wurden empirisch ermittelt. Eine Problematik bei der Entwicklung des Aktivitäts-Assays bestand darin, dass in dem automatisierten Prozess ca. 60 Sekunden vergehen, bis der Roboter die Mikrotiterplatte nach Mischung aller Komponenten in das Photometer überführt hat. Sollte innerhalb dieser Zeit der zur Verfügung stehende Cofaktor bereits durch hoch-aktive Enzyme umgesetzt worden sein, würde man keine Aktivität mehr detektieren. Wählt man von Anfang an die Cofaktor-Konzentration zu hoch, liefert das Photometer keine zuverlässigen Daten, da die Absorption zu hoch ist. Als Positivkontrolle zur Überprüfung des entwickelten Aktivitätsassays wurde die ADH aus *Lactobacillus kefir* plasmidcodiert auf pZErO-2 eingesetzt, welche in dem Screeningsystem nach konstitutiver Expression in *E. coli* TOP10 mit ca. 500 mU/ml für die Hexanal-Reduktion (30 mM) ein deutliches Signal lieferte.

Generell wurde beim Screening die Reduktion der Carbonyl-Substrate mit einem Cofaktor-Gemisch aus NADH und NADPH gemessen. Wie in 3.1.4 beschrieben, wurden im automatisierten Screening zunächst 25 Klone identifiziert, die Aktivität mit Hexanal und/oder

Ethylacetoacetat als Substrat aufwies. Letztendlich konnte die Aktivität von nur neun Klonen reproduziert werden. Ursächlich für diese offensichtlichen Messartefakte könnte gewesen sein, dass nach dem enzymatischen Zellaufschluß durch Lysozym die in Lösung befindlichen Zelltrümmer durch Zentrifugation nicht vollständig sedimentiert wurden bzw. bei den automatisierten Pipettierschritten wieder resuspendiert wurden und dadurch die photometrische Aktivitätsmessung beeinflusst haben. Die Plasmid-DNA der neun Klone, deren Aktivität im Küvetten-Maßstab reproduziert werden konnte, wurde isoliert und die metagenomischen DNA-Inserts wurden sequenziert. Im Ergebnis konnte ein vollständiger Leserahmen identifiziert werden, der für eine putative Oxidoreduktase ohne signifikante Homologien zu bereits bekannten Oxidoreduktasen codieren könnte. Das identifizierte Gen (810 bp) wurde *orm1* und das entsprechende Genprodukt ORM1 (**O**xidoreduktase **M**etagenom**1**) genannt. ORM1 ist ein aus 269 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer berechneten Masse von 30,4 kDa. Im C-terminalen Bereich der Primärstruktur befindet sich das hochkonservierte Motiv **GxGxxG**, welches charakteristisch für *medium-chain* Dehydrogenasen ist. Die positive Ladungsverteilung im Bereich von ca. 20 Aminosäuren C-terminal dieses Glycin-reichen Motives deutet auf eine NADP-Abhängigkeit hin. Laut bioinformatischen Vorhersagetools ist das Gen Intron-frei. Bei der Vorhersage von posttranslationalen Modifikationen fällt auf, dass einige Phosphorylierungs-Erkennungssequenzen vorhanden sind. Knapp 10 % der in *orm1* verwendeten Codons werden in *E. coli* selten (< 20 %) bis sehr selten (< 5 %) verwendet. Diese Umstände könnten dafür sprechen, dass *orm1* eukaryotischen Ursprungs ist. Ein weiterer Hinweis dafür könnte sein, dass bei T7-basierter, starker Expression von *orm1* in *E. coli* BL21 (DE3) im Gegensatz zur konstitutiven Expression kein aktives Protein gebildet wird. Nichtsdestotrotz lässt sich *orm1* in *E. coli* TOP10 funktionell exprimieren. Die aufgenommenen Aktivitäten (3.1.7) bestätigen die aus der Primärstruktur gezogene Schlussfolgerung, dass es sich bei ORM1 um ein NADP-abhängiges Enzym handelt, wobei die Akzeptanz für NAD im Bereich von ca. 50 % liegt. Im aufgenommenen Substratspektrum zeigt sich eine deutliche Präferenz für aliphatische Aldehyde. Aliphatische und aromatische Ketone werden mit Einschränkungen (Tabelle 10) ebenfalls akzeptiert. Gaschromatographische Analysen haben ergeben, dass ORM1 Acetophenon zu (*S*)-1-Phenylethanol reduziert.

Dass trotz der geringen statistischen Wahrscheinlichkeit in der kleinen Metagenom-Bibliothek eine Oxidoreduktase gefunden wurde, ist möglicherweise auf die Anreicherung mit 2-Hexanol zurückzuführen. Dadurch, dass diejenigen Mikroorganismen einen Selektionsvorteil erhielten, die das Substrat dank eines entsprechenden Enzymstatus metabolisieren konnten, wurde die Oxidoreduktase-Frequenz im Habitat in dem Maße erhöht, dass eine Bibliothek-Größe von 2,4 Mbp ausreichend war, um einen funktionellen Leserahmen zu identifizieren. Eine größere Ausbeute hätte mitunter erzielt werden können, wenn (1) die durchschnittliche Größe der intergrierten metagenomischen DNA-Fragmente höher gewesen wäre und (2) die Bibliothek insgesamt mehr als 1000 Klone umfasst hätte.

Der Weg über eine Anreicherungskultur zur Identifizierung von neuen Biokatalysatoren scheint sich dann als sinnvoll zu erweisen, wenn ein geeignetes Screeningsystem vorliegt, mit dem auf die während der Anreicherung induzierte Aktivität selektioniert werden kann. In einem photometrischen Assay mit ausreichender Empfindlichkeit ist dieses wie gezeigt möglich. Ein photometrischer Assay weist hingegen eine klare Limitierung in Bezug auf Wirtschaftlichkeit und Aufwand im Vergleich zu einem Platten-Assay auf. Diese Form der Selektion weist hingegen oft nicht die nötige Empfindlichkeit auf, so dass es zur Identifizierung von falsch-positiven Klonen kommt. Als sehr effektiv haben sich deshalb aktivitätsbasierte Screeningsysteme entwickelt, bei denen Zellwachstum direkt an die gewünschte Aktivität gekoppelt ist (Henning *et al.*, 2006; Leggewie *et al.*, 2006).

4.2 Kombination biokatalytisch relevanter Eigenschaften in chimären ADHs

Bereits in der Vergangenheit konnten chimäre Enzyme mit interessanten Eigenschaften erzeugt werden. In den meisten Fällen wurden die chimären Gene durch DNA-Shuffling erzeugt. Voraussetzung für die Durchmischung ist dabei eine ausreichende Homologie der beteiligten Gene. Die Zusammensetzung des chimären Produkts ist unter diesem Gesichtspunkt kein Zufallsprodukt, beruht aber beim klassischen DNA-Shuffling auf keinen rationalen Überlegungen in puncto Enzym-Design. Wie in 1.3 beschrieben wurden interessante Ergebnisse erzielt, wenn das DNA-Shuffling mit einer rationalen Komponente, der ortsspezifischen Mutagenese kombiniert wurde. So konnte eine GDH-Chimäre (Glucose-Dehydrogenase) aus den parentalen GDHs aus *Escherichia coli* und *Serratia marcescens* erzeugt werden, die eine erhöhte EDTA-Toleranz, eine gesteigerte Thermostabilität und eine höhere Substrat-Affinität als die jeweiligen Wt-GDHs aufweist (Tripura & Podile, 2007). Ebenfalls durch eine Kombination aus DNA-Shuffling der *E. coli* Isocitrat-Dehydrogenase und der *Thermus thermophilus* Isopropylmalat-Dehydrogenase und anschließender ortsspezifischer Mutagenese konnte die Aktivität des chimären Enzyms mit Isocitrat signifikant erhöht werden (Doyle *et al.*, 2000).

Ein komplett rationaler Ansatz wurde verfolgt, als eine Chimäre aus zwei unterschiedlichen Aminosäure-Dehydrogeasen erzeugt wurde (Kataoka *et al.*, 1994). Der N-Terminus, der die Substrat-Bindestelle beinhaltet, wurde durch die *Thermoactinomyces intermedius* L-Phenylalanin-Dehydrogenase gestellt. Der C-Terminus mit der NAD(H)-Bindestelle entstammt der *Bacillus stearothermophilus* L-Leucin-Dehydrogenase. Im Ergebnis wurde eine NAD-abhängige Aminosäure-Dehydrogenase erzeugt, die trotz identischer K_m -Werte für L-Phenylalanin lediglich 6 % der Wt-Aktivität der L-Phenylalanin-Dehydrogenase aufweist. Interessanterweise wurde die Akzeptanz für Isoleucin und Valin deutlich gesteigert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei chimäre ADHs aus den Genen der *adh105* und *adh-Lb* konstruiert werden. Beide Gene codieren für biokatalytisch eingesetzte *short-chain* ADHs, welche die Substrate (*R*)-selektiv umsetzen können.

Die 3D-Struktur der ADH-*Lb* wurde gelöst und das Enzym umfassend charakterisiert (Niefind *et al.*, 2000; Niefind *et al.*, 2003; Schlieben *et al.*, 2005). Als Grundlage für die Konstruktion und anschließende Charakterisierung der chimären ADHs wurde das Gen *adh105* im Rahmen dieser Arbeit unter Kontrolle von PT7_{lac} kloniert, exprimiert und das Genprodukt biochemisch charakterisiert. Während die ADH105 NAD-abhängig ist und halogenierte aliphatische Substrate bevorzugt, ist die ADH-*Lb* NADP-abhängig und zeigt zudem gute Aktivitäten mit aromatischen Substraten. Im Gegensatz zur ADH105 akzeptiert die ADH-*Lb* 2-Propanol als Substrat zur kontinuierlichen Cofaktor-Regenerierung (1.2).

In den zu konstruierenden chimären ADHs sollten die NAD-Abhängigkeit der ADH105 und die Substratspezifität der ADH-*Lb* kombiniert werden.

Da die Homologie der beiden Gene (3.2.4) für ein klassisches DNA-Shuffling nicht ausreichend ist (keine signifikante Homologie auf Nukleotidebene, 30 % Homologie auf Aminosäureebene), die Sekundärstrukturen und Tertiärstrukturen der entsprechenden Proteine aber nahezu identisch vorhergesagt wurden (Abbildung 19 und Abbildung 20), bildete ein rationaler Ansatz die Basis für die Konstruktion der Chimären. Durch *overlap-extension* PCR konnten zwei chimäre Gene konstruiert werden, deren C-terminaler Anteil für die Cofaktor-Bindedomäne der ADH105 und der N-terminale Anteil für die Substrat-Bindedomäne der ADH-*Lb* codiert. Der Unterschied zwischen den beiden Konstrukten besteht in dem Verhältnis von ADH105 und ADH-*Lb* (Tabelle 13). Die chimären Gene *adh-C1* und *adh-C2* konnten erfolgreich in Expressionsvektoren unter die Kontrolle von PT7_{lac} kloniert werden. In umfangreichen Versuchen wurden die optimalen Expressionsbedingungen für die chimären ADHs evaluiert (3.2.6). Eine Expression der Gene *adh-C1/2* bei 37 °C für 2 Stunden nach Induktion mit 0,4 mM IPTG in *E. coli* BL21 (DE3) lieferte die größten Mengen aktiven Proteins. Längere Expressionszeiten resultierten in massiver Bildung von *inclusion bodies*. Generell war die Proteinausbeute sehr gering. Durch quantitative RT-*real-time*-PCR konnte gezeigt werden, dass die geringen Proteinmengen nicht auf ein transkriptionelles Problem zurückzuführen sind. Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, erwiesen sich beide ADH-Chimären als relativ instabil und waren nach der Gewinnung der Rohextrakte nur für wenige Stunden aktiv. Weder durch bis auf 11 °C herabgesetzte Expressions-Temperaturen im kälteadaptierten Stamm *E. coli* ArcticExpress™ (DE3), noch durch Coexpression von Faltungsmediatoren zur Erhöhung des Anteils an löslichem Protein (TaKaRa-Chaperon-Kit) konnte eine Verbesserung erzielt werden.

SDS-PAGE Analysen zeigen, dass die chimären ADHs nicht oder nur in sehr geringem Umfang cytoplasmatisch degradiert werden. Der Grund für die Instabilität der ADH-C ist also im Protein selber zu suchen.

Beide ADHs sind in ihrer katalytisch aktiven Form Homo-Tetramere. Zur Ausbildung dieser Tetramere ist es essentiell, dass die monomeren Untereinheiten eine stabile Konformation einnehmen können. Einen großen Anteil an der strukturellen Stabilisierung der Monomere haben ionische Netzwerke, die Teile der Tertiärstruktur „umspannen“. Diese Netzwerke entstehen durch Wechselwirkungen zwischen polaren Aminosäureseitenketten, Wassermolekülen und strukturellen und/oder katalytischen Metallionen.

Die Mutation einer einzigen Position in einer tetrameren Sorbitol-Dehydrogenase führte zu einer Destabilisierung des ionischen Netzwerks, was nicht direkt in Strukturverlusten einer einzelnen Untereinheit, aber zu Störungen in der Dimerisierung zweier Untereinheiten und Tetramerisierung zweier Dimere resultierte (Hellgren *et al.*, 2007). Die Multimerisierung beruht auf der Interaktion von Teilen der Dimer-Oberflächen, hervorgerufen durch hydrophobe Interaktionen, Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken und/oder anderen ionischen Wechselwirkungen, beispielsweise über strukturell eingebundene Metall-Ionen (Mg^{2+} bei ADH-*Lb*) (Miller, 1989; Niefind *et al.*, 2003; Wongtrakul *et al.*, 2005). Dabei gilt der Grundsatz: je größer die Interaktionsfläche, desto (thermo-)stabiler das Protein (Korkhin *et al.*, 1999; Bogin *et al.*, 2002; Karlsson *et al.*, 2003).

Bei der Konstruktion der chimären ADHs wurden ein metallabhängiges und ein metallunabhängiges Protein miteinander kombiniert. Die mit dem Mg^{2+} -Ion interagierenden Aminosäure-Reste sind innerhalb der Substrat-Bindedomäne respektive am C-Terminus der ADH-*Lb* lokalisiert und in den beiden Chimären erhalten geblieben. Dort wird der „metallabhängige“ Teil des Proteins mit der Cofaktor-Bindedomäne eines nicht-metallabhängigen Enzyms fusioniert. Dieser Umstand kann zu einer Destabilisierung des ionischen Netzwerkes führen und dadurch die Dimerisierung zweier Untereinheiten negativ beeinflussen.

Die ADH105 ist ein Enzym aus einem thermophilen, die ADH-*Lb* aus einem mesophilen Organismus. Die unterschiedlichen Stabilitätsanforderungen an meso- und thermophile Enzyme beruhen auf struktur-stabilisierenden Wechselwirkungen sowohl innerhalb einer Untereinheit als auch zwischen den einzelnen Untereinheiten in einer Quartärstruktur bedingt teilweise durch unterschiedliche Mechanismen respektive Interaktionspartner (Bae & Phillips, 2004). Auch dieser Umstand kann zu einer Destabilisierung der Monomere und/oder zu einer Behinderung bei der Dimerisierung führen. Ebenso ist denkbar, dass durch die Kombination von zwei Primärstrukturen aus unterschiedlichen Habitaten aus vorgenannten Gründen hydrophobe Interaktionsflächen nicht im gleichen Maße ausgebildet werden können wie in den parental Proteinen. Auch dadurch kann es zu Beeinträchtigungen in der Multimerisierung kommen.

Trotz der geringen Stabilität war es möglich, biochemische Charakteristika für die chimären ADHs C1 und C2 aufzunehmen. Tabelle 14 kann man entnehmen, dass die chimären Proteine

ADH-C1 und ADH-C2 die Eigenschaften ihrer parentalen Proteine ADH105 und ADH-*Lb* in sich kombinieren.

