

Inaugural-Dissertation

**Optimierung der NAD-abhängigen
Formiatdehydrogenase aus
Candida boidinii für den
Einsatz in der Biokatalyse**

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

vorgelegt von
Stephan Felber

aus
Sindelfingen

durchgeführt
am Institut für Enzymtechnologie
der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich
Prof. Dr. Maria-Regina Kula

Jülich, im September 2001

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

Referent: Prof. Dr. Maria-Regina Kula

1. Koreferent: Prof. Dr. Hermann Sahm

2. Koreferent: Prof. Dr. Maarten R. Egmond

3. Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2001

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des BMBF-Projektes „Technische Evolution von Enzymen und Synzymen“ mit der Projektleitung durch die Degussa AG gefördert.

Inhaltverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Enzyme im Fortschritt der molekularen Biotechnologie	1
1.2	Eigenschaften der Enzyme	2
1.3	Enzyme als technische Katalysatoren	4
1.3.1	Asymmetrische Synthesen mit Oxidoreduktasen	4
1.3.2	Cofaktor-Regenerierung	4
1.3.3	Die enzymatische Synthese von L-tert-Leucin	7
1.4	Die Formiatdehydrogenasen	8
1.4.1	Eigenschaften	8
1.4.2	Die NAD-abhängige Formiatdehydrogenase aus <i>Candida boidinii</i>	9
1.4.2.1	Funktion im Metabolismus	9
1.4.2.2	Die räumliche Struktur	11
1.4.2.3	Der Reaktionsmechanismus	13
1.5	Produktion und Aufarbeitung der Formiatdehydrogenasen	14
1.5.1	Produktion	14
1.5.1.1	Wachstumsgekoppelte Produktion mit <i>Candida boidinii</i>	14
1.5.1.2	Produktion rekombinanter Proteine mit <i>Escherichia coli</i>	15
1.5.1.2.1	Hochzelldichtekultivierung	15
1.5.1.2.2	Zufütterungsstrategien	16
1.5.1.2.3	Produktivität	17
1.5.2	Aufarbeitung im technischen Maßstab	18
1.5.2.1	2-Phasen-Extraktion	19
1.5.2.2	Chromatographie	19
1.6	Maßgeschneiderte Katalysatoren	20
1.6.1	Anforderungen an Enzyme als technische Katalysatoren	20
1.6.2	Methoden zur Herstellung maßgeschneiderter Enzyme	20
1.6.2.1	Rationales Protein-Design	20
1.6.2.2	Gerichtete Evolution: „When blind is better“	21

1.7 Stabilität von Enzymen	23
1.7.1 Stabilität der Enzyme in technischen Verfahren	23
1.7.2 Physikalische Desaktivierung	23
1.7.2.1 Denaturierung	24
1.7.2.2 Aggregation	26
1.7.2.3 Adsorption	26
1.7.3 Chemische Desaktivierung	27
1.7.3.1 Oxidation	27
1.7.3.1.1 Oxidation des Methionins	27
1.7.3.1.2 Oxidation des Cysteins	29
1.7.3.2 Thiol-Disulfid-Austausch	29
1.7.4 Möglichkeiten der Erhöhung der Proteinstabilität	31
1.7.4.1 Additive	31
1.7.4.2 Chemische Modifikationen	31
1.7.4.3 Austausch von Aminosäuren	32
1.7.4.3.1 Stabilisierung durch interne Wechselwirkungen	32
1.7.4.3.2 Stabilisierung der α -Helix-Dipole	32
1.7.4.3.3 Stabilisierung durch Einführung von Ionen-Bindungsstellen	33
1.7.4.3.4 Stabilisierung durch Einführung von Disulfidbindungen	33
1.7.4.3.5 Stabilisierung durch Entfernung oxidationsanfälliger Aminosäuren	33
1.8 Aktivität von Enzymen in technischen Verfahren	34
1.8.1 Aktivität der Enzyme in technischen Verfahren	34
1.8.1.1 Modell von Michaelis-Menten	34
1.8.1.2 Das k_{cat} -Kriterium	35
1.8.2 Aktivität der Enzyme in biologischen Systemen	36
1.8.2.1 Das k_{cat}/K_M -Kriterium	36
1.8.2.2 Assoziation und Dissoziation	36
1.8.2.3 Assoziation von Enzym und Substrat	37
1.8.2.4 Das kinetische Optimum der Enzymkatalyse	38
2 FRAGESTELLUNG	41
2.1 Motivation	41
2.2 Produktion und Aufarbeitung	41
2.3 Stabilitätsuntersuchungen	42
2.4 Erhöhung der spezifischen Aktivität	43
3 PRODUKTION UND AUFARBEITUNG	45
3.1 Produktion	45
3.1.1 Optimierung der Kultivierung	45
3.1.1.1 Zufütterungsstrategien	45
3.1.1.1.1 Fed-Batch mit Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors	45
3.1.1.1.2 Fed-Batch ohne Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors	47
3.1.1.1.3 Neuentwickeltes Verfahren: Simulated Fed-Batch	48
3.1.1.2 Sauerstoffeintrag	50
3.1.1.3 Optimierung der IPTG-Induktion	52
3.1.1.4 Abbruchkriterium der Hochzeldichtekultivierung	53
3.1.2 Ergebnisse der Optimierung	53
3.1.2.1 Einfluß der IPTG-Induktion auf die Wachstumsrate	53
3.1.2.2 Produktbildungsrate	54
3.1.2.3 Automatisierung	56
3.1.2.4 Übersicht über die Kultivierungsergebnisse	56