ADH-C1/2 sind NAD-abhängig und zeigen eine geringe Aktivität mit NADP(H) (ca. 10 % im Vergleich zum NAD(H)). Dieses Verhalten entspricht den Erwartungen, da beide chimären ADHs die Cofaktor-Bindestelle der ADH105 besitzen, die NAD-abhängig ist und ebenfalls in geringem Umfang NADP(H) akzeptiert. Die K_m -Werte von ADH-C1/2 für NADH liegen in der gleichen Größenordnung wie bei der ADH105, die katalytische Effizienz ist bei der ADH-C2 bedingt durch die höheren Umsatzraten sogar gesteigert (Tabelle 15). Besonders erfreulich stellt sich das Substratspektrum der chimären ADHs dar. Die Akzeptanz für aromatische Substrate konnte durch den Einsatz der Substrat-Bindedomäne der ADH-*Lb* deutlich gesteigert werden. Insbesondere ADH-C2 akzeptiert Acetophenon deutlich besser als die ADH105. Die katalytische Effizienz von ADH-C1 im Vergleich zur ADH105 für das Substrat Acetophenon wurde um den Faktor 10, im Falle von ADH-C2 sogar um den Faktor 30 gesteigert (Tabelle 16). Dass die Akzeptanz für halogenierte Ketoester hingegen abnimmt, war zu erwarten. Der entscheidende Schritt zur Verbesserung des biokatalytischen Potentials liegt darin, dass beide chimären ADHs 2-Propanol als Substrat zur Cofaktor-Regenerierung akzeptieren. Die katalytische Effizienz mit dem Substrat 2-Propanol wurde im Fall von ADH-C2 um den Faktor 10 gesteigert.

Diese Optimierungen führen letztendlich dazu, dass beide chimären ADHs das Substrat Acetophenon mit dem Cofaktor NADH mit gesteigerten Produktbildungsraten im Vergleich zur ADH105 und zur ADH-*Lb* umsetzen.

Generell erweist sich ADH-C2 im Vergleich zu ADH-C1 als etwas aktiver. Ursächlich hierfür ist möglicherweise, dass die Erhöhung des ADH105-Anteils an der Cofaktor-Bindedomäne insgesamt zu einer Stabilisierung im angesprochenen Sinne beiträgt. Diese Struktur-Stabilisierung wirkt sich zwar nicht signifikant auf die Menge an löslichem Protein bei der Expression der entsprechenden Gene aus, kann aber unter Umständen dafür verantwortlich gemacht werden, dass sich bei der katalysierten Reaktion ein stabilerer Enzym-Cofaktor-Substrat-Komplex ausbildet, der durch gesteigerte katalytische Effizienz quantifizierbar wird.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Konstruktion von chimären Genen/Proteinen auf Grund von rationalen, d. h. Struktur-basierten Überlegungen durchaus erfolgreich sein kann. Aussagen über die Stabilität der Konstrukte können hingegen im Vorfeld kaum oder nur sehr pauschal getroffen werden. Möglicherweise kann ein zusätzlicher Stabilitätsfaktor über die Wahl von anderen Medien während der Kultivierung eingebracht werden. Von höchster Bedeutung für die Stabilität der Enzyme scheint aber die Aufrechterhaltung des ionischen Netzwerkes zu sein, durch das sowohl die Tertiär- als auch die Quartär-Struktur maßgeblich stabilisiert wird (Yutani *et al.*, 1985; Markossian & Kurganov, 2004; Hellgren *et al.*, 2007).

4.3 ADH-T: Änderung der Cofaktor-Spezifität von NADP zu NAD durch iterative Sättigungsmutagenese

Cofaktor-Spezifität ist eine wichtige Eigenschaft von NAD(P)-abhängigen Oxidoreduktasen, die direkt an die Funktion der Enzyme im Stoffwechsel der Zelle geknüpft ist. Da sich NAD und NADP strukturell nur durch den an 2'-Position an die Adenosinribose veresterten Phosphatrest unterscheiden (Abbildung 5), müssen Oxidoreduktasen über eine begrenzte Anzahl von Aminosäure-Resten verfügen, die die Präferenz für NAD oder NADP festlegen. Dieser Bereich befindet sich bei Dehydrogenasen in der Regel 20 – 25 Aminosäuren C-terminal des Glycin-reichen Konsensusmotives der Cofaktor-Bindedomäne innerhalb des Rossmann *folds*. Eine schematische Übersicht über die Architektur von Cofaktor-Bindetaschen in Dehydrogenasen bietet Abbildung 36.

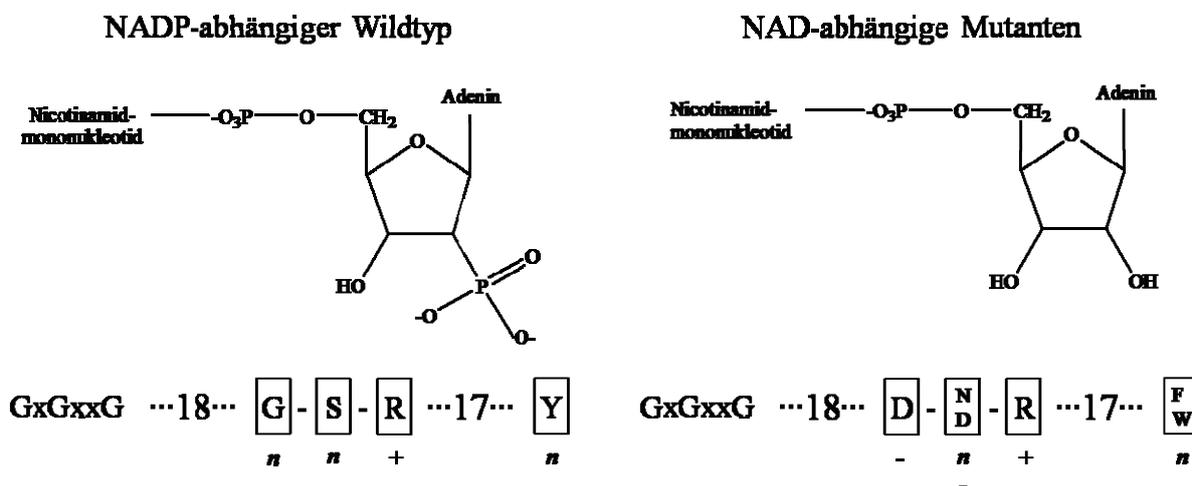


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Ladungsverteilung innerhalb der Nicotinamid-Cofaktor-Bindetaschen von ADH-T Wildtyp und Mutanten.

n = neutrale Aminosäure, + = positiv geladene Aminosäure, - = negativ geladene Aminosäure.

Diese Erkenntnis ist die Grundlage dafür, dass die Änderung der Cofaktor-Präferenz eines Enzyms idealerweise durch einen rational begründeten Ansatz erreicht werden kann. Um die Cofaktor-Präferenz einer Dehydrogenase von NADP in Richtung NAD zu verändern, reicht es hingegen meist nicht aus, eine positiv geladene Aminosäure in dem angesprochenen Bereich, die mit dem negativ geladenen Phosphatrest des NADP wechselwirkt, gegen eine negative Aminosäure auszutauschen. Dies führt zwar, wie auch am Beispiel der ADH-T in dieser Arbeit gezeigt wurde, zu einem Aktivitätsverlust, der auf eine elektrostatische Abstoßung zwischen Enzym und dem Cofaktor NADP beruht. Die Akzeptanz für den Cofaktor NAD wird in aller Regel dadurch nicht gesteigert. In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Strategien und Methoden publiziert, um die Cofaktor-Präferenz einer

Dehydrogenase zu ändern. Grundlage sind dabei Hinweise aus Mutagenese-Studien und 3D-Strukturuntersuchungen, die Aufschluss über die Bindungsmodalitäten des Cofaktors innerhalb des Rossmann *folds* liefern. In NAD-abhängigen Dehydrogenasen befindet sich in der Regel ein Asparaginsäure- oder Glutaminsäure-Rest am Ende des zweiten N-terminalen β -Faltblattes oder des darauffolgenden *loops*, der unmittelbar über die entsprechende Cofaktor-Präferenz diskriminiert (Bellamacina, 1996). Diese stark negative Region innerhalb des Rossmann *folds* ist für eine elektrostatische Abstoßung des negativen 2'-Phosphats des NADP verantwortlich. In NADP-abhängigen Enzymen befinden sich an gleicher Position in der Regel positiv geladene Aminosäuren (Arginin, Lysin, seltener Histidin), die eine ionische Wechselwirkung mit besagtem Phosphat-Rest eingehen. Basis für eine Änderung der Cofaktor-Spezifität ist stets eine ortsspezifische Mutagenese, bei der die direkten Interaktionspartner des 2'-Phosphats des NADP bzw. der 2'-OH-Funktion des NAD durch Aminosäuren anderer Größe oder entgegengesetzter Ladung ausgetauscht werden. (Rosell *et al.*, 2003; Leitgeb *et al.*, 2005; Petschacher *et al.*, 2005; Petschacher & Nidetzky, 2005; Watanabe *et al.*, 2005; Bubner *et al.*, 2008).

So ist es der Bubner *et al.* (2008) gelungen, durch 2 Aminosäure-Substitutionen eine NAD-abhängige Mannitol-2-Dehydrogenase in ein Enzym mit 10-fach gesteigerter Präferenz für NADP im Vergleich zu NAD zu verändern. Bei den Austausch handelt es sich um E68K und D69A. Beide Aminosäure-Reste sind im Wildtyp-Enzym stark negativ geladen. Durch Ladungsumkehr (E68K) und einen Austausch, bei dem die negative Aminosäure Asparaginsäure (van-der-Waals-Volumen 91 \AA^3) durch das viel kleinere und neutrale Alanin (67 \AA^3) ersetzt wurde, konnten sowohl elektrostatische als auch sterische Hindernisse für die Interaktion mit NADP beseitigt werden.

Rosell *et al.* (2003) gelang es, durch gezielte Mutation von drei aufeinander folgenden Aminosäuren eine NADP-abhängige *medium-chain* ADH aus dem iberischen Wasserfrosch *Rana perezi* NAD-abhängig zu machen. Die erreichte katalytische Effizienz der Mutante mit NAD entsprach jener des Wildtyps mit NADP. Bei den eingebrachten Mutationen handelte es sich um G223D (neutral \rightarrow negativ), T224I (polar, van-der-Waals-Volumen $91 \text{ \AA}^3 \rightarrow$ unpolar, van-der-Waals-Volumen 124 \AA^3) und H225N (positiv \rightarrow neutral). Es wurde eine negative Ladung eingebracht, die den 2'-Phosphat-Rest des NADP elektrostatisch abstößt, eine größere, unpolare Aminosäure sorgt zudem für eine sterische Behinderung des NADP. Durch die Mutation H225N wird die über die Cofaktor-Präferenz diskriminierende Region zusätzlich „entladen“ und stabilisiert dadurch den Cofaktor NAD(H).

Liang *et al.* (2007) gelang es, die Cofaktor-Präferenz der *Pichia stipitis* Xylose Reductase, die sowohl NAD als auch NADP akzeptiert, mittels CASTing in Richtung NAD-Abhängigkeit zu verschieben. Die in drei aufeinanderfolgenden Mutageneserunden erzeugte Variante (K270S, S271G, N272P, R276F) hat einen herabgesetzten Anteil hydrophiler Aminosäurereste innerhalb der Cofaktor-Bindetasche und die als direkter Interaktionspartner des 2'-Phosphat-

Rest vorhergesagte Aminosäure R276 wurde gegen das ungeladene und sterisch sperrigere Phenylalanin ausgetauscht.

Auch in der vorliegenden Arbeit sollte die Cofaktor-Spezifität einer *medium-chain* ADH von NADP in Richtung NAD geändert werden. Im Unterschied dem vorher beschriebenen Ansatz (Liang *et al.*, 2007) akzeptiert die ADH-T den Cofaktor NAD(H) überhaupt nicht. Um eine NAD-Präferenz zu erzeugen, wurde eine iterative Sättigungsmutagenese (Reetz & Carballeira, 2007) durchgeführt, die auf einer kartesischen Betrachtung der über die Cofaktor-Präferenz diskriminierenden Aminosäure (R200) im Rossmann *fold* der ADH-T beruht. Diese Methode bietet zwei entscheidende Vorteile:

(1) Die Sättigungsmutagenese wird mit Oligonukleotiden, die degenerierte Codons enthalten, durchgeführt (Tabelle 18). Dadurch wird erreicht, dass mit relativ geringem Aufwand an jeder zu mutagenisierenden Position die betreffende Aminosäure gegen jede andere ausgetauscht wird. Durch die einzelne Betrachtung der erzeugten Bibliotheken und die anschließende Kombination der sich im Sinne der gewünschten Eigenschaft am vorteilhaftesten entwickelten Mutante, wird ein iterativer Effekt erzeugt. Je nach Anzahl der zu mutagenisierenden Positionen kann durch die Auswahl einer anderen Codon-Degenerierung der Screening-Aufwand deutlich vermindert werden. Die Verwendung eines NNK-Codons, welches für die volle Abdeckung mit allen 20 Aminosäuren codiert, ist nicht in allen Fällen erforderlich (Reetz *et al.*, 2006b; Reetz *et al.*, 2006c). Nichtsdestotrotz steigt die Möglichkeit, eine verbesserte Variante zu finden, mit einer größeren Abdeckung an.

(2) Durch die kartesische Betrachtung der über die Cofaktor-Präferenz diskriminierenden Aminosäure im Rossmann *fold* der ADH-T werden nicht nur direkt aufeinanderfolgende Positionen Ziel der Mutagenese. Gestützt durch die 3D-Struktur der hoch-homologen ADH aus *Thermoanaerobacter brockii* (Korkhin *et al.*, 1998) wurden in der Primärstruktur der ADH-T die Positionen G198, S199 (Bibliothek A), R200 (Bibliothek B) und Y218 (Bibliothek C) als Ziele der iterativen Sättigungsmutagenese identifiziert (Abbildung 30).

Im Ergebnis konnte keine Mutante in Bibliothek B und C identifiziert werden, die für sich alleine betrachtet eine im Vergleich zum Wildtyp gesteigerte Aktivität mit NAD(H) als Cofaktor aufweist. Speziell für Bibliothek B (R200) entspricht dieses Ergebnis nicht unbedingt den Erwartungen, aber offensichtlich ist diese Position absolut essentiell für die Funktionalität des Enzyms ist (3.3.2) und kann nicht variiert werden.

Aus Bibliothek A konnten zwei Mutanten identifiziert werden, die eine im Vergleich zum Wildtyp gesteigerte Aktivität mit NAD(H) als Cofaktor aufweisen. Dabei handelt es sich um Klone mit den Mutationen

A₁ G198D und S199N sowie

A₂ G198D und S199D.

Im Falle von A_1 wurde das neutrale G198 durch einen negativ geladenen Asparaginsäure-Rest ersetzt. An Position des S199 fand zwar keine Ladungsänderung aber ein Austausch durch die ca. 30 % größere Aminosäure Asparagin statt. Das van-der-Waals-Volumen von Serin beträgt 73 \AA^3 , das von Asparagin 96 \AA^3 . Bei Mutante A_2 wurde ebenfalls an Position S199 eine negative Ladung durch Austausch gegen Asparaginsäure eingebracht. Bei beiden Mutanten wurde die Präferenz für NADP durch das Einbringen negativer Ladungen und/oder einer sterischen Behinderung durch größere Aminosäuren gesenkt. Gleichzeitig wurde die Akzeptanz von NADH erhöht. Die K_m -Werte der Mutanten für den Cofaktor NAD entsprechen denen des Wildtyp-Enzyms für NADP (Tabelle 19).

Diese Mutationen aus Bibliothek A wurden mit den Bibliotheken B und C kombiniert. Es konnten wiederum zwei Klone identifiziert werden, die eine gesteigerte Aktivität im Vergleich zu den Klonen der Bibliothek A aufwiesen. Beide Mutationen wurden in Bibliothek C erzeugt. Dabei handelt es sich um die Klone:

A_1C_1 $A_1 + Y218W$ sowie

A_1C_2 $A_1 + Y218F$.

Interessanterweise wurden Mutanten identifiziert, bei denen an Position Y218 die aromatische Aminosäure Tyrosin durch ebenfalls aromatische Aminosäuren ($C_1 =$ Tryptophan, $C_2 =$ Phenylalanin) ausgetauscht wurde. Eine Präferenz für NAD über NADP wurde in diesen Fällen möglicherweise über sterische Behinderungen durch die Inkorporation des größeren Tryptophans bzw. durch eine Abschwächung der ionischen Wechselwirkungen durch das unpolare Phenylalanin erreicht.

Insgesamt ist die iterative Sättigungsmutagenese ein sehr effektives Werkzeug zur Optimierung von Enzymen. Der darwinistische Charakter der *in vitro* Evolution bleibt teilweise erhalten, die Menge der Klone, die durchmustert werden müssen wird hingegen durch die Integration der ortsspezifischen Komponente signifikant reduziert. Letztendlich bleibt die Mutagenese auf einen sehr kleinen Bereich des Proteins beschränkt. Eine im Anschluss durchzuführende *in vitro* Evolution, die das komplette Gen einbezieht, könnte Mutationen erzeugen, die über "remote-Effekte" eine weitere Steigerung der Aktivität bewirken. Dabei handelt es sich um Mutationen, die einen Effekt ausüben, obwohl sie keine direkten Interaktionspartner z. B. des Substrats sind (Murkin *et al.*, 2007; Ghanem *et al.*, 2008; Saen-Oon *et al.*, 2008).

5 Zusammenfassung / Summary

Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch unterschiedliche Vorgehensweisen sowohl neue putative Biokatalysatoren identifiziert als auch bereits etablierte Enzyme in Bezug auf die Prozesse, in denen sie eingesetzt werden, optimiert werden.

(1) Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung neuer putativer Biokatalysatoren innerhalb einer Metagenom-Bibliothek. Die Identifizierung dieser Biokatalysatoren sollte in einem speziell entwickelten Aktivitäts-Screening stattfinden, der Focus lag dabei auf Dehydrogenase-Aktivität. Die metagenomische DNA, die zur heterologen Expression in *E. coli* in geeignete Plasmide kloniert wurde, entstammt einer Anreicherungskultur, die über einen Zeitraum von ca. 2 Monaten mit 2-Hexanol inkubiert wurde. Durch diese Anreicherung sollte die Frequenz von Oxidoreduktase-Genen innerhalb des DNA-Pools erhöht werden. Insgesamt umfasst die Metagenom-Bibliothek nur ca. 1000 Klone. Die durchschnittliche Insertgröße der metagenomischen DNA-Fragmente in den Expressionsplasmiden war mit 2,4 kb ebenfalls eher gering. Dennoch ist es durch den Einsatz eines geeigneten photometrischen Assays gelungen, das Gen einer putativen Oxidoreduktase zu identifizieren und zu isolieren. Nach Klonierung und Expression des Gens *orm1* wurde das Genprodukt biochemisch beschrieben.

(2) Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Konstruktion von chimären ADHs. Basierend auf den Sekundärstrukturvorhersagen der thermophilen ADH105 und der ADH-*Lb* aus *Lactobacillus brevis*, zweier *short-chain* ADHs, wurden *in silico* zwei synthetische chimäre ADHs entwickelt, die die biokatalytisch relevanten Eigenschaften der parentalen ADHs miteinander kombinieren sollten. Dabei handelt es sich konkret um die NAD-Abhängigkeit der ADH105 und das Substratspektrum, speziell die 2-Propanol-Akzeptanz zur Cofaktorregenerierung der ADH-*Lb*. Die chimären *adh*-Gene wurden durch *overlap extension* PCR erzeugt, kloniert und einer aufwändigen Expressionsanalytik inkl. RT-*real time*-PCR unterzogen. Dabei erwies sich die Enzymstabilität als kritischer Faktor. Die schlechte Stabilität der chimären Proteine wird dabei möglicherweise durch eine Störung des ionischen Netzwerkes, durch das die Tertiärstruktur stabilisiert wird, sowie mangelnde Interaktionsflächen bei der Multimerisierung der Enzym-Untereinheiten verursacht. Durch die Aufnahme kinetischer Konstanten und die GC-Analyse enzymatisch katalysierter Umsetzungen konnte dennoch gezeigt werden, dass die synthetischen ADHs die Eigenschaften der parentalen Proteine miteinander kombinieren. Beide ADH-Chimäre sind NAD-abhängige Enzyme mit erweitertem Substratspektrum und akzeptieren 2-Propanol zur Coenzym-Regenerierung.

(3) Der letzte Teil dieser Arbeit behandelt die Änderung der Coenzym-Spezifität der 2° ADH aus *Thermoanaerobacter* sp. Diese Änderung sollte erstmals durch eine iterative Sättigungsmutagenese erreicht werden. Die ADH-*T* ist ein strikt NADP-abhängiges Enzym. Durch kartesische Betrachtungen der Cofaktor-Bindestelle der ADH-*T*, basierend auf der hoch aufgelösten 3D-Struktur der zu 93 % homologen ADH aus *T. Brockii*, wurden 3 Aminosäurepositionen identifiziert, die mit dem negativen Phosphatrest des NADP(H)s wechselwirken. Um die Coenzym-Spezifität von NADP in Richtung NAD zu verschieben, wurden diese Positionen einer iterativen Sättigungsmutagenese unterzogen. Insgesamt wurden in einem speziell entwickelten *high throughput* Screening in mehreren aufeinander folgenden Mutageneserunden ca. 10.000 Klone auf ihre Aktivität mit NADH untersucht. Die *adh-T*-Gene der 4 aktivsten Mutanten wurden sequenziert und katalytische Konstanten in Bezug auf das Coenzym NAD(H) aufgenommen. Des Weiteren wurden mit den Mutanten und NADH als Coenzym kontinuierliche Umsetzungen von prochiralen Ketonen zu chiralen Alkoholen durchgeführt und die Produktbildung auf ihren Enantiomerenüberschuss hin durch GC-Analyse untersucht. Es ist für die ADH-*T* gelungen, die Coenzym-Spezifität komplett von NADP zu NAD zu ändern, ohne dass es zu Beeinträchtigungen in der Stabilität und Stereoselektivität der Enzyme kommt. Die katalytische Effizienz der NAD-abhängigen Mutanten übersteigt teilweise sogar diejenige der wildtypischen ADH-*T* mit NADP.

This work expatiates upon the identification of novel putative biocatalysts as well as the improvement of already established enzymes, which are used in white biotechnology. Therefore, three different strategies have been elaborated.

(1) The activity-based identification of novel putative biocatalysts within a metagenomic library was the first aim of this study. The specifically adapted assay focuses on dehydrogenase activity. Metagenomic DNA-fragments, originating from an enrichment culture which was incubated for two months with 2-hexanol, were cloned into suitable expression vectors. The intention of the enrichment culture was to enhance the oxidoreductase frequency in the habitat. The overall library dimension includes about 1,000 clones with an average metagenomic-DNA-insert size of 2.4 kb. Despite the small library volume (2.4 Mbp), a novel putative oxidoreductase gene *orm1* could be identified due to its activity. After isolation, cloning and expression of *orm1*, the related protein was biochemically analysed.

(2) The second part of this work deals with the construction of chimeric short-chain ADHs. To combine the biocatalytically desirable properties of the thermophilic ADH105 and ADH-*Lb* from *Lactobacillus brevis*, two synthetic chimeric ADHs were designed *in silico* based on the secondary structure prediction of both parental proteins. These properties are the NAD-dependency of ADH105 as well as the activity and substrate spectra, especially the 2-propanol acceptance for cofactor regeneration, of ADH-*Lb*. The chimeric *adh*-genes were constructed by overlap extension PCR and cloned into suitable expression vectors. Expression and stability analysis including RT-real-time-PCR revealed, that the chimeric genes were expressed in high levels and that the translated proteins were relatively instable. Maybe this instability was caused by a destabilization of the ionic and hydrophobic network, which is responsible for tertiary and quaternary structure. Nevertheless, biochemical properties of the chimeric ADHs could be obtained: it could be shown that both synthetic ADHs combine the properties of the parental enzymes, which means that they were NAD-dependent enzymes with an expanded substrate spectra including 2-propanol acceptance.

(3) The last part of this work focuses on the change in cofactor-specificity of the strictly NADP-dependent *Thermoanaerobacter* sp. 2° ADH-*T*, which is 93 % homologous to ADH-*Tb* of *Thermoanaerobacter brockii*. Therefore, iterative saturation mutagenesis, which relies on a Cartesian analysis of 3D protein structure, was performed with three amino acid positions interacting directly with the negatively charged phosphate moiety of NADP. More than 10,000 clones were screened after three consecutive mutagenesis circles in an especially adapted and automated photometrical assay to identify mutants active with NAD as cofactor. The four most active mutants were isolated and biochemically characterized. The cofactor-specificity could be changed from NADP to NAD without altering the stability and stereo-selectivity. Moreover, the catalytic efficiency of the NAD-dependent mutants partially exceeds the wildtype enzyme efficiency with NADP.

Literaturverzeichnis

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* **25**, 3389-3402.

Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* **59**, 143-169.

Andreadeli, A., Platis, D., Tishkov, V., Popov, V. & Labrou, N. E. (2008). Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP⁺. *The FEBS journal* **275**, 3859-3869.

Bachmann, R. (2003). McKinsey & Company: Industrial biotech - new value-creation opportunities. *Bio Conference, New York*.

Bae, E. & Phillips, G. N., Jr. (2004). Structures and analysis of highly homologous psychrophilic, mesophilic, and thermophilic adenylate kinases. *J Biol Chem* **279**, 28202-28208.

Barthelmes, J., Ebeling, C., Chang, A., Schomburg, I. & Schomburg, D. (2007). BRENDA, AMENDA and FRENDA: the enzyme information system in 2007. *Nucleic Acids Res* **35**, D511-514.

Bellamacina, C. R. (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *Faseb J* **10**, 1257-1269.

Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C. & Sarma, V. R. (1965). Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* **206**, 757-761.

Bogin, O., Peretz, M. & Burstein, Y. (1997). *Thermoanaerobacter brockii* alcohol dehydrogenase: Characterization of the active site metal and its ligand amino acids. *Protein Science* **6**, 450-458.

Bogin, O., Levin, I., Hacham, Y., Tel-Or, S., Peretz, M., Frolov, F. & Burstein, Y. (2002). Structural basis for the enhanced thermal stability of alcohol dehydrogenase mutants from the mesophilic bacterium *Clostridium beijerinckii*: contribution of salt bridging. *Protein Science* **11**, 2561-2574.

Bornscheuer, U. T. (2005). Trends and challenges in enzyme technology. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **100**, 181-203.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Brändén, C., Jörnvall, H., Eklund, H. & Furugren, B. (1975). *The Enzymes (3rd Edition)* **11**, 103-190.

Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Kessler, M., Sturmer, R. & Zelinski, T. (2004). Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chem-Int Edit* **43**, 788-824.

Bryant, F., Wiegel, J. & Ljungdahl, L. (1988). Purification and properties of primary and secondary alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 460.

Bubner, P., Klimacek, M. & Nidetzky, B. (2008). Structure-guided engineering of the coenzyme specificity of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase to enable efficient utilization of NAD(H) and NADP(H). *FEBS Lett* **582**, 233-237.

Buchner, E. (1897). Über alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*.

Burdette, D. S., Secundo, F., Phillips, R. S., Dong, J., Scott, R. A. & Zeikus, J. G. (1997). Biophysical and mutagenic analysis of *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary alcohol dehydrogenase activity and specificity. *Biochemical Journal* **326**, 717-724.

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

Cadwell, R. & Joyce, G. (1992). Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl* **2**, 28-33.

Cadwell, R. & Joyce, G. (1995). Mutagenic PCR. In: *Dieffenbach CH, Dveksler GS (eds) PCR primer: a laboratory manual CSHL Press, Cold Spring Harbor*, 583.

Carugo, O. & Argos, P. (1997). NADP-dependent enzymes. I: Conserved stereochemistry of cofactor binding. *Proteins* **28**, 10-28.

Chenault, H. K. & Whitesides, G. M. (1987). Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Applied biochemistry and biotechnology* **14**, 147-197.

Clarke, A. R., Atkinson, T. & Holbrook, J. J. (1989a). From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part I. *Trends in biochemical sciences* **14**, 101-105.

Clarke, A. R., Atkinson, T. & Holbrook, J. J. (1989b). From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part II. *Trends in biochemical sciences* **14**, 145-148.

Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W. & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3240-3244.

Cowan, D. A. (2000). Microbial genomes - the untapped resource. *Trends Biotechnol* **18**, 14-16.

- de Réaumur, R. A. F. (1752).** Observations sur la digestion des oiseaux. *Histoire de l'Académie royale des sciences* **266**, 461.
- Dedonder, R. (1953).** Study of glycolysis in certain bacteria of the genus *Bacillus*. I. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic dehydrogenase in *Bacillus subtilis* and *Bacillus megatherium*. *Annales de l'Institut Pasteur* **85**, 71-81.
- Dickinson, F. M. & Monger, G. P. (1973).** A study of the kinetics and mechanism of yeast alcohol dehydrogenase with a variety of substrates. *The Biochemical journal* **131**, 261-270.
- Doyle, S. A., Fung, S. Y. & Koshland, D. E., Jr. (2000).** Redesigning the substrate specificity of an enzyme: isocitrate dehydrogenase. *Biochemistry* **39**, 14348-14355.
- Duine, J. A. (1991).** Cofactor engineering. *Trends Biotechnol* **9**, 343-346.
- Eklund, H., Branden, C. I. & Jornvall, H. (1976a).** Structural comparisons of mammalian, yeast and bacillar alcohol dehydrogenases. *Journal of molecular biology* **102**, 61-73.
- Eklund, H., Nordstrom, B., Zeppezauer, E. & other authors (1976b).** Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2-4 Å resolution. *Journal of molecular biology* **102**, 27-59.
- Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T. & Streit, W. R. (2001).** Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol* **67**, 89-99.
- FDA (1992).** Food and Drug Administration's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality* **4**, 338-340.
- Fersht, A. R. (1985).** Enzyme Structure and Mechanism (2nd Edition). *W H Freeman & Co, New York* 50-52.
- Filling, U. C., Hult, U. M., Shafqat, U. N. & other authors (2003).** Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-biological interactions* **143**, 247-253.
- Fischer, E. (1894).** Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **27**, 2985-2993.
- Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schodl, T., Heitzer, M. & Hegemann, P. (2004).** Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant molecular biology* **55**, 869-881.
- Ghanem, M., Li, L., Wing, C. & Schramm, V. L. (2008).** Altered thermodynamics from remote mutations altering human toward bovine purine nucleoside phosphorylase. *Biochemistry* **47**, 2559-2564.
- Gillespie, D. E., Brady, S. F., Bettermann, A. D., Cianciotto, N. P., Liles, M. R., Rondon, M. R., Clardy, J., Goodman, R. M. & Handelsman, J. (2002).** Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4301-4306.