3.2	Aufarbeitung	57
3.2.1	Adaptierung des bestehenden Verfahrens	57
3.2.2	Entwicklung eines neuen Verfahrens	59
3.2.2.1	Zellaufschluß: PEG-Aufschluß	59
3.2.2.2	Extraktion: PEG-Phasen-System	62
3.2.2.3	Fällung: PEG-Fällung	62
3.2.2.4	Lagerung	64
3.2.2.5	Ausbeuten bei Aufarbeitung im halbertechnischen Maßstab	64
3.3	Diskussion	65
3.3.1	Produktion	65
3.3.2	Aufarbeitung	65
4	STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN	67
4.1	Homologiemodellierung der Struktur der Formiatdehydrogenase aus <i>Candida boidinii</i>	67
4.1.1	Entwicklung des Modells	67
4.1.2	Lage des Cysteins 262	71
4.1.3	Lage des Cysteins 23	71
4.1.4	Lage des Methionins 129	74
4.2	Katalytische Aktivität	75
4.3	Physikalische Stabilität	77
4.3.1	Thermostabilität	77
4.3.2	Stabilisierung mit dem Additiv Glycerin	79
4.3.3	Physikalische Stabilität im Vergleich zur Gesamtstabilität	79
4.4	Chemische Stabilität	83
4.4.1	Oxidationsstabilität	83
4.4.2	Oxidation mit Wasserstoffperoxid	83
4.4.3	Oxidation mit Kupfer(II)-Ionen	86
4.4.4	Inaktivierung der FDH durch Bildung inter- und intramolekularer Disulfidbrücken	89
4.5	Diskussion	91
5	ERHÖHUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT	93
5.1	Grenzen der Aktivität	93
5.1.1	Anforderungen an Enzyme in technischen Anwendungen	93
5.1.2	Aktivitäten der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenasen	94
5.1.3	Definition der Aktivität	95
5.1.4	Ist die NAD-abhängige Formiatdehydrogenase aus <i>Candida boidinii</i> optimal an ihre physiologische Aufgabe angepaßt?	96
5.1.4.1	Kinetisches Modell	96
5.1.4.2	Kriterium für Ordered Bi-Bi-Reaktionen	97
5.1.4.3	Diffusionslimitierung	97
5.1.5	Möglichkeiten der Erhöhung der Aktivität	98
5.2	Entwicklung des Screening-Verfahrens	98
5.2.1	Herstellung der High-Frequency-Random-Genbibliothek	98
5.2.2	Qualitatives Screening	101
5.2.2.1	Fixierung der Kolonien	101
5.2.2.2	Zellaufschluß	102
5.2.2.3	Nachweisreaktion	102
5.2.3	Quantitatives Screening	103
5.2.3.1	Titration der aktiven Zentren	105

5.2.3.1.1	Stöchiometrische Inhibition der aktiven Zentren.....	105
5.2.3.1.2	Bestimmung des stöchiometrischen Verhältnisses	106
5.2.3.1.3	Messung während des Screenings	107
5.2.3.2	Affinitätsadsorption	108
5.2.4	Zuverlässigkeit der Screening-Methoden	109
5.3	Ergebnisse des Screenings	110
5.3.1	Qualitatives Screening	110
5.3.2	Quantitatives Screening	111
5.3.3	Charakterisierung der C23S/F285S-Formiatdehydrogenase.....	111
5.3.3.1	Darstellung des Austauschtes	111
5.3.3.2	Kinetische Parameter	113
5.3.3.3	Thermostabilität.....	115
5.3.4	Weitere Verbesserung der spezifischen Aktivität	116
5.4	Diskussion	116
6	ZUSAMMENFASSUNG	119
6.1	Motivation und Zielsetzung.....	119
6.2	Produktion und Aufarbeitung.....	119
6.2.1	Produktion.....	119
6.2.2	Aufarbeitung	121
6.3	Stabilitätsuntersuchungen	122
6.4	Erhöhung der spezifischen Aktivität.....	124
7	MATERIAL UND METHODEN	127
7.1	Material	127
7.1.1	Geräte	127
7.1.2	Chemikalien.....	128
7.2	Methoden	128
7.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	128
7.2.1.1	Stammhaltung.....	128
7.2.1.2	Expression im Schüttelkolben.....	129
7.2.1.2.1	Herstellung.....	129
7.2.1.2.2	Zellaufschluß	129
7.2.2	Biochemische Methoden	129
7.2.2.1	Aktivitätsbestimmung.....	129
7.2.2.2	Proteinbestimmung	130
7.2.2.3	Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine	130
7.2.2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	130
7.2.2.3.2	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	131
7.2.2.3.3	Proteinfärbung im Gel	131
7.2.2.3.4	Aktivitätsfärbung im Gel	131
7.2.2.4	Proteinreinigung.....	131
7.2.2.4.1	Hitzedenaturierung	131
7.2.2.4.2	Ionenaustauschchromatographie	132
7.2.2.4.3	Gelpermeationschromatographie	132
7.2.2.4.4	Farbstoff-Affinitätschromatographie.....	132
7.2.2.4.5	Konzentrierung und Lagerung der Proteine.....	133
7.2.2.5	Bestimmung der kinetischen Konstanten	133
7.2.2.5.1	Bestimmung der K_M -Werte.....	133

7.2.2.5.2	Bestimmung der maximalen Wechselzahl k_{caf}	133
7.2.2.5.3	Bestimmung der maximalen Wechselzahl k_{caf} durch Titration der aktiven Zentren ...	134
7.2.2.6	Bestimmung der Thermostabilität	134
7.2.2.6.1	Bestimmung des T_{50} -Wertes	134
7.2.2.6.2	Bestimmung der Halbwertszeit	135
7.2.2.7	Bestimmung der Oxidationsstabilität	135
7.2.2.7.1	Oxidationsstabilität gegenüber Kupfer(II)	135
7.2.2.7.2	Oxidationsstabilität gegenüber H_2O_2	135
7.2.3	Methoden zur Produktion und Aufarbeitung	136
7.2.3.1	Produktion der Formiatdehydrogenase	136
7.2.3.1.1	Lösungen	136
7.2.3.1.1.1	Inokulum	136
7.2.3.1.1.2	Batch-Medium	136
7.2.3.1.1.3	Feed-Lösung	136
7.2.3.1.1.4	Induktionslösung	137
7.2.3.1.2	Kultivierung	138
7.2.3.1.2.1	Fermenterausstattung	138
7.2.3.1.2.2	Temperatur-Regulation	138
7.2.3.1.2.3	Druck-Regulation	139
7.2.3.1.2.4	pH-Wert-Regulation	139
7.2.3.1.2.5	pO_2 -Wert-Regulation	139
7.2.3.1.3	Zufütterungsstrategie	139
7.2.3.1.3.1	Fed-Batch	139
7.2.3.1.3.2	Neuentwickelte Methode: Simulated Fed-Batch	140
7.2.3.1.3.3	Induktionszeitpunkt	140
7.2.3.2	Aufarbeitung der Formiatdehydrogenase	141
7.2.3.2.1	Adaptierung des bestehenden Verfahrens	141
7.2.3.2.2	Neues Verfahren	141
7.2.3.2.2.1	Zellaufschluß	141
7.2.3.2.2.2	2-Phasen-System	141
7.2.3.2.2.3	PEG-Fällung	142
7.2.3.2.2.4	Gefriertrocknung und Lagerung	142
7.2.4	Molekularbiologische Methoden	143
7.2.4.1	Herstellung der Genbibliothek	143
7.2.4.1.1	Berechnung der Schmelztemperatur der Primer	143
7.2.4.1.2	Bedingungen der Error-Prone PCR	143
7.2.4.2	Screening der Klone mit erhöhter Aktivität	144
7.2.4.2.1	Qualitatives Screening	144
7.2.4.2.1.1	Anzucht der Zellen	144
7.2.4.2.1.2	Fixierung der Kolonien und Zellaufschluß	144
7.2.4.2.1.3	Aktivitätsfärbung	144
7.2.4.2.2	Quantitatives Screening	145
7.2.4.2.2.1	Anzucht der Zellen	145
7.2.4.2.2.2	Zellaufschluß	145
7.2.4.2.2.3	Reinigung mittels Affinitätsadsorption	145
7.2.4.2.2.4	Bestimmung der spezifischen Aktivität	146
7.2.4.3	Gelelektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren	146
7.2.4.4	Isolierung von DNA-Fragmenten	147
7.2.4.5	Präparation der Plasmid-DNA	147
7.2.4.6	DNA-Restriktion	147
7.2.4.7	Dephosphorylierung des linearisierten Vektors	147
7.2.4.8	Ligation überstehender Enden	147
7.2.4.9	Transformation kompetenter Zellen	147
7.2.4.9.1	Transformation mittels Hitzeschock	147
7.2.4.9.2	Transformation mittels Elektroporation	148
7.2.4.10	Sequenzierung	148