- Goldberg, K., Schroer, K., Lutz, S. & Liese, A. (2007a).** Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part II: whole-cell reductions. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 249-255.
- Goldberg, K., Schroer, K., Lutz, S. & Liese, A. (2007b).** Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part I: processes with isolated enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 237-248.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. & Goodman, R. M. (1998).** Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* **5**, R245-249.
- Hellgren, M., Kaiser, C., de Haij, S., Norberg, A. & Hoog, J. O. (2007).** A hydrogen-bonding network in mammalian sorbitol dehydrogenase stabilizes the tetrameric state and is essential for the catalytic power. *Cell Mol Life Sci* **64**, 3129-3138.
- Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R. A. & Gottschalk, G. (1999).** Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3901-3907.
- Henning, H., Leggewie, C., Pohl, M., Muller, M., Eggert, T. & Jaeger, K. E. (2006).** Identification of novel benzoylformate decarboxylases by growth selection. *Appl Environ Microbiol* **72**, 7510-7517.
- Herrera, E., Zorzano, A. & Fresneda, V. (1983).** Comparative kinetics of human and rat liver alcohol dehydrogenase. *Biochem Soc Trans* **11**, 729-730.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Hochuli, E., Dobeli, H. & Schacher, A. (1987).** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* **411**, 177-184.
- Hummel, W. (1997).** New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **58**, 145-184.
- IUBMB (1992).** Enzyme Nomenclature (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*). Academic Press, San Diego, California.
- Johannes, T. W. & Zhao, H. (2006).** Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Current opinion in microbiology* **9**, 261-267.
- Jones, D. T. (1999).** Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* **292**, 195-202.

Jornvall, H., Persson, B. & Jeffery, J. (1987). Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *Eur J Biochem* **167**, 195-201.

Jörnvall, H., Hoog, J. O. & Persson, B. (1999). SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett* **445**, 261-264.

Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**, 6003-6013.

Karlsson, A., El-Ahmad, M., Johansson, K., Shafqat, J., Jornvall, H., Eklund, H. & Ramaswamy, S. (2003). Tetrameric NAD-dependent alcohol dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions* **143**, 239-245.

Kataoka, K., Takada, H., Tanizawa, K., Yoshimura, T., Esaki, N., Ohshima, T. & Soda, K. (1994). Construction and characterization of chimeric enzyme consisting of an amino-terminal domain of phenylalanine dehydrogenase and a carboxy-terminal domain of leucine dehydrogenase. *J Biochem* **116**, 931-936.

Kataoka, M., Kita, K., Wada, M., Yasohara, Y., Hasegawa, J. & Shimizu, S. (2003). Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 437-445.

Kinoshita, S., Kakizono, T., Kadota, K., Das, K. & Taguchi, H. (1985). Purification of two alcohol dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* and their properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **22**, 249-254.

Kluge, F. (2002). Etymologisches Wörterbuch der deutschen Sprache *Gruyter Verlag*.

Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A. & Daniel, R. (2003a). Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1408-1416.

Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A. & Daniel, R. (2003b). Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **5**, 46-56.

Korkhin, Y., Frolow, F., Bogin, O., Peretz, M., Kalb, A. J. & Burstein, Y. (1996). Crystalline alcohol dehydrogenases from the mesophilic bacterium *Clostridium beijerinckii* and the thermophilic bacterium *Thermoanaerobium brockii*: Preparation, characterization and molecular symmetry. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **52**, 882-886.

Korkhin, Y., Kalb, A. J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y. & Frolow, F. (1998). NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: Crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *Journal of molecular biology* **278**, 967-981.

- Korkhin, Y., Kalb, A. J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y. & Frolow, E. (1999).** Oligomeric integrity - The structural key to thermal stability in bacterial alcohol dehydrogenases. *Protein Science* **8**, 1241-1249.
- Koshland, D. E. (1958).** Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **44**, 98-104.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P. & other authors (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Lawrence, S. (2008).** 2007- a banner year for biotech. *Nature biotechnology* **26**, 150.
- Leggewie, C., Henning, H., Schmeisser, C., Streit, W. R. & Jaeger, K. E. (2006).** A novel transposon for functional expression of DNA libraries. *J Biotechnol* **123**, 281-287.
- Leitgeb, S., Petschacher, B., Wilson, D. K. & Nidetzky, B. (2005).** Fine tuning of coenzyme specificity in family 2 aldo-keto reductases revealed by crystal structures of the Lys-274-->Arg mutant of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) bound to NAD⁺ and NADP⁺. *FEBS Lett* **579**, 763-767.
- Li, C. M., Heatwole, J., Soelaiman, S. & Shoham, M. (1999).** Crystal structure of a thermophilic alcohol dehydrogenase substrate complex suggests determinants of substrate specificity and thermostability. *Proteins-Structure Function and Genetics* **37**, 619-627.
- Liang, L., Zhang, J. & Lin, Z. (2007).** Altering coenzyme specificity of *Pichia stipitis* xylose reductase by the semi-rational approach CASTing. *Microbial cell factories* **6**, 36.
- Liebecq, C. (1997).** IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) and Nomenclature Committee of IUBMB (NC-IUBMB). *Biochemistry and molecular biology international* **43**, 1151-1156.
- Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. & Jaeger, K.-E. (2000).** Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem Biol* **7**, 709-718.
- Liu, W. & Wang, P. (2007).** Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnology advances* **25**, 369-384.
- Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F. & Eck, J. (2002).** Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 572-577.
- Lorenz, P. & Eck, J. (2005).** Metagenomics and industrial applications. *Nature reviews* **3**, 510-516.
- Lowry, O. H. & Carter, J. G. (1974).** Stabilizing the alkali-generated fluorescent derivatives of NAD and NADP. *Anal Biochem* **59**, 639-642.

- Markossian, K. A. & Kurganov, B. I. (2004).** Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggresomes. *Biochemistry (Mosc)* **69**, 971-984.
- Matsumura, I. & Ellington, A. D. (2001).** *In vitro* evolution of beta-glucuronidase into a beta-galactosidase proceeds through non-specific intermediates. *Journal of molecular biology* **305**, 331-339.
- McGuffin, L. J., Bryson, K. & Jones, D. T. (2000).** The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404-405.
- Mesentsev, A. V., Ustinnikova, T. B., Popov, V. O., Lamzin, V. S. & Tishkov, V. I. (1997).** Effect of pH on kinetic parameters of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *The Biochemical journal* **321 (Pt 2)**, 475-480.
- Miller, S. (1989).** The structure of interfaces between subunits of dimeric and tetrameric proteins. *Protein Eng* **3**, 77-83.
- Müller, M. (2005).** Chemoenzymatic synthesis of building blocks for statin side chains. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 362-365.
- Muller, M., Wolberg, M., Schubert, T. & Hummel, W. (2005).** Enzyme-catalyzed regio- and enantioselective ketone reductions. In *Technology Transfer in Biotechnology: From Lab to Industry to Production*, pp. 261-287.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Murkin, A. S., Birck, M. R., Rinaldo-Matthis, A., Shi, W., Taylor, E. A., Almo, S. C. & Schramm, V. L. (2007).** Neighboring group participation in the transition state of human purine nucleoside phosphorylase. *Biochemistry* **46**, 5038-5049.
- Neet, K. E. (1998).** Enzyme catalytic power minireview series. *J Biol Chem* **273**, 25527-25528.
- Niefind, K., Riebel, B., Muller, J., Hummel, W. & Schomburg, D. (2000).** Crystallization and preliminary characterization of crystals of *R*-alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **56**, 1696-1698.
- Niefind, K., Muller, J., Riebel, B., Hummel, W. & Schomburg, D. (2003).** The crystal structure of *R*-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* suggests the structural basis of its metal dependency. *Journal of molecular biology* **327**, 317-328.
- O'Brien, M. & Vanasse, B. (2000).** Asymmetric processes in the large-scale preparation of chiral drug candidates. *Curr Opin Drug Discov Dev* **3**, 793 - 806.
- Obradovic, Z., Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., Brown, C. J. & Dunker, A. K. (2003).** Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence. *Proteins* **53 Suppl 6**, 566-572.
- Opperman, D. J., Piater, L. A. & van Heerden, E. (2008).** A novel chromate reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 related to old yellow enzyme. *J Bacteriol* **190**, 3076-3082.

- Ostermeier, M. & Benkovic, S. J. (1999).** Finding Cinderella's slipper - proteins that fit. *Nature biotechnology* **17**, 639-640.
- Ostermeier, M., Nixon, A. E. & Benkovic, S. J. (1999a).** Incremental truncation as a strategy in the engineering of novel biocatalysts. *Bioorg Med Chem* **7**, 2139-2144.
- Ostermeier, M., Nixon, A. E., Shim, J. H. & Benkovic, S. J. (1999b).** Combinatorial protein engineering by incremental truncation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3562-3567.
- Ostermeier, M., Shim, J. H. & Benkovic, S. J. (1999c).** A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nature biotechnology* **17**, 1205-1209.
- Patel, R., Hanson, R., Goswami, A. & other authors (2003).** Enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **30**, 252-259.
- Patel, R. N. (2003).** Microbial/enzymatic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. *Curr Opin Drug Discov Devel* **6**, 902-920.
- Patel, R. N. (2006).** Biocatalysis: synthesis of chiral intermediates for drugs. *Curr Opin Drug Discov Devel* **9**, 741-764.
- Peretz, M. & Burstein, Y. (1989).** Amino-Acid Sequence of Alcohol-Dehydrogenase from the Thermophilic Bacterium *Thermoanaerobium Brockii*. *Biochemistry* **28**, 6549-6555.
- Perozich, J., Hempel, J., Kuo, I. & Lindahl, R. (2001).** Coenzyme specificity in aldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact* **130-132**, 115-124.
- Persson, B., Kallberg, Y., Oppermann, U. & Jörnvall, H. (2003).** Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact* **143-144**, 271-278.
- Persson, M., Mansson, M. O., Bulow, L. & Mosbach, K. (1991).** Continuous regeneration of NAD(H) covalently bound to a cysteine genetically engineered into glucose dehydrogenase. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **9**, 280-284.
- Petschacher, B., Leitgeb, S., Kavanagh, K. L., Wilson, D. K. & Nidetzky, B. (2005).** The coenzyme specificity of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) explored by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography. *The Biochemical journal* **385**, 75-83.
- Petschacher, B. & Nidetzky, B. (2005).** Engineering *Candida tenuis* Xylose reductase for improved utilization of NADH: antagonistic effects of multiple side chain replacements and performance of site-directed mutants under simulated *in vivo* conditions. *Appl Environ Microbiol* **71**, 6390-6393.
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004).** UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612.
- Petterson, G. (1987).** Liver alcohol dehydrogenase. *CRC critical reviews in biochemistry* **21**, 349-389.

Pettersson, G. & Eklund, H. (1987). Electrostatic effects of bound NADH and NAD⁺ on ionizing groups in liver alcohol dehydrogenase. *Eur J Biochem* **165**, 157-161.

Pletnev, V. Z., Weeks, C. M. & Duax, W. L. (2004). Rational proteomics II: Electrostatic nature of cofactor preference in the short-chain oxidoreductase (SCOR) enzyme family. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **57**, 294-301.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.

Radivojac, P., Obradovic, Z., Smith, D. K., Zhu, G., Vucetic, S., Brown, C. J., Lawson, J. D. & Dunker, A. K. (2004). Protein flexibility and intrinsic disorder. *Protein Sci* **13**, 71-80.

Radivojac, P., Iakoucheva, L. M., Oldfield, C. J., Obradovic, Z., Uversky, V. N. & Dunker, A. K. (2007). Intrinsic disorder and functional proteomics. *Biophysical journal* **92**, 1439-1456.

Radzicka, A. & Wolfenden, R. (1995). A proficient enzyme. *Science* **267**, 90-93.

Rao, S. T. & Rossmann, M. G. (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *Journal of molecular biology* **76**, 241-256.

Rasor, J. P. & Voss, E. (2001). Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Applied Catalysis A: General* **221**, 145-158.

Reetz, M. T., Bocola, M., Carballeira, J. D., Zha, D. & Vogel, A. (2005). Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 4192-4196.

Reetz, M. T., Carballeira, J. D., Peyralans, J., Hobenreich, H., Maichele, A. & Vogel, A. (2006a). Expanding the substrate scope of enzymes: combining mutations obtained by CASTing. *Chemistry* **12**, 6031-6038.

Reetz, M. T., Carballeira, J. D. & Vogel, A. (2006b). Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 7745-7751.

Reetz, M. T., Wang, L. W. & Bocola, M. (2006c). Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 1236-1241.

Reetz, M. T. & Carballeira, J. D. (2007). Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat Protoc* **2**, 891-903.

Reetz, M. T., Puls, M., Carballeira, J. D., Vogel, A., Jaeger, K.-E., Eggert, T., Thiel, W., Bocola, M. & Otte, N. (2007). Learning from directed evolution: Further lessons from theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *ChemBiochem* **8**, 106-112.

Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D. & other authors (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2541-2547.

Rosell, A., Valencia, E., Ochoa, W. F., Fita, I., Pares, X. & Farres, J. (2003). Complete reversal of coenzyme specificity by concerted mutation of three consecutive residues in alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem* **278**, 40573-40580.

Rossmann, M. G., Moras, D. & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**, 194-199.

Rossmann, M. G., Liljas, A., Brändén, C. I. & Banaszak, L. J. (1975). *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) 3rd Edition. **11**, 61-102.

Rossmann, M. G. & Argos, P. (1978). The taxonomy of binding sites in proteins. *Molecular and cellular biochemistry* **21**, 161-182.

Rossmann, M. G. & Argos, P. (1981). Protein folding. *Annual review of biochemistry* **50**, 497-532.

Rouhi, A. M. (2004). Chiral chemistry. *Chem Eng News* **82**, 47-+.

Saen-Oon, S., Ghanem, M., Schramm, V. L. & Schwartz, S. D. (2008). Remote mutations and active site dynamics correlate with catalytic properties of purine nucleoside phosphorylase. *Biophysical journal* **94**, 4078-4088.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schlieben, N. H., Niefind, K., Muller, J., Riebel, B., Hummel, W. & Schomburg, D. (2005). Atomic resolution structures of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* provide the structural bases of its substrate and cosubstrate specificity. *Journal of molecular biology* **349**, 801-813.

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

Schoemaker, H. E., Mink, D. & Wubbolts, M. G. (2003). Dispelling the myths - biocatalysis in industrial synthesis. *Science* **299**, 1694-1697.

Schroer, K., Mackfeld, U., Tan, I. A. & other authors (2007). Continuous asymmetric ketone reduction processes with recombinant *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* **132**, 438-444.

Schwecke, T., Aparicio, J. F., Molnar, I. & other authors (1995). The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7839-7843.

- Scrutton, N. S., Berry, A. & Perham, R. N. (1990).** Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* **343**, 38-43.
- Seebeck, F. P. & Hilvert, D. (2003).** Conversion of a PLP-dependent racemase into an aldolase by a single active site mutation. *J Am Chem Soc* **125**, 10158-10159.
- Serov, A. E., Popova, A. S., Fedorchuk, V. V. & Tishkov, V. I. (2002).** Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal* **367**, 841-847.
- Shao, Z., Zhao, H., Giver, L. & Arnold, F. H. (1998).** Random-priming *in vitro* recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res* **26**, 681-683.
- Shim, E. J., Jeon, S. H. & Kong, K. H. (2003).** Overexpression, purification, and biochemical characterization of the thermostable NAD-dependent alcohol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**, 738-744.
- Staley, J. T. & Konopka, A. (1985).** Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**, 321-346.
- Stemmer, W. P. (1994a).** Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* **370**, 389-391.
- Stemmer, W. P. (1994b).** DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10747-10751.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Sun, H. W. & Plapp, B. V. (1992).** Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family. *Journal of molecular evolution* **34**, 522-535.
- Sund, H. & Theorell, H. (1963).** *The Enzymes (2nd Edition)* **7**, 25-83.
- Tishkov, V. I. & Popov, V. O. (2006).** Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomolecular engineering* **23**, 89-110.
- Tochikubo, K., Hachisuka, Y. & Murachi, T. (1968).** Properties of glucose dehydrogenase from vegetative cells of *Bacillus subtilis* and effect of dipicolinic acid and its chemical analogues on the enzyme. *Japanese journal of microbiology* **12**, 435-440.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. & Daae, F. L. (1990).** High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**, 782-787.
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A. & Ovreas, L. (1998).** Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol* **64**, 53-62.
- Torsvik, V. & Ovreas, L. (2002).** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology* **5**, 240-245.