8 VERZEICHNISSE	149
8.1 Abkürzungsverzeichnis	149
8.2 Symbolverzeichnis	150
8.3 Einheitenverzeichnis	152
8.4 Abbildungsverzeichnis	153
8.5 Tabellenverzeichnis	155
8.6 Literaturverzeichnis.....	157

1 Einleitung

1.1 Enzyme im Fortschritt der molekularen Biotechnologie

Die molekulare Biotechnologie ist eine relativ junge Disziplin, die sich damit beschäftigt, neue Biomoleküle, wie z.B. Antikörper, Vakzine, Antibiotika und Enzyme, zu entwickeln und nutzbar zu machen. Während der letzten Jahre gab es bemerkenswerte Fortschritte auf diesem Gebiet. Durch die Entwicklung neuer rekombinanter DNA-Technologien eröffnete sich die Möglichkeit, neue Biomoleküle zu entdecken bzw. verändern zu können und ihnen damit neue Eigenschaften zu verleihen. Dies kann mit Hilfe der gerichteten Evolution [Arnold, 2001; Kolkman & Stemmer, 2001], des Metabolic-Pathway-Engineerings [Stephanopoulos, 1999; Chotani *et al.*, 2000; Sahm *et al.*, 2000], des Protein-Engineerings [Ryu & Nam, 2000], der genomischen [Greenspan, 2001] und proteomischen [Li, 2000] Funktionsanalyse und der Bereitstellung der Biomoleküle durch die Bioverfahrenstechnik [Schugerl, 2001] erzielt werden.

Die Vorteile des High-Throughput-Screenings und die steigende Verfügbarkeit von funktionellen Genomics- und Proteomics-Daten hat die Entwicklung und Entdeckung neuer Zielmoleküle auf einer rationalen Basis für die verschiedensten Bereiche der pharmazeutischen und agrochemischen Industrie ermöglicht. Das DNA-Shuffling ist ein Beispiel für die neuen Möglichkeiten der molekularen Biotechnologie und stellt heute bereits eine Schlüsseltechnologie dar [Stemmer, 1994 a; Stemmer, 1994 b; Cramer *et al.*, 1998; Kolkman & Stemmer, 2001]. Im Gegensatz zum gezielten Einfügen von Punktmutationen werden beim DNA-Shuffling große funktionelle Domänen ausgetauscht. Dies imitiert die sexuelle Fortpflanzung der Natur und kann die Suche nach einem geeigneten Enzym erheblich beschleunigen. Das Phagen- und Ribosomen-Display ermöglicht es zusammen mit kombinatorischen Peptidbibliotheken, da relativ einfach zu

durchmustern, neue Proteine rasch zu entwickeln [Hanes & Plückthun, 1999; Plückthun *et al.*, 2000]. Des Weiteren trägt die Bioinformatik mittlerweile erheblich dazu bei, die großen Datenmengen, welche bei der Genom- und Proteomanalyse anfallen, bearbeiten und damit die Funktionsbeziehungen innerhalb der Zelle besser verstehen und nutzen zu können [Schwede *et al.*, 2000].

Für die Anwendung der Biomoleküle in technischen Verfahren – und hier sind vor allem die Enzyme von Bedeutung – ist es wichtig, daß sie kostengünstig bereitgestellt werden können und eine hohe Stabilität unter Prozeßbedingungen, d.h. physiologisch unüblichen Bedingungen, wie hohe Temperaturen, extreme pH-Werte und der Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln, Detergentien und Oxidantien, aufweisen. Darüber hinaus sollten sie eine möglichst hohe katalytische Aktivität auch gegenüber unnatürlichen Substraten besitzen.

1.2 Eigenschaften der Enzyme

Enzyme sind die Katalysatoren biologischer Systeme. Ihre hervorstechendsten Eigenschaften sind ihre katalytische Aktivität und ihre Spezifität. Nahezu alle bekannten natürlichen Katalysatoren sind Proteine, erst die Entdeckung der katalytisch aktiven RNA-Moleküle, die Ribozyme, hat gezeigt, daß neben den Enzymen auch andere Katalysatoren in der Zelle existieren [Stryer, 1996].

Die besondere Fähigkeit der Enzyme als Katalysatoren dienen zu können, beruht auf der Eigenschaft der selektiven Stabilisierung des jeweiligen Übergangszustandes, also der energiereichsten chemischen Spezies im Reaktionsmechanismus. Dies wird ermöglicht, indem sie durch intermolekulare Kräfte die Substrate in optimale Orientierung zueinander bringen und auf diese Weise die Voraussetzung für das Knüpfen und Lösen chemischer Bindungen schaffen.

Diese von der Natur hervorgebrachten Katalysatoren sind in mancher Hinsicht den chemischen Katalysatoren weit überlegen. So besitzen Enzyme eine beeindruckende katalytische Aktivität, sie beschleunigen Reaktionen um wenigstens den Faktor von einer Million unter milden Reaktionsbedingungen, d.h., die Umsetzungen laufen bei Raumtemperatur, neutralen pH-Werten und drucklos ab. Dies vermindert unerwünschte Nebenreaktionen wie Isomerisierungen, Umlagerungen oder die Zersetzung der Edukte bzw. Produkte. Neben der hohen Aktivität fällt die hohe Spezifität auf, so weisen die Enzyme eine hohe Substrat-, Stereo- und Regiospezifität auf. Außerdem sind die meisten, wenn nicht alle Enzyme, hoch reguliert, was die Voraussetzung für das koordinierte Ablaufen der komplexen Vorgänge in der Zelle ist.

Tabelle 1: Klassifizierung der Enzyme [Faber, 1997]. Der Forschungsindex (FI) gibt den relativen Anteil der Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet der Enzyme wieder.

Enzyme				
Enzymklasse	klassifiziert	verfügbar	Art der Reaktion	FI [%]
Oxidoreduktasen (1)	650	90	Oxidations- und Reduktionsreaktionen durch Übertragung von Wasserstoff und/oder Elektronen	25
Transferasen (2)	720	90	intermolekulare Übertragung von Gruppen	5
Hydrolasen (3)	636	125	hydrolytische Spaltungen	65
Lyasen (4)	255	33	nicht-hydrolytische Spaltungen unter Bildung einer Doppelbindung bzw. Addition an eine Doppelbindung	5
Isomerasen (5)	120	6	reversible Umwandlungen isomerer Verbindungen und Racemisierungen	1
Ligasen (6)	80	5	kovalente Verknüpfungen zweier Moleküle unter gleichzeitiger Spaltung einer energiereichen Bindung, i.d.R. ATP	1

Doch diese Eigenschaften, die mit großen Vorteilen verbunden sind, können bei der technischen Anwendung manchmal auch hinderlich sein. Denn die evolutionär an ihre Substrate angepaßten Enzyme akzeptieren wegen ihrer hohen Substratspezifität oft nur ein enges Substratspektrum. Außerdem unterliegen sie Regulationsprozessen und werden durch ihre Edukte, Produkte oder auch andere Stoffe inhibiert. Die meisten Enzyme entfalten darüber hinaus ihre optimale Aktivität in wäßrigem Medium, was z.B. bei der Verwendung schlecht wasserlöslicher Substrate problematisch sein kann [Gais & Hemmerle, 1990; Rozzell, 1999].

Entsprechend der katalysierten Reaktion und den beteiligten Substanzen werden die ca. 3.000 bekannten Enzyme in sechs Klassen eingeteilt (Tabelle 1). Mit Ausnahme der Ligasen werden zahlreiche Enzyme aus allen Klassen präparativ im Labor- und Technikumsmaßstab, oder auch großtechnisch genutzt. Davon sind ca. 10% kommerziell erhältlich und es werden des weiteren zunehmend in ihren Eigenschaften speziell auf bestimmte Anwendungen hin maßgeschneiderte Enzyme verfügbar [Arnold & Volkov, 1999; Petrounia & Arnold, 2000; Arnold *et al.*, 2001].

Enzyme sind aus chiralen Bausteinen, den L-Aminosäuren, aufgebaut und infolgedessen chirale Katalysatoren. Die Differenz der Höhe der Aktivierungsenergie beider möglicher Reaktionsrichtungen ist entscheidend für die Enantioselektivität der Reaktion. In chiraler Umgebung, wie sie in biologischen Systemen vorhanden ist, unterscheiden sich

Enantiomere und können unterschiedliche pharmakologische Wirkungen hervorrufen. Beispiele hierfür sind das blutdrucksenkende Mittel Methyldopa, bei dem nur das L-Isomer wirkt oder das Beruhigungsmittel Contergan mit dem Wirkstoff Thalidomid, bei dem das (*R*)-Enantiomer eine beruhigende Wirkung zeigt, das (*S*)-Enantiomer dagegen teratogen wirkt [Faber, 1997]. Infolgedessen ist die Synthese enantiomerenreiner Verbindungen von besonderem Interesse und Enzyme finden aufgrund ihrer hohen Spezifität in der industriellen Biokatalyse in zunehmendem Maße Verwendung.

1.3 Enzyme als technische Katalysatoren

1.3.1 Asymmetrische Synthesen mit Oxidoreduktasen

Oxidoreduktasen sind *in vivo* in zahlreiche Stoffwechselwege eingebunden und kontrollieren zusammen mit den Cofaktoren insbesondere den Energiehaushalt der Zelle durch Übertragung von Reduktionsäquivalenten in Form von Wasserstoff und/oder Elektronen [Stryer, 1996].

Die für industrielle Verfahren interessantesten Enzyme sind die Oxidoreduktasen, die in die Klassen EC 1.1.1 (Donor: Alkohol), EC 1.2.1 (Donor: Aldehyd oder Carbonyl-Gruppe) und EC 1.4.1 (Donor: Amin) eingeteilt werden können und alle den Cofaktor NAD bzw. NADP als Elektronenakzeptor verwenden. Die mittels Enzymkatalyse hergestellten chiralen Komponenten, wie Alkohole, Hydroxysäuren und ihre Ester, oder Aminosäuren dienen häufig als Schlüsselbausteine für die Synthese von Wirkstoffen für die pharmazeutische oder agrochemische Industrie. Ihre Anwendung ist in zahlreichen Beiträgen veröffentlicht [Hummel, 1989 a; Fang *et al.*, 1995; Devaux-Basseguy *et al.*, 1997; Hummel, 1997]. Von Vorteil bei den Oxidoreduktasen ist ihre in der Regel sehr hohe Enantioselektivität, meist können über 99% Enantiomerenüberschuß erzielt werden.