Tripura, C. & Podile, A. R. (2007). Properties of a chimeric glucose dehydrogenase improved by site directed mutagenesis. *Journal of biotechnology* **131**, 197-204.

van Den Heuvel, R. H., Fraaije, M. W., Ferrer, M., Mattevi, A. & van Berkel, W. J. (2000). Inversion of stereospecificity of vanillyl-alcohol oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9455-9460.

Vandecasteele, J. P. (1980). Enzymatic Synthesis of l-Carnitine by Reduction of an Achiral Precursor: the Problem of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Recycling. *Appl Environ Microbiol* **39**, 327-334.

Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K. E. & Streit, W. R. (2003). Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6235-6242.

Watanabe, S., Kodaki, T. & Makino, K. (2005). Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc. *J Biol Chem* **280**, 10340-10349.

Weckbecker, A. (2005a). Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese von chiralen Alkoholen. *Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.

Weckbecker, A. (2005b). Suche nach neuen Alkohol-Dehydrogenasen mittels Metagenom-Banken. *BMBF-Projekt "Designer-Mikroorganismen"*.

Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6578-6583.

Wichmann, R., Wandrey, C., Buckmann, A. F. & Kula, M. R. (1981). Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme Membrane Reactor with Simultaneous NAD(H) Regeneration. *Biotechnology and Bioengineering* **23**, 2789-2802.

Williams, G., GJ (2004). Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences. *Cellular and molecular life sciences* **61**, 3034-3046.

Wills, M., Gamble, M., Palmer, M., Smith, A., Studley, J. & Kenny, J. (1999). Novel catalysts for asymmetric reduction of carbonyl groups. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **146**, 139-148.

Wills, M. & Hannedouche, J. (2002). New methodology for the asymmetric reduction of ketones. *Curr Opin Drug Discov Dev* **5**, 881-891.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews* **51**, 221-271.

Wolberg, M., Filho, M. V., Bode, S., Geilenkirchen, P., Feldmann, R., Liese, A., Hummel, W. & Müller, M. (2008). Chemoenzymatic synthesis of the chiral side-chain of statins: application of an alcohol dehydrogenase catalysed ketone reduction on a large scale. *Bioprocess and biosystems engineering* **31**, 183-191.

Wong, C. H. & Whitesides, G. M. (1994). Enzymes in synthetic organic chemistry. *Tetrahedron organic chemistry series* **12**.

Wongtrakul, J., Sramala, I., Prapanthadara, L. A. & Ketterman, A. J. (2005). Intra-subunit residue interactions from the protein surface to the active site of glutathione S-transferase AdGSTD3-3 impact on structure and enzyme properties. *Insect biochemistry and molecular biology* **35**, 197-205.

Wu, J. T., Wu, L. H. & Knight, J. A. (1986). Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clinical chemistry* **32**, 314-319.

Yin, S. J., Wang, M. F., Liao, C. S., Chen, C. M. & Wu, C. W. (1990). Identification of a human stomach alcohol dehydrogenase with distinctive kinetic properties. *Biochemistry international* **22**, 829-835.

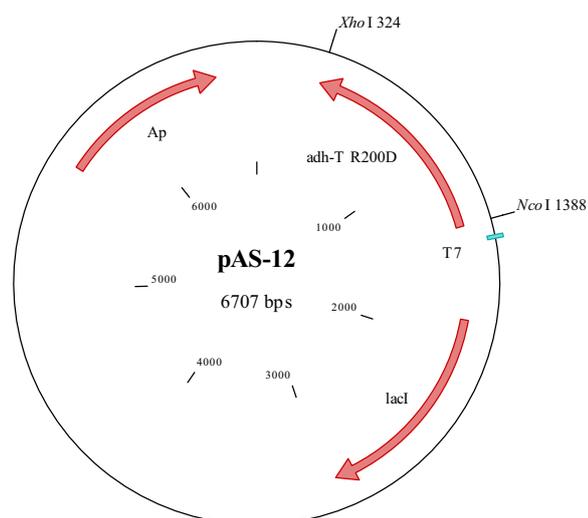
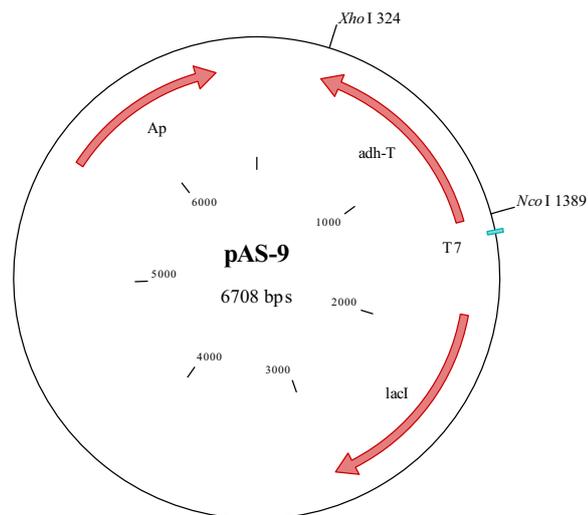
Yutani, K., Ogasahara, K. & Sugino, Y. (1985). Effect of amino acid substitutions on conformational stability of a protein. *Advances in biophysics* **20**, 13-29.

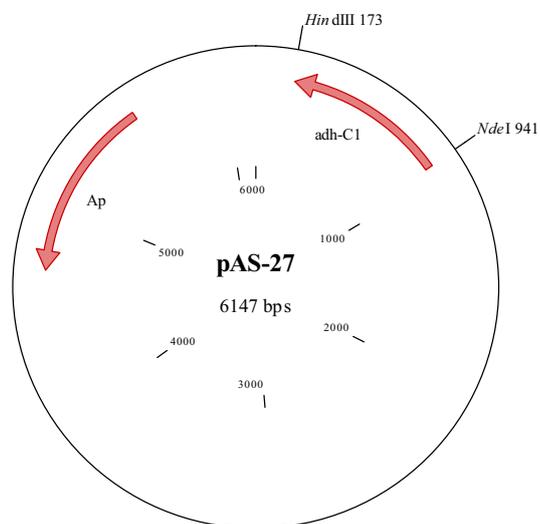
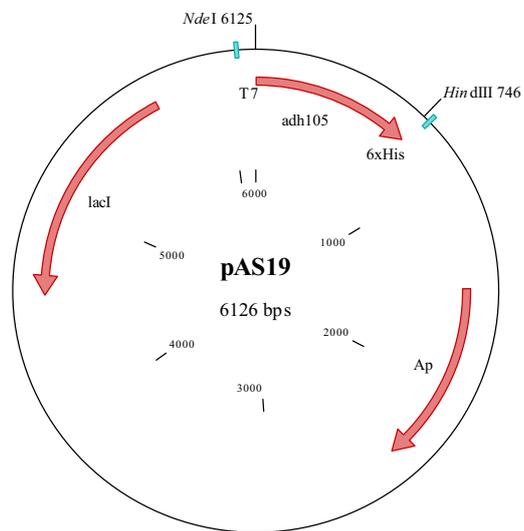
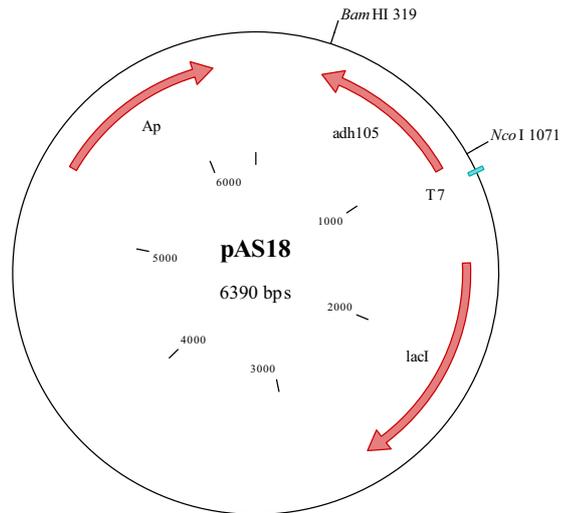
Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A. & Arnold, F. H. (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nature biotechnology* **16**, 258-261.

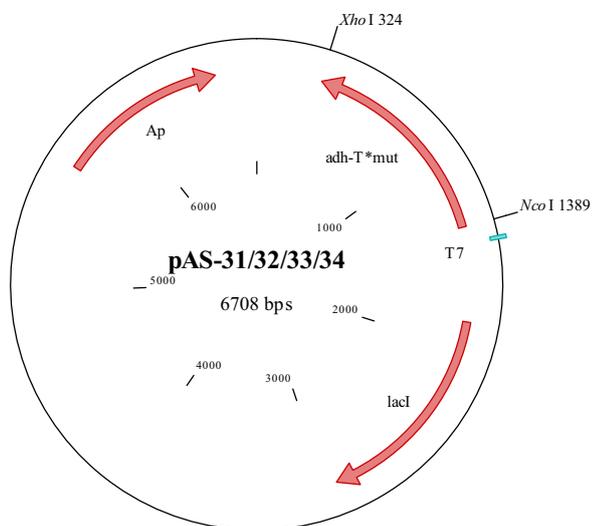
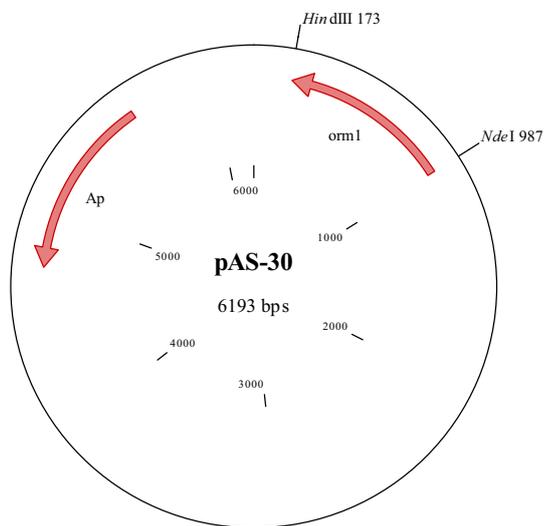
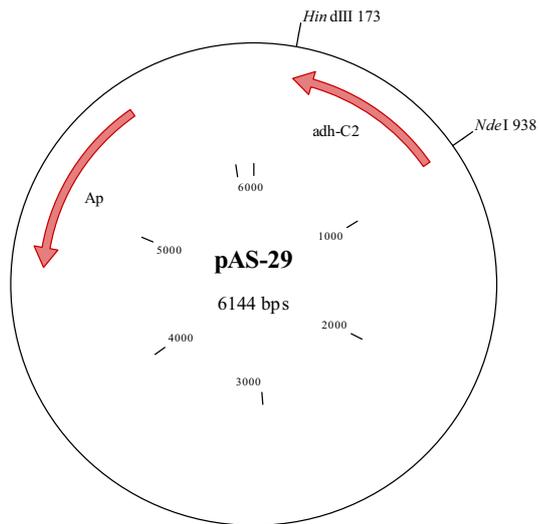
Zhou, J., Bruns, M. A. & Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**, 316-322.

Anhang

Karten der in dieser Arbeit erzeugten und gemäß Tabelle 6 benannten Plasmide.







Nukleotidsequenz von *adh-C1* (762 bp)

ATGATGACAACACAGCGTATCGCACTGGTAACCGGCGCAATGGGTGGGATCGGAACGGCCATTTG
 CCAGGAGCTCGCCAAAGAAGGGTATCGCGTCGTTGCCAACTGCATTCCGGGCTTCCCGCAGAAGGA
 GGAGTGGCTGGCTGCACAAAAAGCACAAAGGTCCTGATCAGATTCAATTTTTCCAACATGATTCTTC
 CGATGAAGACGGCTGGACGAAATTATTCGATGCAACGGAAAAAGCCTTTGGCCCAGTTTCTACATT
 AGTTAATAACGCTGGGATCGCGGTTAACAAGAGTGTGCAAGAAACCACGACTGCTGAATGGCGTA
 AATTATTAGCCGTCAACCTTGATGGTGTCTTCTTCGGTACCCGATTAGGGATTCAACGGATGAAGA
 ACAAAGGCTTAGGGGCTTCCATCATCAACATGTCTTCGATCGAAGGCTTTGTGGGTGATCCTAGCTT
 AGGGGCTTACAACGCATCTAAAGGGGCCGTACGGATTATGTCCAAGTCAGCTGCCTTAGATTGTGC
 CCTAAAGGACTACGATGTTTCGGGTAAACACTGTTACCCTGGCTACATCAAGACACCATTGGTTGA
 TGACCTACCAGGGGCCGAAGAAGCGATGTCACAACGGACCAAGACGCCAATGGGCCATATCGGGT
 AACCTAACGATATTGCCTACATCTGTGTTACTTGGCTTCTAACGAATCTAAATTTGCAACGGGGTTC
 TGAATTCGTAGTTGACGGTGGCTACACTGCTCAA

Aminosäuresequenz von ADH-C1 (253 AS), berechnete Molmasse 27139,7 Da

MMTTQRIALVTGAMGGIGTAICQELAKEGYRVVANCIPGFPQKEEWLAAQKAQGPDQIQFFQHDSSE
 DGWTKLFDATEKAFGPVSTLVNNAAGIYVAVNKSVEETTTAEWRKLLAVNLDGVFFGTRLGIQRMKNKGL
 GASIINMSSIEGFVGDPSLGAYNASKGAVRIMSKSAALDCALKDYDVRVNTVHPGYIKTPLVDDLPGAE
 EAMSQRKTTPMGHIGEPNDIAYICVYLASNESKFATGSEFVVDGGYTAQ

Nukleotidsequenz von *adh-C2* (762 bp)

ATGATGACAACACAGCGTATCGCACTGGTAACCGGCGCAATGGGTGGGATCGGAACGGCCATTTG
 CCAGGAGCTCGCCAAAGAAGGGTATCGCGTCGTTGCCAACTGCATTCCGGGCTTCCCGCAGAAGGA
 GGAGTGGCTGGCTGCACAAAAAGCACAAAGGTTTCGATTTTCGTCGCCGAGAGGCTGACGTTGCCGA
 CTACGACCAGTGCAAAACGATGGTCGCGAAAATCGAAGCCGAAGTGGGGCCGATCGACATCCTGG
 TCAATAACGCGGGGATCGCGGTTAACAAGAGTGTGCAAGAAACCACGACTGCTGAATGGCGTAA
 TTATTAGCCGTCAACCTTGATGGTGTCTTCTTCGGTACCCGATTAGGGATTCAACGGATGAAGA
 AAAGGCTTAGGGGCTTCCATCATCAACATGTCTTCGATCGAAGGCTTTGTGGGTGATCCTAGCTTA
 GGGGCTTACAACGCATCTAAAGGGGCCGTACGGATTATGTCCAAGTCAGCTGCCTTAGATTGTGCC
 CTAAAGGACTACGATGTTTCGGGTAAACACTGTTACCCTGGCTACATCAAGACACCATTGGTTGAT
 GACCTACCAGGGGCCGAAGAAGCGATGTCACAACGGACCAAGACGCCAATGGGCCATATCGGGTGA
 ACCTAACGATATTGCCTACATCTGTGTTACTTGGCTTCTAACGAATCTAAATTTGCAACGGGGTTC
 GAATTCGTAGTTGACGGTGGCTACACTGCTCAATAGTAG