1.3.2 Cofaktor-Regenerierung

Wie bereits erwähnt, sind Oxidoreduktasen an den verschiedensten Stoffwechselwegen in lebenden Zellen beteiligt. Hier nehmen sie mit ihren Cofaktoren am Kohlenstoff- und Energiestoffwechsel teil. Für die technische Anwendung der Enzyme ist der benötigte Cofaktor, der an der Übertragung von Atomen/Atomgruppen oder Redoxäquivalenten beteiligt ist, von besonderer Bedeutung. Beim Cofaktor kann es sich um zweiwertige Ionen (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) oder um ein komplexes organisches bzw. metallorganisches Molekül handeln. Bei 80% aller bekannten Redoxreaktionen wird das Nicotinamidadenindinukleotid NAD(H) benötigt, bei 10% NADP(H). Für Phosphorylierungen spielt Adenosin-

Tabelle 2: Preise der Cofaktoren [Fluka-Katalog, 1999/2000]. Zur Berechnung wurde jeweils der Preis für die größte Packungseinheit verwendet.

Cofaktor	Preis [€ mol ⁻¹]
ATP	1.500
NAD	11.000
NADH	38.000
NADP	190.000
NADPH	630.000
PQQ	2.300.000

triphosphat (ATP) eine große Rolle. Bei Transaminierungen wird häufig Pyridoxal-phosphat verwendet. Weitere Cofaktoren, wie Flavine (FMN, FAD), Methoxatin (PQQ) oder Cytochrome, elektronenübertragende Proteine mit Häm als prosthetische Gruppe, werden deutlich seltener von Enzymen verwendet.

Die für die technische Anwendung interessantesten Oxidoreduktasen verwenden NAD bzw. NADP als Cofaktor. NAD und NADP sind normalerweise nicht sehr fest an das Enzym gebunden, die K_M -Werte liegen in einem Bereich von 10^{-6} bis 10^{-4} M [Kula & Wandrey, 1987]. Dies hat zur Folge, daß der Cofaktor frei dissoziieren kann. Von Bedeutung ist der Cofaktor insofern bei einem technischen Prozeß, da er stöchiometrisch an der Umsetzung teilnimmt und daher in größeren Mengen benötigt wird. Das Problem hierbei sind die hohen Kosten der Cofaktoren (Tabelle 2).

Deshalb ist das wesentliche Kriterium für den Einsatz Cofaktor-abhängiger Reaktionssysteme die Möglichkeit, den Cofaktor regenerieren zu können. Durch die Regenerierung kann der Cofaktor mehr als einmal verwendet werden. Weiterhin spielt die Prozeßstabilität des Cofaktors eine wichtige Rolle. Sie wird mit der maximalen Zykluszahl ttn (total turnover number) [-] ausgedrückt und ist der Quotient aus den gebildeten Molen Produkt n_P [mol] pro verbrauchten Molen an Cofaktor bzw. Enzym n_C [mol]:

$$ttn = \frac{n_P}{n_C} \quad (1)$$

Für die *in situ*-Regenerierung von NAD/NADH und NADP/NADPH sind sowohl chemische Verfahren [Nakamura *et al.*, 1988; Ruppert *et al.*, 1988; Fry *et al.*, 1994], darunter elektrochemische und photochemische, als auch biologische [Morita *et al.*, 1994;

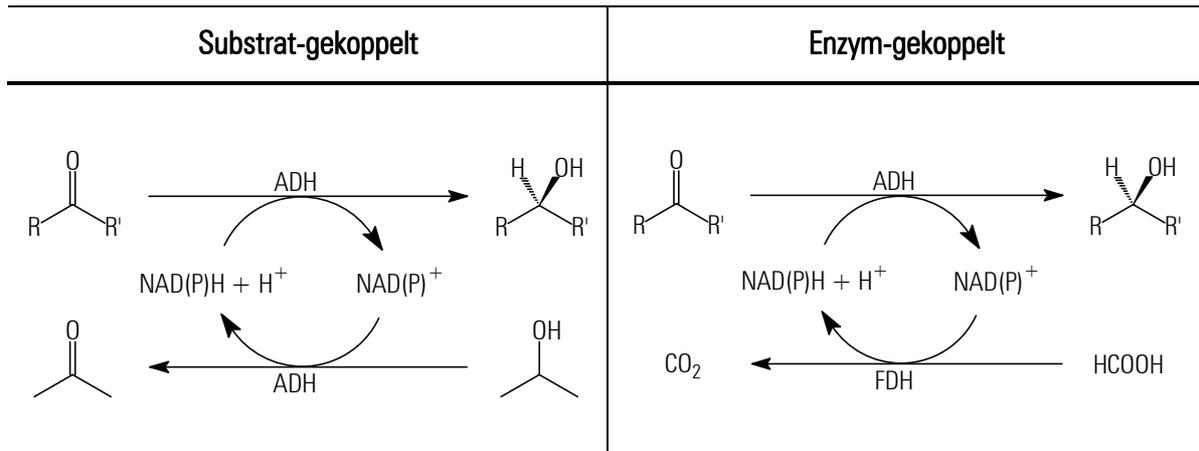


Abbildung 1: Verfahren zur enzymatischen Regenerierung von NADH bzw. NADPH. Alkoholdehydrogenase (ADH), Formiatdehydrogenase (FDH).

Kula & Wandrey, 1987], wie z.B. enzymatische Methoden, beschrieben worden. Die enzymatische Regenerierung kann klassifiziert werden (Abbildung 1).

Bei der Substrat-gekoppelten Regenerierung wird das gleiche Enzym zur Synthese und Regenerierung genutzt. Dies ist der Fall, wenn der Cofaktor fest an das Enzym gebunden ist, wie z.B. bei der Glucose-Fructose-Oxidoreduktase [Zachariou & Scopes, 1986]. Er kann aber auch bei dissoziierbaren Cofaktoren genutzt werden, wie z.B. bei der Verwendung der Alkoholdehydrogenase (ADH) aus *Thermoanaerobium brockii* (Abbildung 1). Hier wird bei der Oxidation von z.B. Isopropanol zum Aceton, der Cofaktor im selben aktiven Zentrum regeneriert, welches auch die Reduktion des eigentlichen Substrates katalysiert. Diese Art der Substrat-gekoppelten Regenerierung ist zum einen durch das thermodynamische Gleichgewicht zwischen den beiden Substraten und Produkten limitiert, zum anderen wegen der Beschränkung auf ein Enzym mit Alkoholdehydrogenase-Aktivität. Um einen hohen Umsatz erzielen zu können, muß die Isopropanol-Konzentration hoch gehalten werden, was zwar die Löslichkeit der Edukte verbessert, allerdings die Enzymstabilität oder die kinetischen Konstanten verschlechtert. Das Cosubstrat und Coprodukt sind achiral und im allgemeinen gut von dem eigentlichen Produkt durch Destillation abtrennbar. Die Substrat-gekoppelte Anwendung ist von besonderem Interesse bei der Nutzung der (*R*)-ADH für stereospezifische Reduktionen, um (*R*)-Alkohole und verwandte Produkte zu erhalten [Kruse *et al.*, 1996; Hummel, 1997]. Alle bisher bekannten (*R*)-ADHs benötigen NADPH als Cofaktor, was bisher mit keinem kostengünstigeren Verfahren regeneriert werden kann. Möglicherweise ermöglicht dies die NADPH-Regenerierung mit einem Mutein der FDH [Tishkov *et al.*, 1993 a; Tishkov *et al.*, 1993 c; Seelbach *et al.*, 1996].

Bei der Enzym-gekoppelten NADH/NADPH-Regeneration sind zwei Enzyme beteiligt. Dies erlaubt die Entwicklung neuer Regenerationssysteme und verhindert die thermodynamischen Schranken, wie sie bei der Substrat-gekoppelten NADH/NADPH-Regeneration auftreten können. Aminosäure- oder 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen besitzen keine ADH-Aktivität, somit ist nur die Enzym-gekoppelte Regeneration möglich. Für die NADH-Regeneration eignet sich die FDH aus *Candida boidinii*, welche die Oxidation des Formiats zu CO₂ bei gleichzeitiger Reduktion von NAD zu NADH katalysiert. Das thermodynamische Gleichgewicht liegt weit auf der Seite der Produkte CO₂ und NADH [Schütte *et al.*, 1976]. Formiat ist eine preiswerte und sichere Wasserstoffquelle, das Coprodukt CO₂ kann leicht abgetrennt werden und bisher sind keine Fälle bekannt, in denen Formiat bzw. CO₂ selbst bei hohen Konzentrationen einen negativen Einfluß auf das Synthesenzym besitzt. Wassermischbare organische Lösungsmittel als Regeneriersubstrate/-produkte wie Ethanol/Acetaldehyd oder Isopropanol/Aceton zeigen hingegen häufig eine desaktivierende Wirkung. Es sind bereits viele Dehydrogenase-katalysierte Reaktionen für die reduktive Aminierung mit einer NADH-Regeneration durch die FDH in Batch- und kontinuierlichen Verfahren beschrieben worden [Wichmann *et al.*, 1981; Bossow & Wandrey, 1987; Kula & Wandrey, 1987; Kula, 1994]. Bei einem Überschuß an Formiat können hohe Umsetzungen der Edukte beobachtet werden, maximale Zykluszahlen für NADH von über 600.000 sind dokumentiert [Hummel *et al.*, 1987].

1.3.3 Die enzymatische Synthese von L-tert-Leucin

Die enantiomerenreine Synthese von L-tert-Leucin aus Trimethylpyruvat und dessen Anwendungen sind beschrieben worden [Bommarius *et al.*, 1992; Bommarius *et al.*, 1995]. L-tert-Leucin wird im industriellen Maßstab mit Hilfe der Leucindehydrogenase (LeuDh) durch reduktive Aminierung der α -Ketosäure Trimethylpyruvat hergestellt. Die NAD-abhängige FDH aus *Candida boidinii* dient dabei zur *in situ*-Regenerierung des Cofaktors NADH (Abbildung 2). Dies ist möglich, da das Enzymsystem aus LeuDh und FDH NAD(H) als gemeinsamen Cofaktor nutzt. Für die Produktion von 1 kg L-tert-Leucin werden zur Regeneration des NADHs 2.300 U an FDH verbraucht [Kragl *et al.*, 1992].

L-tert-Leucin wird entweder direkt als chiraler Baustein, z.B. in der chemischen Synthese von chiralen Aminoalkoholen oder als Bestandteil von Peptiden eingesetzt, z.B. als Anti-Tumor Agentien oder HIV-Protease-Inhibitoren [Liese *et al.*, 2000]. Letztere können *in vivo*, vermutlich aufgrund der sterisch anspruchsvollen tert-Butylgruppe, nur langsam hydrolysiert werden, so daß pharmakologische Wirkstoffe mit L-tert-Leucin als Baustein eine verlängerte Wirkung im Körper aufweisen.

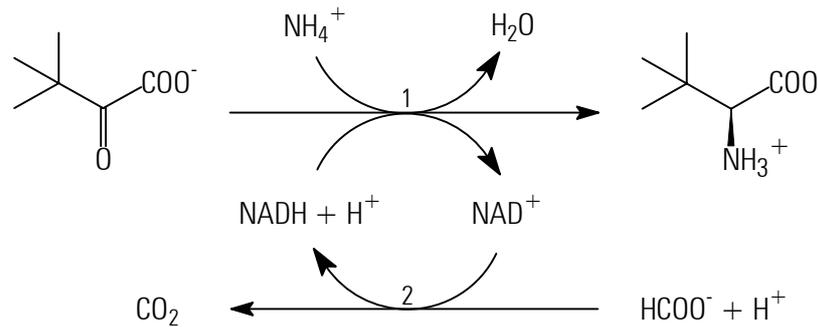


Abbildung 2: Enzymatische Synthese von *L-tert*-Leucin durch reduktive Aminierung im Enzymgekoppelten Prozeß. Leucindehydrogenase (LeuDH) (1), Formiatdehydrogenase (FDH) (2).

1.4 Die Formiatdehydrogenasen

1.4.1 Eigenschaften

Formiatdehydrogenasen (FDHs) oxidieren Formiat und kommen in Mikroorganismen und höheren Pflanzen vor [Popov & Lamzin, 1994]. Sie gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen und können in zwei Gruppen eingeteilt werden.

Die erste stellt eine heterogene Gruppe von Eisen-Schwefel Proteinen dar, die aus Mikroorganismen stammen und Unterschiede in ihren physiologischen Funktionen, zellulären Lokalisationen, Substratspezifitäten, Art des Elektronenakzeptors und der prosthetischen Gruppe aufweisen. Die Gemeinsamkeiten liegen in einem hohen Molekulargewicht von ca. 300 kDa, einer komplexen Quartärstruktur, der Anwesenheit einer prosthetischen Gruppe und der Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff. Letzteres verhindert ihren Einsatz in der Enzymkatalyse, trotz deutlich höherer katalytischer Aktivitäten im Vergleich zu den NAD-abhängigen FDHs [Popov & Lamzin, 1994].