Aminosäuresequenz von ADH-C2 (253 AS), berechnete Molmasse 26869,8 Da

MMTTQRIALVTGAMGGIGTAICQELAKEGYRVVANCIPGFPQKEEWLAAQKAQGFDFVAEADVADY
 DQCKTMVAKIEAEVGPIDILVNNAGIYVAVNKSVEETTTAEWRKLLAVNLDGVFFGTRLGIQRMKNKGLG
 ASIINMSSIEGFVGDPSLGAYNASKGAVRIMSKSAALDCALKDYDVRVNTVHPGYIKTPLVDDLPGAE
 AMSQRKTTPMGHIGEPNDIAYICVYLASNESKFATGSEFVVDGGYTAQ

Nukleotidsequenzen der Metagenom-KloneAW3B3 Up

GGGACGGGCTCCTATAGGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGAT
 GGATATCTGCAGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCACTTCGTCGTGCGGACGGG
 TGGCCTTCCAGGCCGAGACAAAACGGTGGCTCAGGCGGCGGAGTGCAGCCGTGTTCCGGTGGAG
 CCCGAAAGGCCGGGGCGGGCGCTGGCGTCGATGTGGAGCAGGGTGGTCATGGCGTGGTCTCGGG
 TGGGTTGATGGGGTGAATGAAATTCATCTGTTTGTGTTGACACGGTTTGAATTTATCCAAGCATCAC
 AGCCGCCACAAACGACGTTTTCTTTGCCTTGCAGAAAAATTAATTCATCCATGGCCACCCTTCATTC
 ATTGCCTCCGCTGGCGGGCTGCGCGCCTTCGAAGCCGCTGCACGGCACTGCAGCGCCAAGCTCGC
 GGCGAACGAGCTGTCGGTACGCCCACGGCCATCAGCCATCAGGTGCGGCAGCTCGAAGAGTCCG
 TGGGGGTGCAGCTGTTTCGTTCCGACGCGGCAACTGGTGTACGCGCCGAGGGCCGGGAAGTGC
 AGGCGGTGTTGAGCGAGTTCAGTGCATGGCCAACGCCGTCGCGCGGCTGCGTGCGCCGCCCG
 CGCGGCAGGCGATCACCTTGTGACACGCGGCCGTTGCGGGCGCGCTGGCTGCTGCCGCGCGTGA
 GCACCTTGCGCGCGCTGCATCCGCGGCTCGACCTGCGCATTACGCATCGCACGAGGCGGTGGCGC
 TCGACGGCATCACGGCCGACATCGCCATCCGTTACGGCAAGGGCCAATGGCCGGCCCTCGTGGCCC
 AGAAGCTGTTTCGACAACACCTTCGCGCCGGCTGCAGCCCCGCGCTCAAGCTGCGCCGCCCGCAGCG
 ACCTGACGAAGCACACGCTGCTGCATTTTCGCGTTGCTGCGCAGCAAGAGCCCGCCGGGTACATGGG
 CCGAGTGGCAGCAGCAGCGCAGGTGCCGGGCTCGATGTGTGCGCCGGGCCGGTGTCTCCGACG
 AAACGCCCACCGTGTGCGCGCGCTGCAAGGCCAGGCGTGCCTGATGGGCCTGCGCTGATCGCGGA
 CGACTGCCCGCGGCAATCTGTGACGCTTCGGCTGTGCTGCTGATGGCGGTCTTACTGCGTGCCCG
 AGCCCGGGCCTCGACTGCGTGCAGCGGTTCAAGTGGTAAGCGGTTGTCCGCCCTTGGCCGCGCTCG
 AGCCATGACTCGCACGCGCAACATAACCTTGC

AW3B3 Dn

GGGGGTGACTATTTAGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGG
 ATCGCCGCGCCGCACATCCGCGCCGGCGTCTGGTGCCGCTGCTGACCCCTCACGTGGACGACCAC
 TCCAGCACCTTCGTCTACTACGGAAGCCGCTCGCGCAGCCACGCGCGTCAGGGCCTTCATCGAC
 CTGGCGGTGCAGCGCCTCGTGAACAACACGACCTACGTTTTGACGGCGAAGGAACTGCAGTCCGCT
 GAAGCGAAAGGGCGCAAGGCGTACCCGCGGCAGTGTGCTGCCGCGCGAGTTTCAAGCCGCCGCG
 CCCAGGGGCGACAACCCCTCACCCACTCGAACACCGCCGCAACGGCAGGCTCGGAGCGCCGCGC
 CTCCGGGCACACCAGGTAGAACGGCAGGCCAGACAGCACAGGCCCGAAAGGCTGCACCAGATTGC
 CCGCGCGCAGTTCGTCCGCGATCAGCGCCAGGCCATCAACGCCACGCCCTGCCCTTGCAGCGCGG
 CCGACACGGTGTGCGTTTTGTCGGAGAACACCGGCCCGGCCGACACATCGAGGCCCGGCACCTGC
 GCCTGCTGCTGCCACTCGGCCATGTACCCGGCGGGCTCTTGCTGCCAGGCAACGCGAAATGCAGC
 AGCGTGTGCTTCGTGTCAGGTGCTGCGGCGGCGCAGCTTGCAGCGGGGCTGCAGGCCGGCGCGAA
 GGTGTTGTGCAACAGCTTCTGGGCCACGAGGCCCGGCCATTGGCCCTTGCCTAACGGATGGCGAT
 GTCGGCCGTGATGCCGTCGAGCGCCACCGCCTCGTGCATGCGTGAATGCGCAGGTCGAGCCGCGG
 ATGCAGCGCGCGCAAGGTGCTCACGCGCGGCAGCAGCCAGCGCGCCGCAACGGCCGGCGTGGTGC
 ACAAGGTGATCGCCTGCCGCGCGGGCGGCGCACGCAGCCGCGCGACGGCGTTGGCCATGGCACTG
 AACGACTCGCTCAACACCGCCTGCAGTTCGCCGGCCCTGCGGCGTGAGCACCAAGTTGCCTCGGCTGG
 CGAACGAACAGCTGCACCCCGAGCGACTCTCGAGCTGCCGCACTGATGCTGATGCCGTGGGCGTG
 ACGGACAGCTCGGTGCGCGGAGCTTGCCTGATGCGTGCACGGCTCGAGGCCGCAACGCGCAG
 CGAAGCATGATGAAGGTGCCATGATGATTACTTTTCGACCCAGAAACGTCGTTGGTGGCGCCTGTA
 AGCCTGGATA

AW3E9 Up

GGAATGGCTCCTATAGGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATG
 GATATCTGCAGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCGGGATCGGCCTGCCGAGCGC
 CCGCCGGAACCTCGATCATGGAGCGATAGACGGCGTGGTGCATCTCGTCCTTGAACAGATAGAGGC
 CGCCCGTACGCTCAGCAGCATCAGGAACGGCATGACCAGCACCCCTGCGTAGAAGTGCCAGCGC
 CAGACGGCCCGATAGGCGCCGACATCATGTCCGGCCCTTGGTCTTGCAGAGAGGCGGTTCATCAGT
 AGGCCAGCCGAGGCCGACGAAGACCGAACCGGCCCTCGCCGGGGAAGAAGACGGCGGTCTGTGTC
 GTGCGGGCGTCCGTCACGGTGTGAGAACTCGCCGACGTAGCGTTTGTGCGCCAGGTTGCGTGCCTCG
 ATGTAGACCGAGGCGTTCGGGCGGATGTTGAAGCCCGCGGTCAGGCCAGCACGGCGTAGTCCGG
 CGCCTTCATGGTGTGGCGTAGTGCACATAGGGGCTGGACAGTGCCTACTCGACCGACGGGGTGC
 GAAGACGCCGTCGGATGACGCCATGTGAGTTCCGGCGGATACTGATGCTGCGGCACGACCGGCA
 GGCGATTGTGCCCCAGCGCGCATCGCCGTCGAAGCGGAAGTCGCTCCAGTTATAGACCTGACG

CAGCATCAGCGACCCGTCGCCAGTTCGACCGGCAGGGTCCAGTCCAGCCCAGCCGCTCGATGCCCTG
 GTGGATGGTCTTCTTGGCGTTGAAGGTGGTGGCGGGAATGTCCGGGGCTGGTATGAAGTTCAGCAT
 CTCGCCCTCGATCCGGCTGCGATAGGCGACCAGATCCCAGGCCAGAGGGCCATGACGGCCGCGCG
 TGCCGATCTCGCCGGTCCAGGCGTCTGAATCTCGACCGGGGTGAAGCCGGTCAACGGCGCCTGCA
 CCAGGGCGCCGAAGGTCCGGCGCTCGACCGAGCGGTGACGTTGGCGAAGACCTGGCGTCGTCCTCG
 GCTTCCACACAGGCTCATGCGCGGCGAGATCTACTCATAGTCGCGCTGGCGTCGTTGGCGGGGTC
 ATGCGTTCAGATAGTCGCGCGTGGCGCGCCCCACGATCGGCAGCGACAGAGCAGTGTCCGGTGAC
 GAACAGCTCTTGGCAGACGTACGGCGAGGCTTGAACGCATAGCGTCTGAGGTGCTGCCTCAGTTA
 CAATAGCGCAGGGCCTGAATCT

AW3E9 Dn

GGGTGTGCCATTTAGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGA
 TCGGCGCCTGCCTGGCGCCGTCCCTCGCCCATGCCTACGACCTGTCCGAGGCTGACAGCCCCACCA
 TCGTCGACAGCATCATCGTCACCGGCCCGCCGAACGCCGAAGACCCGACCGTCGTGGCCGAGGCG
 CGCGACCGTCTCAGCCGCACCCCCGGCGCCGTGCGCGTGGTGTCCGCGAAAGCTATTCCGACCGC
 TTCGTCCAGGGCTTCGCCGACACCCTGCGCAATGTCCCCGGCGTGTGGCGCAGAAGCGGTTCCGGC
 GAGGAGAGCCGCTGTCCATTGCGCGCTCGGGCATCGCCCAGGGCTTCCACAGCGCGGCGTTCG
 TTCGCCAGGACGGCGTACCCTTCGCCGACGCCGACGGCTTCTCCGACTTCCAGAGCGTGGACTCT
 CTCAGCGCCCGCTATGTCCGAGGTGTGGAAGGGCGCCAACACCCTGCGCTTCGGCGGGGCCAGTTG
 GCGGGGGCCATCAACCTCGTCACCCCGACCGGCCGACGGCCCGCCAGCGCGCCCTGATGCAGGTC
 GAGGGCGGCAGCTACGGCTTCGTGCGCGCTCACAGCGCCGTCCGCGAAACCTATGGCGACTGGGA
 TATCTACGCCCGCCACGGCCATGCAAGGCGACGGCTGGCGCGACCACAGCCGGCAGTCGC
 AAGGCCGTGTGACCGTCAATGCGGGCCGCTCCTTCGGCGAGGATCGCGAGGTGCGCCTGATCGCCC
 AGGCCGCCGACATCAAGCAGGACATGCCCGGCTCTCTGATATTGGAAGAGGGCGTGAACACCCCG
 CGCAAGGCCCGCCAGCGCCCTGTCCGGCGATCAGGCCCGCGACCTGACCGTCAAGCGGCTGAC
 GCTGCAGACCCGCTGGCGCTTCAACGAATCGACCCTGTTCCGAGGGCGCCGTCTGGGGCTGGGAGAA
 ATCCCTCTATACCCGATCTTCCAGGTGCTGGATCAGGACAGCGCACGCGCGGCGCTT
 CGCCCGCATCGACTGACGGCGACATCGGCGGCTGCGCGGACGCTTCTACGGCTTCTCGTTGCGGG
 ACGAGAGTCGAGTCTGCGCTATGTGACTGGGGGGCGAGCGCGGCGCAGACGCTGATGCCGTGAC
 ACGTTCGGCCTGGACGTCTCGCCGAGGGAGGCCTGTTCTGATCAGTACTGCTTATCCAGGCGTC
 GTGGGGGGCGACAGCGCGACATATCTGGGACCGCAT

AW3F10 Up

AAAGGAATCACCCTATTGGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTG
 ATGGATATCTGCAGAATTCGGGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCGGGATCGAGCGGACCTA
 TCACGGCCATCCGGCGGGGTTCCGCACCCACATCCTGGTCTGCATGACCTCCTGCGTCCTGATGCTG
 GCGGCAATGCATCAGGCCAGCTGGGGCTTCGTGCGCCCTGCCCGAGCAGCGACTGGTATCGACCCG
 ACGCGGATGGCGCACGGCATACTGACCGGCATCGGCTTCTGTGCGCCGGGGTATCTTCCGCGAG
 CGGTTCTCGGTGCACGGCCTGACCACGGCGGCGTTCGCTGTGGACCACCTCGGCCATCGGGGTGATG
 TTCGGCGTAGGCCGTGTGAAGCTGGGGCTGATCGCGGCGGGGGCGACCCTGCTGGTGTGGCCATT
 CTGCGCTTCTCGACGCGCGCCTGCCGCACGTGCGCGTGTGGACGTCACCCTGCGCTGGACGCGC
 GCGCGGGCGCCGAAGAAAAGGCGCTGCGCGCCCTGCTGGCCGAGAACGGCCTCAGCCCCACGCG
 CATCGGGCATGTGTCAGCCCCGACGGCCAGATCCACGAACAGCACGTCAAGGCGCGCGGCCCA
 TGCCGCTGAAGGTGACGCGCCTGTCCCGCGTCTCGCCGATCAGGCTGGGCTGGCCGGCTTTTCCGT
 CATGCCGAGGGATGACTGAGCCAACGACTGAGCGCCCGGTCATTGTTTCGCTAACCTCTTTGGGGC
 AATAGGGAACGGATGGCGAACGAAAACGACTCGGATCCTGGGGCTGGACCCCGGCCGTCGCGCA
 CCGGCTGGGGCGTCATCGAAAAGCGAGGGGCGAGCCGCTGCGCTGGATCGCGCACGGCGTCGTCG
 CGCCCGATGAAAAGGCGCCTTTCTCCGAACGGCTGCTGCATCTTCTGGAGCAGGTGGGCGAGGTCT
 GCGCCGCTATATTTGCGACGAGGCGGGCGGTTCGAGGAGGTCTTCGTCAACGTCCATTCCGGCCTC
 GACTGCTGAAGCTGGGCCATGCGCCGGGCGGCGGTCCATGTGGCCCCGGGCCGGGCGGGTCTT
 CAGGCGTACCCGAATTCGCCCCGACCCTGGATCGAGCTCGGGACCAGGTTTGTATGCATGGCTTG
 AGTATTCCTATAAGTGTACCTAAATTGCCTTGGGCGTAATCATGGTTCTCTTGTGTTTACGAGTG
 GTAAATTTGTTATCCGCCAACAAAGTTACACATCATCGCGACCGGGGAAAGCATAAAGAGTTGTAA
 GCGCCTCTGCTG

AW3F10 Dn

AGGGGCTGCCATTTAGCTTGAAGTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCG
 GATCAGGGTTCGGGGCGTATTCCGGCGACGCTGAGACCCGCCCGCGCCGGGGCCAGCATGACCGCCG
 CCCGCGCATGGCCAGCTTCAGCGTTCGAGGCGGATTGACGTTGACGAAGACCTCCTCGACCGCCG
 CCTCGTCGCAACTATAGGCGGCGCAGACCTCGCCACCTGCTCCAGAAGATGCAGCAGCCGTTCCG