Die zweite Gruppe besteht aus den NAD-abhängigen FDHs. Sie besitzen in der Regel keine prosthetischen Gruppen oder Metallionen, sie sind Homodimere und weisen ein niedrigeres Molekulargewicht von ca. 70 bis 100 kDa auf. Sie zeigen eine relativ niedrige spezifische Aktivität, eine niedrige Affinität zum Substrat Formiat und ein weites pH-Optimum. In Methyloprophen ist die NAD-abhängige FDH in der Methanoldissimilation im Stoffwechselweg vom C_1 zum CO_2 das terminale Enzym und versorgt die Zellen mit Energie in Form von Reduktionsäquivalenten. Prokaryonten und Eukaryonten besitzen unterschiedliche Wege der Methanolverwertung. Methyloprope Bakterien oxidieren Methanol zu CO_2 entweder über den Aldehyd und die Säure (Typ I) oder durch zyklische Mechanismen am Formaldehyd-Schritt (Typ II). Dagegen bauen alle bekannten methyloprophen Hefen Methanol zu CO_2 über Formaldehyd als Zwischenprodukt ab [Anthony, 1975; Rodionov & Zakharova, 1980].

1.4.2 Die NAD-abhängige Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*

1.4.2.1 Funktion im Metabolismus

Die FDH aus der fakultativ methylotrophen Hefe *Candida boidinii* ist, wie alle anderen NAD-abhängigen FDHs, das terminale Enzym in der Methanoldissimilation. Im Vergleich zur FDH aus *Pseudomonas sp.* 101 [Rodionov & Zakharova, 1980; Egorov *et al.*, 1982], *Hansenula polymorpha* [van Dijken *et al.*, 1976] und *Pichia sp.* [Patel *et al.*, 1983], die S-Formylglutathion als Substrat bevorzugen, ist die FDH aus *Candida boidinii* substratspezifisch für Formiat [Neben *et al.*, 1980]. Daher wird hier die Methanoldissimilation mit Formiat als Zwischenprodukt angenommen (Abbildung 3). Sowohl die Alkoholoxidase, die die Oxidation des Methanols zum Formaldehyd katalysiert, als auch die Katalase, die das durch die Alkoholoxidase produzierte toxische Wasserstoffperoxid zu Wasser abbaut, konnten in den Peroxisomen von *Candida boidinii* nachgewiesen werden [Roggenkamp *et al.*, 1975].

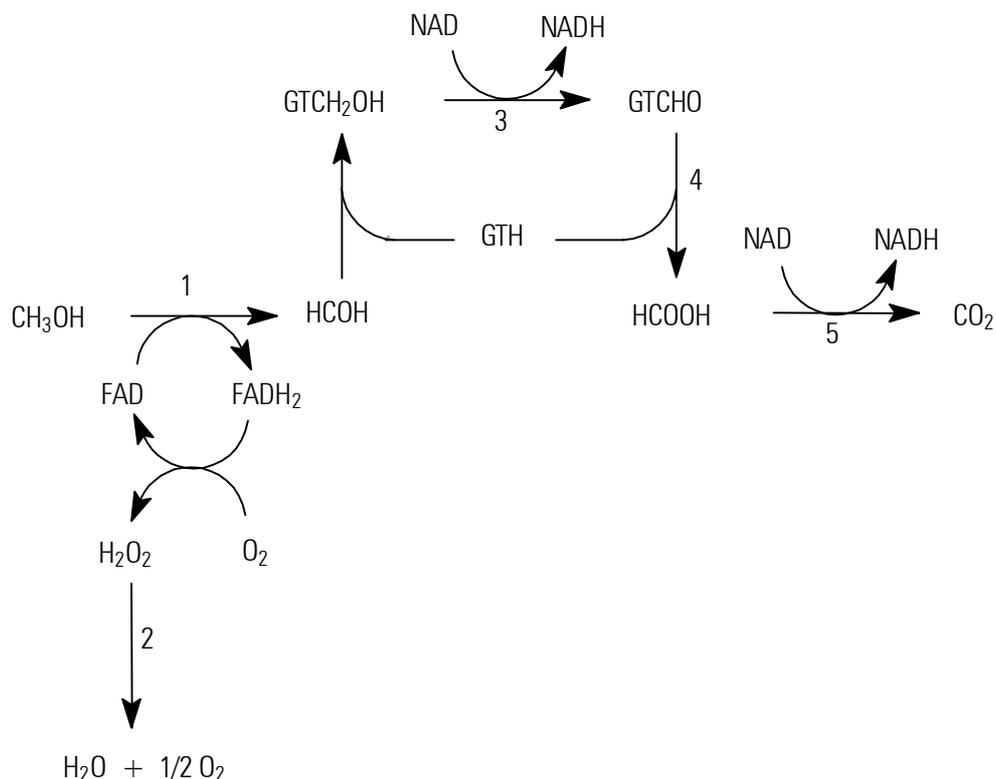


Abbildung 3: Methanoldissimilation bei der Hefe *Candida boidinii*. S-Hydroxymethylglutathion (GTCH_2OH), S-Formylglutathion (GTCHO), Glutathion (GTH). Beteiligte Enzyme: Methanoloxidase (1), Katalase (2), Formaldehyddehydrogenase (3), S-Formylglutathionhydrolase (4), Formiatdehydrogenase (5).

Tabelle 3: Aminosäure-Sequenzvergleich der *Candida boidinii*-FDH mit der *Pseudomonas sp.* 101-FDH. *Candida boidinii*-FDH (1), *Pseudomonas sp.* 101-FDH (2). Gleiche Aminosäure (*), sehr ähnliche Aminosäure (:), ähnliche Aminosäure (.).