AGAAAGGCGCCTTTTCATCGGGCGCGACGACGCCGTGCGCGATCCAGCGCAGGCGGCTGCCCTCGC
 TTTCGATGACGCCCCAGCCGGTGCAGCGCAGGCCGGGGTCCAGCCCCAGGATCCGAGTCGTTTCGT
 TCGCCATCCGTTCTATTGCCCAAAGAGGGTTAGCGAACAATGACCGGGCGCTCAGTCGTTGGCT
 CAGTCATCCCTCGGCATGACGGAAAAGCCGGCCAGCCCAGCTGATCGGCGAGGACGCGGGACAG
 GCGTTCGACCTCAGCGGCATGGGGCCGCGCGCCTTGACGTGCTGTTTCGTGGATCTGGCCGTCGGG
 GCTGACGACATGCCCGATGCGCGTGGGGCTGAGGCCGTTCTCGGCCAGCAGGGCGCGCAGCGCCTT
 TTCTTCGGCGCCGCGCCGCGCGTCCAGCGCAGGGTGACGTCCAGCACGCCGACGTGCGGCA
 GCGCGCGTCGAGGAAGCGCAGAATGGCCAGCACCAGCAGGGTCGCCCCCGCCGATCAGCCCC
 AGCTTCCACAGGCCTACGCCGAACATCACCCCGATGGCCGAGGTGGTCCACAGCGACGCCCGCGT
 GTCAGGCCGTGCACCGAGAACCGCTCGCGGAAGATCACCCGGCGCACAGGAAGCCGATGCCGGT
 CAGTATGCCGTGCGCCATCCGCGTCGGTTCGATCACCAGTCGCTGCTCGGGCAGGGCGACGAAGCC
 CCAGCTGGGCCTGATGCATGCCGCCATCAGGACGCAGGAGGTCATGCAGACCAGTATGTGGG
 TGCGAACCCCGCCGATGGCCGTGAATAGGTCGCTCGATCCCGATCCACTAGTACGGCCGCGGAT
 GTGCTGATTGTCAGATATCCATCACACCCTGGCCGGCCGCTCGAGCATGCATCTGAGGGTCTAAT
 TCGCCCTTATAGTGAGTCGTTACAATTCAGTGTGTCGATAAACGTCTGACTGAAATCATGGCGTAC
 TAACTTTATCGCTTTGAGCCATTCCTCCCTTTTTGC

AW4H12 Up

GGGCAACTACTATAGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGAT
 ATCTGCAGAATCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCTTTCGAAATCTAGTTTTTTCGGAC
 GACCGGTACCACTGCTTTCGAGGCTTGGGAGCAAAGCAAGGACGGATAAACTGGCTAACACACT
 AGGTAATCGCACAGGGCGAAGTCCTCGCTCAATGCAAGATGGAAGACGATGATCGACCTTAGAGA
 TGCTAATTATTTTCGTCACGGTTGCCGAAGCCGGGAGTCTTTCGCTTGGCCGAGAAAACTTGGACG
 CACGCAGCCTGCTTTGACCAAATGCATACAGAGGCTAGAGGACGACCTGCGGATCGAGTTGTTTCG
 TCACGAGGGACGACAACTCGTCTGACCGAGGCGGGCCATGTATTCCTAACAAGAATGCGTAGTCT
 TCTCGTTTTGCGACCGAAGTCCGACGCGAGATGTCGGATCTCGGAACCGCGTCGCTGGCTCGATA
 AAAATAGGCAGCGCAGCCACGGCGGGGAATATATGCTGCCGCATTTGACAGCTCAGTTAATCAA
 CCAAGCACCCGACGTGACTTTGGAAGTACAGTGGGCATGAATGACGTAATCATGCGTGCCTCAT
 TGAAAAGTCCATCGACCTTGTCTTCGGGCCACTAACACGGTCTACAAGCGAGAGCGAACGGTTCGA
 ATCTTTTTTCGCTAACCAGTGCATGACGTTGTCGCTGTTGCCAGTAACGATCACCCATTTTCGATCAT
 CCGCTAACACCTGAGACCCTGGCTGCATATAAATGGGTACTCGCAGGGCCGGGAGTTGCCACCGCT
 CAGTGGCTGGAGAGTACGTTCCGGTTCGCTTGGATTGAATGAACTTCAAGTGCAGATGGAAACCAGT
 TCCATCTTCTTCTGCGGAGACTGATTTACAGAGACAACTGCTTAGCTTCATCTCCAGACGCAATCT
 GGCCCCGGCGCCGTAGGCGGAGCATCTGCGTGAAATCCCGCTGGAGGCAACACGATGCGCCGCGA
 GTTCGGTATCATCCGCTTTCGCTGAGCCTATTTACGCGCAGCAGATTGCTGTGCGATGCAGAAG
 AGAGCAGAGCACAGTTCGAACCACTCCTGCGGTACGGAAGTCTCTGAAAGCAGCTGACGACGGCA
 TCGCGTCAGCATCGACGCCTTCGATGGGAGCACCGATACGATGGACCCCTACATATGAGTGACC
 GCGGCCACCCGG

AW4H12 Dn

GGGGCAGCCATTTAGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGA
 TCGGCGCGGCCATCGCTATGGCTGTCAATTTCCCGCAATACTCCGCTCAACAGCATGTGCTCGCCA
 ATCACGCACCGGCTATCCTTTCAGTCGCTGCCATGTTGTTTTTCGGCCAGCGTCTTCATCGGGATACT
 CAATGAAACCGGCATGGCCAGTGCCCTTGCCCAATCGAATTGTGGGGATCATCCCGAACAGGTTGG
 TCCCTACATGGCCGTCATCACGGCGTTATTGAGTATCCGGTACGTCAGTGGCTCGTCTCCAATGATGTG
 TTCTACTTCGGAATGCTGCCATTCTTGCCGAAGCCGAGGACATTACGGGATCACCGCAGCGGAA
 ATGGCACGTGCCTCCCTGGTCGGCAACCGGTGCATATCCTCAGTCCACTGGTTGCCTCCACCTACC
 TGCTGGTCAGCCGTCTGGACCTCAACTACGGTGAGACCCAGAAGTTCACCATTGGTTGGTTCGGTTG
 CCGCGTCACTCATTATGTTGGGCGTGTCCATCGTTATCGGTGTCATCCCCATTCACCGATAGGGCCG
 GTCCGATGCCTGACGGCGGATGGCTGTGTCAGGCACGGCTTTCAGAAGGAACTCTCCGTACCCGG
 CAGGGAGTGGTTTTTCGAACTGTGCTCTGCTCTCTTCTGCAATCCGCACCAGCAATCTGGCTGCCGGC
 GTGAAATAGGCCTCACGCAAGCGGATGATACCGAACTCGCGGCGCATCGTTGTTGCCTCCAGCGGG
 ATTTACGCAGATGCTCGCCTACGGCGCCGGGGCCAGATTGCGTCTGGAGATGAAGCTAAGCAGT
 TTTGTCTCTGAAATCAGTCTCGGCAGAAGAAAGATGGAAGTGGTTTCCATCTGCACTTGAAGTTCAT
 TCAATCCAAGCGACCGGAACGTACTCTCCAGCCACTGACGCGTGGCAACTCCCGGGCCCTGCGAGT
 ACCCATTTATATGCAGCCAGGGTCTCAGTGTTAGCGGATGATCGAAAATGGGGTGATCGTTACTGG
 CAACAGCGACAACGTCATCACTGGTTAGCGAAAAAGATTTCGACCGATCGCCCCTCGCTTGTAGACG
 TGTAGTGCCTGAAGACAGGTTCGATGGACTTTCATGACGCACCGCATGATACGTCATCATGCCACTG
 TCAGGTCAAGTCACTGCGGGTCTTGTGATACTGACTTTCATGCGCAGCATATTCGCCCCGCGTGA
 CTGCGCCTCCCAATTTAATCCGA

AW5D2 Up

TAGGGCTGACTCCTATAGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATG
 GATATCTGCAGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCTGCCGCGCAAGGCGCTGCAC
 GCCCGCGCCCGACCCGCGAAACTCACCACGGCCAGCGGAGCATCAGGTCGCCGATGCCGGCGC
 TCGAAAGCCCCACGCCGGGTGGCTCAACACCACCGCGCCACACCGGCAAAGCCCAGCGCCACG
 CCGAGCATGCGTCGTGGTGTGAAGCGCTCGCTGAACACCAGCGCAGCCGTCAGCGCCGAGACCAG
 TGGGCTCAGCGCCATGATGAGCGCGCCATTGGTGGCGGTGGAGCGCAGCAGCCCCCTGCGCAAACA
 GGATCTGGTTTCGCATAGACCATGAGGAACGCGCAGCCCCGTCATGCCCGCGAACTGCCTGGCGCCCA
 GCACGGGCAGCCCGCCGCGCCACAGCACGATGGCCGTGAGCGCCACGCAGGCCATCACCATG
 CGCAGTCCCAGCGGCCAGCGACTCGAAGGACGTGGTGGAGCGCCTTCACGGCGGACACATTCAC
 GCCCCACAACAGCATGGCCAGCAGCATCCAGCCTTGCACCGATGCGGGCGTGGCGCCCCGTGGGGC
 GCGCCGGGGCGGTACATCAGCTTTCGAGGGCGTTCACATTTTCGATGTCGCGCTCCGCCGTCCAG
 ATGCGCGGATGCACATGGCCCCGTGGCCTCGTCGTAGGCGCGGGTCACGTGCAAGGGCATGCAGTG
 GTCGAAGATCACCCAGTGGCCGTAGGTGGGGCGCAGCGCGGCCACGGTTTCCTTGTAGATGACGTT
 GAGCGACTTGCCAGCGCCACGCCGTTGTTGACCAGCGTGTACACGTCGGAGATGAAGGCGCGCGT
 GGAGGCGATGGCCTTGCACAGTCGGCCCGCTTCTCCAGCGCGGACACCAGGGCCGAGTCGCGAAGTGCAGTGCCT
 TTCTCGAAGCCGAAGCCCCGCGAGGCGGTCCAGCGTGGGGCAGTCGCGAAGTGCAGTGCCT
 GCATAGGCGTGTCTGGTACTCGACGAGGTCCGAGTGCAGCAAAGCAGATCTCTGGTCTTCGAGGTAGCGA
 TGTGTCGCCATGGTGTGGCGCGGCCACTTGCAGGATCTCACTCCGAGCCTCCTGACAGCCAACCGC
 TCATGTGCGTCGAGTCATGTGGCAGTCAGCCGCGAACCAGAACTGACGTTGCGACAGGCGGCAAGC
 GCCGATCTCGCCTGGAC

AW5D2 Dn

ATGGGGGGGGTATTTAGGTGACCTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCG
 GATCTTCATGCGCACCGTGAGCGAAACCCGCACGCTGCGCAGCAGAAGCTGTTTCGACCGCATCGG
 CACCAAGCTGAAGGCACCGGGCTCGTTCTCGTTCGCGCTGCATGGCTATGACTCGATGCAACTGCT
 GGCGCAGGCCATGAAGCAGGCCAACAGCACCGACGGCGCCGCGTGCCTGCGCGCTCGAAGACC
 TGAAGACGCCGGTGAAGGCGTGCTCAAGACCTACGACAAACCCTTCAGCAAGACCAACCACGAA
 GCCCTGACCGCCAAGGACCTGGTCTGGATCCGCTGGAAGGACGGCAAGCTGCTGCCCTACAGCGA
 CGCGCTGATCGGCACGCTCAAGCCGGCCGACTTCAAGCAGTAAGAAAAGAAAAAGGAGACAGGGC
 GGGTCTGCCTTCGCGCGGCCCCCGCTCGTCCCGCAACGGAGATACACACCATGGTTGAAGCCCTCC
 TGCAGGCGCTCATCAGCGGGCTCGCCGTGGCGGAGCCTATGCGCTGGTGGCACTCGGATTCAGCA
 TCACGTTACAGACCACCAAGACGCTGAACTTCTCGCACGGCGAGTTCGTCTCGGCCGGTGCCTTCA
 TCGGCATGAGCGCGCTGTTCTGGTGTGGGCAAGCCTTTCGATTCCACGACCTTCGGCGACGC
 CATTCCCGGTGCGGGCGCGCAGCTCTTCGCGCTCGTGGCCGCGCTCGGCGTGATGGGGCTGCTGGG
 CTGGCTGCTCTATGTGCTGGGCGTGCCTCCGTTTCGCGGGCCGCCCGCATGGCCTGGGTGATGAG
 CACGCTGGGCTTCGGCGTGATCCTGCAGAGCGTGGGGCTGGCCATCTGGGGCCCCGAAGCCGGTGGT
 GGTGCCCGCGCCCGTGGGCGACACCGTGATCCGCATGTTTCGGCGTGGGCGTGCGCCCGCAGGAGCT
 GCTGACGCTGGGCGTGACCGTGGTTCGTGATGTTTCGGCTTCGACCGCGTGATGAACCGCACCATGGT
 CGGCAAGGCGATGCGCGCGGTGCGCAGACGGCACGTGGCCAGCTTCATGGGGCATCAACACACGC
 ATGATGATCGGGCCTTTCGTCGTAGCTCGCCTGCGGGCTCTCGGCCTTCTGCTCGGCCATTGGCAG
 CCGTCTGTTTCATGGCTGACCGTGGGATTAGGATTTCCGGGGCCGAATGAATCGGGGCTGGAGCAA
 TTCTCGTCGGCGT

AW6D2 Up

GGGCGGACTACTATAGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGA
 TATCTGCAGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGCCGGCCAATTTCCAGGTGGA
 GGAGCCGTATATGGTGGTGAACCTCAGCGACACCTGCAAGGCTCAGCAGGTCAACAGGGCTGGT
 TCGCCAACAACGGTGAAGTGGCGAAGCAGGCCATCAGCATGACGGTGAAGCAGATTCTCCGAAGC
 CGGCACATTGTGTCGGTGGTGGCCACGCCGCAAGGCCAGGCTATTGCCGACACGGTCCAGCAG
 GAGGTGGACAGCCGGTATCCGGCCACGATTCTGAAAACCCATCCAGCTGGCAGCTGTTCTCGGAC
 AAGGAATCGGCGGGCTGGTATACGCTGGTGTGACACCTGAATCACCGGGCAGGCACGGCGGG
 ACAAAGGAGGCGGCAGCATGATCTGGCAAGGGAGATTGGCCGCAGGCGGTGCGGCTGTGGAAGT
 GGAAGCGGATGCCGGGGGGAGGATTAGCGGCATCCGCCCTCTCTCCGGGGGAGAGCATCCGGGTT
 TGCCGTATATCTCGGCAGGCTGGACCGATCTGCAGGTGAACGGCTTCGGCGGATATGATCTGAATG
 GGGCATCACACGCCGAGGATGTGGCGGGGGTACCCGTGCTCTGCATAAACCGGGTGTGGCA
 GCATACCTGCCACGGTGATTACCGGCAGCTACGAGCGGATGAGCCAGGCAATGGCGGGCGGTTGC
 GCCTATTGCGGCAGCGGCTGCCCGGAGGCCAAGTCCATATGGGGCATCCATATGGAGGGCCCGTAC
 CTCTCCGGCGAGGACGGCAGCCGGGGCGCCATCCCCGGGAGTTTATCCGCAATCCCGGATGGGA
 GGAATTCCAGCGTCTGCAGGAGGCGGCCGAGGACTGATCCGGATGGTACCCTGGCCCCGGAGC

GGGAGGGGGCCATCCTCTTTATCCGGCGGCTTACGGACAGCGGCGTGTGTGGCCATCGGGCACACA
TGTCTTCAAGCGATGAATTGAAGGCGGCGGTGGAGGCTGGTGCTACGGTGTCTACTCATCTGGGAA
ACGCTCCAGCGGTGCTGCCCCACCCCAACTACATCTGCAGCAGCTGGCGAGACGCTGTGGGGACT
TATCTGACGCACCATCTGCCACGGATGAAGGTATGCTGCGCCAGCAGCGCTCGGTCTGTCAGGGCA
TTGACACTC

AW6D2 Dn

AGGGGCGGCCATTAGGTGACCTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGA
TCAGCTCATGCTCCCGCTTCTGTCCGGCGCAGCGGGTGAACAGCCGGGAGAATCGGACCAGATTGG
CATCTCCGGCAGAATCTCTCCACCTCGGTGCTAAGCAGCCAGCTGGAGCAGACAAATCCGCGGT
ACCGGGTTTCCGGGAAATACCGCTGGGCGAAGGCCACGCCATCCGCATGGAGAGCGCCGCATCC
TGAGGGGACATTCGGCTGCCGTCAGCCGGGATATGAATGTCGATAACCGGCTCCCGTCCCGAACC
ACACAGGCATATTCACCCGCGGGCAAGCGCACTTTCTCGTGGAGGACGTTCCCGCCTGGGCCGATC
AGGTTTGCGGTCACCGTTCCATCCACAGCCTCCCGCAGCTCCGTTACAAATTCCTTCCGCCGAA
CAAAACCCTGCCGGTCCACCGCCAGTCCCTGCCTCCACCACTGCCGTCAGGGAGCCGTTCCCGGAGCT
TCCGGTAAATCCGTGATCCATACACAAAGGGTTTGTGTACACAAACTGGAGCCGTCCAGCCGGA
ACACCGTAGCCGTCATATGCCGGTACAGCAGCGGTAATCATCAATGCCCGCACGGCTCCCGTAA
GCTCCCGTAGTTCTTGGCGCGCAGGTCAAGTCACACAGTGTATCCGCCAGCACCTGGCGGGAT
AACCCGGTCCCGGTAGATCGCCGCGAGACGGGAAAACCCAGCCGTTACACATAAGCCAGGTAA
CAGTCCGCATCCTCCCAAGCGCTTGTCTCAGCTCCGCCGCGCCGGGTGTACATGGCCAAAAC
TGCGGCTCGCCCCCTCCCGTAGAGCAGGTCCAGCAGCTCCTCCGCCAGTTCCGGCAACCACCTG
CAGTCTGCCGCTATCCGGGCGACCCGCTCCATTCCCGCCAGCAGCCACGATCGGTTATATACCGG
GGCCAGCTCTGTCATGGTCGTATCGGACTTGCCTGGTGCGCCGGTAGACGCTGGTCCCGGCCACC
ACCGTTTCTTTGACGGAAATTCACCGGCAGCAAGTCATAATCGAACAGTGTACAGATCGGCCACG
CGCTCGCAGCACACCCTGCGCTCATCCCATCACGGGGCAGCTCGTACCGCCGCCACCGCTCCGC
AGTCATGTCGTGTACGCACCGAATGGCATGCGATTAGCTCACGGCGGACCTGCAGATCGCCGAAT
GTGGCGAGAGG

AW8E5 Up

TGATGCCCTCCATATTTGGGCTTATTTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGAT
GGATATCTGCAGAATTCCCGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCGCGCTCGAGACCTAGCTGG
CGGGTCATCACTGGGACAACGTGCGCAGCCGCGATGCGGTGCGGACCTACAACCTCAAGACCTGG
GACGAGCTCCAGGAGCTCGCCGGTGTGACCTGACGCCGTGGCGTGAAGCGGTCTCGCCGTCGAAC
CCCGTCCGCTTCGACGAAGTTCGTGTCGACGCCGAGTTTCTTCGAGGGCCTCGGCTCGCTGCTG
ACCCCGGAGCGTCTCGACTACTGGAAGGCGTGGTTGCGGGCGAAGGTCGTGCACGCCGCGGCC
GTACCTGACCGACGATCTCGTGCAGGAGAACTTCTCGTTCTACGGCACCGAGCTCACCTGTGTCCC
CACGATGCGCGAGCGCTGGAAGCGCGGCGTCTCGCTCGCGGAAGGGGCCCTCGGCGAGGCGATCG
GCTAGGTGTACGTGAGCGGCACTACCCGCCGACGGCGAAGGCCGCGATGGACGAGCTGGTCCGG
AACCTCATCTAGGCCTACCGGCGGAGCATCACCGACCTCGAGTGGTTGACCGCGGAGACCCGTGAG
CGCGCGCTCGCCAAGCTCGACTCGTTCACGCCGAATATCGGGCATCCCGAGGTGTGGCGCGAC
TATTCTAGCCTCGAGATCGACCGCGACGACCTGTTCCGGATCGTGCGCCGCGCGGCGATCTTCGAGC
ACGATCGCATCGTCGACAAAGTCGGCACGCCCATCGACCGCACCGAGTGGCACATGCCGCCGCGAG
ATGGTAAACGCGTACTACAACCCGTCCATGAACTAAATCGAGTTCCCGCGGGCGATCCTGCATAACC
CGTTCTTACGCCGCTCGTGTATGCGTCTGAAATAACGGCGGCATCGGCGCGGGTCACTTCGTTACGA
GATCGGCACGGCTTCAACACAGGCCAGCCGATACCACCGGTACGGTCACTGCAGGACTTGAGGA
CTGATGCCGATCGCCTCCGACGTTCAATGAGCGCACCATGCTCTTCTTCGGGCAAGTCCGACCTCGC
TTCTTCCGGAAGGCGCCTCGACGCCGAGCCTTCCCTCAAACGGGCGTCTTCTCGGATCTGGGGGA
GAACATCGGCGCGACCTTTGGTGATCTTCTCGCTCTCTTCCCTCCCGGGTGATAGACTGTTCTACC
TGACCGTGGAGGGAGAGGGGATCCGGGGGTAATCACACGGAATAACCACGGGGAGATGTCATCAT
CATACTCTTTTTTGTATC

AW8E5 Dn

GGCGGGGGCCAGTTTGGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCG
GATCGAGGCCCGTGGAGGCCGCGACCAGGCTCAGGTCCTGGTTCAGGCTCAGCCACTCCGACACCT
GCGCGCTGACGGCGGCGTGCAGCAGCTGCGAGTTACCAGCGCCGAGAACAGCCCGGCGAGTTCCG
CGCGCCGAACCGACGGCGACCTGCGGAGCGTCTCGGGGCCACGACGGTTCGCGGAAACGGTTCGAG
CAGCGCCGTGCGACGGAGCCCGAGGGACTCGATGCGCTCGCGCACCCGTTCTGTGCCGACCTTCTT
CAGCAGTGCCTTACCAGGATCGGGTCCCGCGGGTCCCGCCAGCACGGCGAGGTCCTCCAGCG
GAAGCGCCGGGGCATGCAGGTGTCGCCAGAGCCCCGAGGTCTCCACGGCATCGACGTTCTCGCGCT
CGACGATCTCGAACGGTCCAGCGCACCGCTCTGGAAGCCCGCGGCCACCTCGATGAGCAGCGGG

ACCACGCCGAGCCCCGCGACGGGCATGGTCACATGGTCGTACCCGGCCAGGACGTGCACATGATT
GTCGAGGTGACGACGTGTACCGAGACCTGCGCGCCGGAGTCCGCGAGCCCCTCCAACGACCGGA
GCGTGGCGGTGAACGACCGTGCCCCGGGGCTGCACGCCGAGGGAGCCGACGGCTGGTGCGCTGC
GAGCGGCGACCGCCGACGACTCCGGGGCACCCCTGAGAGACTCGGGGACCGAAGAGTTGCGGAA
CCCATCACCAGGCTCGAGAGCGCCCACGCTGATCCTTAAGGGGGTGGATTGCGGGATAACCGAG
GGAAGACGCTCCCCAGCGGCAGGGCTATCGTAACCCACCCGCGGGGGATGCTTCACAGAGTGTG
ACGTTTGGTACCAGATGGTACCCGCGATGTCGCGGGCAGCCAGAGCGCGTCTCGGGCCAC
CCCGAACGCCTCGTAGAAGCGTCGATGTTGCGCACGATCTGGTTGCAGCGGAACTCGTTCCGGCGAG
TGCGGGTCGATCGTCAGCAGCCGAGGTCTCGGGCGTCGCGGCTCTTCTGCTGCCACACCTGCGCC
AGAGAGCAGAGTCGCTGCACGCCCGGTGTATCGTTGATCACGGCGCCTCGCACCGTCAGTGACAG
TCCATACGCTGGAGCGCGATGCGAGACGCAAGGTGCGGAGTTCTCCCGGATCGGTAAGGGCTCGGT
TGACGGTGAATGTTCTGGGAGCTCGAGC

AW9D2 Up

GGGACGAACCTCTATAGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGG
ATATCTGCAGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGAT
GCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTTCATAGCTGTTTCT
GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCC
TGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGTCACTGCCCGCTTCCAGTCGG
GAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTG
GGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC
AGTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGT
GAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGG
ACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCG
CTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTA
GGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCC
CGACCCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCC
ACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT
TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAGCCA
GTTACTTTCGGAAAAGGAGTTGTAGCTCTGATCGGCAACAACCACGCTGGTAGCGGTGTTT
TTTGTTCAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAGATCTCAGAAGATCTTGATCTTTTCTACGGATCT
GACGCTCAGTGAACGAACCTCAGTAGGAGTCGCTGGAATATCAAGGATCTTACCTAACTTCTTTT
CCGGTAAAAAGCCAGTTTA

AW9D2 Dn

TGGCCGCGGCATTTAGGTGACCTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGG
ATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGA
GCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTA
CAACGTCGTGACTGGGAAAACCCGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTC
GCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTATAC
GTACGGCAGTTAAGGTTTACACCTATAAAAGAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAG
AGTGATATTATTGACACGCCGGGGCGACGGATGGTATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTCA
GATAAAGTCTCCCGTGAACTTTACCCGGTGGTGCATATCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACC
ACCGATATGGCCAGTGTGCCGGTCTCCGTTATCGGGGAAGAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAA
AATGACATCAAAAACGCCATTAACCTGATGTTCTGGGGAAATAAATGTCAGGCCTGAATGGCGAA
TGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTA
CACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCTCCTTTTCGCTTTTCTCCCTTCTTTTCTCGCCACGTTCCGCCG
TTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCG
ACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTC
GCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAA
CCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGAATTTATAGGGATTTTGGCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAATGAG
CTGATTTAACAAAAATTTTACAAAATTCAGAGACTTCGTCAGAGCGATAGAGCGATGCGCTGCGAT
CGGGAGCGGCGATACGTAAGCACGAGAGCGGTGAGCCATCGCGCAGGCTCTCAGCATATCACGGT
AGCCACGCAATGTCTGATGATCGCAACTGCGCCAGTCGATGAATCAGAAAAGCGGCCAATTTTCA

TECAN-Workstation – Programm zum high throughput Screening (2.8)

Variable setzen Platten_im_Stapel = 0
 1
 Variable setzen S
 "Wieviele Platten sollen pipettiert werden (0-12)?", 0 - 12 2
 Variable setzen Z = 0
 3
 Bedingung S = 0
 skript Ende 4
 Kommentar skript Anfang
 5
 TeMO-Rack ablegen "Diti_200"
 Grid: 32, Platz: 10, Platen Typ: 1 6
 TeMO-DITIs aufnehmen Grid: 32, Position: 10; (TeMO_DiTi_200ul)
 7
 TeMO-Rack ablegen "Mutter1"
 Grid: 32, Platz: 14, Platen Typ: 1 8
 TeMO-Rack ablegen "Kult"
 Grid: 32, Platz: 15, Platen Typ: 1 9
 TeMO-Waschen 2 Cleaner Schritt(e)
 10
 TeMO-Aufnehmen 180 µl TeMO Diti/Std Wasser
 "Substrat" (Spalte 1, Zeile 1) 11
 TeMO-Abgeben 180 µl >> TeMO Diti/Std Wasser <<
 "Mutter1" (Spalte 1, Zeile 1) 12
 TeMO-Waschen 2 Cleaner Schritt(e)
 13
 TeMO-Aufnehmen 20 µl >> TeMO Diti/Std Wasser <<
 "Kult" (Spalte 1, Zeile 1) 14
 TeMO-Abgeben 20 µl >> TeMO Diti/Std Wasser <<
 "Mutter1" (Spalte 1, Zeile 1) 15
 TeMO-Waschen 2 Cleaner Schritt(e)
 16
 Kommando "T1PAA,,,,,2075"
 warten 17
 ROMA Vektor Vektor "TeMo14Pos", Grid 1, Platz 1 (ROMA 1)
 öffnen, von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position 18
 Magellan Plattenträger herausfahren
 19
 ROMA Vektor Vektor "Magellan", Grid 1, Platz 1 (ROMA 1)
 von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position 20
 Magellan Ausführen: Methode: "Alex_340nm_2.mth"
 Keine Konstanten während der Ausführung setzen und Keine Report Prompts während der
 Ausführung 21
 Magellan Auf Methode warten
 Warnung in Log-Datei schreiben, Skript nicht unterbrechen 22
 TeMO-Waschen 2 Cleaner Schritt(e)
 23
 TeMO-DITIs abwerfen Grid: 32, Position: 10; (TeMO_DiTi_200ul)
 24
 TeMO-Rack holen "Diti_200"
 Grid: 32, Platz: 10, Platen Typ: 1 25
 ROMA Vektor Vektor "Magellan", Grid 1, Platz 1 (ROMA 1)
 öffnen, von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position 26

Magellan Plattenträger hereinfahren

27

ROMA Vektor Vektor "Stapel_Genesis4", Grid 1, Platz 1 (ROMA 1)

von Safe- nach End-Position 28

VB Skript ausführen D:\Tecan\Gemini\Data\VBScripts\PSW_Plattenstapel Genesis.vbs

Gemini Skript wartet auf Beendigung des VB Skripts 29

ROMA Vektor Vektor "Stapel_Genesis4", Grid 1, Platz 1 (ROMA 1)

von End- nach Safe-Position 30

Kommando "T1PAA,,,1085"

warten 31

ROMA Vektor Vektor "TeMo15Pos", Grid 1, Platz 1 (ROMA 1)

öffnen, von Safe- nach End-Position, greifen, von End- nach Safe-Position 32

ROMA Vektor Vektor "Platten_Abwurf_schieben", Grid 1, Platz 1 (ROMA 1)

von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position 33

Kommentar Programm Ende

34

Variable setzen $Z = Z+1$

35

Bedingung $Z < S$

skript Anfang 36

Bedingung $Z = S$

skript Ende 37

Bedingung $Z > S$

skript Ende 38

Kommentar skript Ende

39

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexander Schulz
Anschrift	Luxemburger Allee 121 45481 Mülheim an der Ruhr
Geboren	23.05.1974 in Essen

Schulische Ausbildung

08/85 – 06/93	Städt. Gymnasium Broich, Leistungsfächer: Biologie, Französisch Abschluss: Abitur
---------------	--

Berufliche Ausbildung

09/93 – 01/96	Océ Deutschland GmbH, Ausbildung zum Bürokaufmann
---------------	---

Studium und Promotion

02/96 – 10/96	Vorbereitung auf das Studium „Sicherheitstechnik“
10/96 – 10/98	Bergische Universität Wuppertal Ing.-Studiengang Sicherheitstechnik
10/98 – 01/05	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Studiengang Biologie, Fachrichtung Mikrobiologie / Enzymtechnologie Abschluss: Diplom („sehr gut“) Ort und Thema der Diplomarbeit : Institut für Molekulare Enzymtechnologie im FZ Jülich, „Oberflächendisplay und <i>in vitro</i> Evolution der Esterase EstA aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> “
02/05 – 08/08	wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Molekulare Enzymtechnologie im FZ Jülich
05/05 – 08/08	Promotion bei Prof. Dr. W. Hummel, AG Biotransformation, im BMBF-geförderten Projekt „Designer Mikroorganismen“ Abschluss 12/08, „Identifizierung und Struktur-basierte Optimierung biokatalytisch relevanter Alkohol-Dehydrogenasen“