Sequenzvergleich

```

(1) MKIVLVLYDAGKHAADDEE-----KLYGCTENKLGIA
(2) AKVLCVLYDDPVDGYPKTYARDDLPKIDHYPGGQTLPTPKAIDFTPGQLLGSVSGELGLR
   *: : ****      . .      :                               : * * . . . . : ** :

(1) NWLKDQGHELITTSKDKEGETSELDKHIPDADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVVA
(2) KYLESNGHTLVVTSKDKGPDVFERELVDADVVISQPFWPAYLTPERI AKAKNLKLALTA
   : : * . . : ** * : . * * * * : * * : : : : : * * : * * * : * * : * * * * * . . : *

(1) GVGSDHIDL DYINQ TGKKISVLEVTGSNVVSVAEHVVM TMLVLRNFVPAHEQI INHDWE
(2) GIGSDHVDLQ--SAIDRNVTVAEVTYCNSISVAEHVMMILSLVRNYLPSHEWARKGGWN
   * : * * * * : ** : . . : : : : * * * * . * : * * * * * * * : * * * * : * : * * : . * :

(1) VAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVLERLLPFNPKELLYDYQALPKEAEEKVGARR
(2) IADCVSHAYDLEAMHVGTV AAGRIGLAVLRRLAPFDVH-LHYTDRHRLPESVEKELNLTW
   : * . . . * * * : * . : * : . * * * * * * * * * * * * * : : * * * : * * : . . * : : .

(1) VENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLINKELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAAL
(2) HATREDMYPVCDVVTLNCPHPETEHEMINDETLKLFKRGAYIVNTARGKLCRDAVARAL
   . * : : . . * : * * : * . * * * . * : * * . * * . * * : * * : * * * * * : * : * * *

(1) ESGQLRGYGGDVWFPPQAPAKDHPWRDMRNKYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNIL
(2) ESGRLAGYAGDVWFPPQAPAKDHPWRM-----PYNGMTPHISGTTLTAQARYAAGTREIL
   * * * : * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

(1) ESFFTGKFDYRPQDI ILLNGEYVTKAYGKHDKK-----
(2) ECFFEGRPIRDEYLI VQGGALAGTGAHSYSKGNATGGSEEAAKFKKAV
   * . * * * : * : * : . . * * : . . :

```

Die bei der Methanoldissimilation entstehenden Reduktionsäquivalente dienen der Deckung des Energiebedarfs beim Wachstum. Daß die FDH im Energiestoffwechsel der Zelle involviert ist, wird auch daran ersichtlich, daß ihre K_i -Werte für NADH und ATP im Bereich der intrazellulären Konzentrationen liegen [Kato *et al.*, 1979]. D.h., die Aktivität der FDH ist streng reguliert und wird durch hohe NADH- und ATP-Konzentrationen, was Energieüberschuß in der Zelle signalisiert, gehemmt.

Die Oxidation des Formiats stellt nicht nur einen energieliefernden Prozeß dar, sondern dient wahrscheinlich auch dazu, cytotoxisch hohe Formiatkonzentrationen zu senken [Rodionov & Zakharova, 1980].

1.4.2.2 Die räumliche Struktur

Die FDH aus *Candida boidinii* gehört der Familie der D-spezifischen 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen an. Enzyme dieser Familie besitzen eine hohe Sequenzähnlichkeit zur FDH aus *Pseudomonas sp.* 101, der einzigen FDH, deren Struktur bisher aufgeklärt worden ist. Mit über 50% an identischen Aminosäuren weist die FDH aus *Candida boidinii* eine hohe Aminosäuresequenzhomologie zur FDH aus *Pseudomonas sp.* 101 auf (Tabelle 3). Aufgrund dieser hohen Sequenzhomologie und der vergleichbaren biochemischen Eigenschaften, kann davon ausgegangen werden, daß die räumliche Struktur beider Enzyme ähnlich ist.

Die FDH aus *Pseudomonas sp.* 101 ist sowohl in der Apo-, als auch in der Holo-Form kristallisiert und ihr Reaktionsmechanismus aufgeklärt worden [Tishkov & Egorov, 1985; Lamzin *et al.*, 1992; Lamzin *et al.*, 1994; Popov & Lamzin, 1994]. Die FDH aus *Pseudomonas sp.* 101 ist ein Homodimer und besteht aus zwei gleichen Untereinheiten mit je einem aktiven Zentrum pro Untereinheit. Wie bei vielen anderen Dehydrogenasen

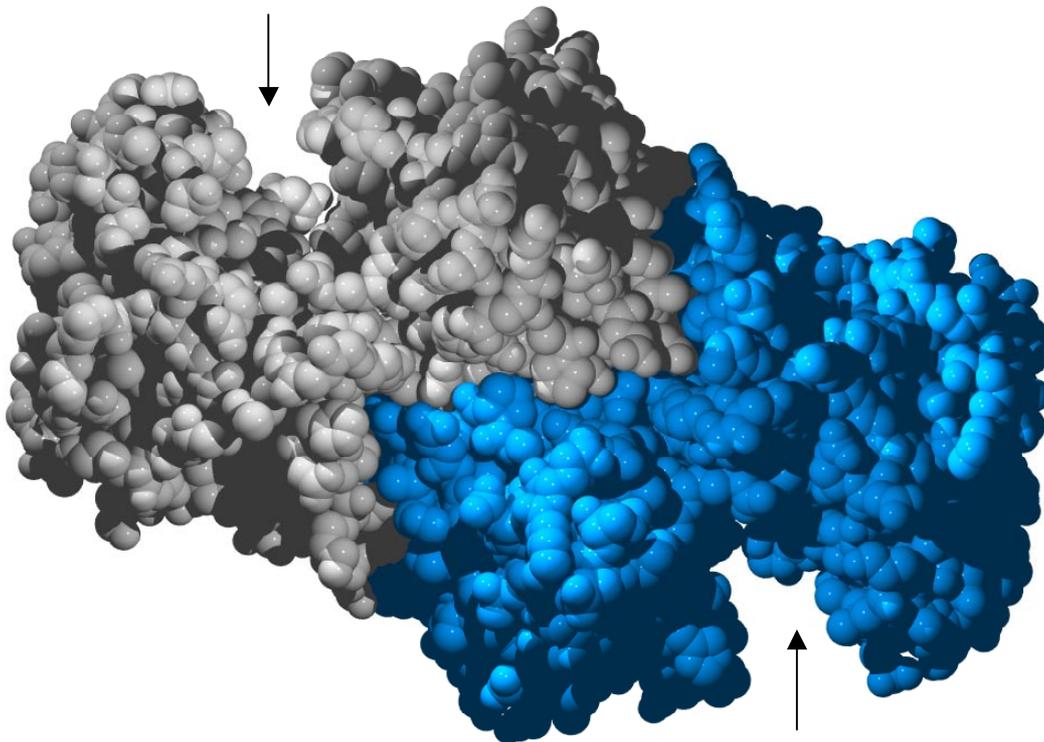


Abbildung 4: Kristallstruktur der FDH aus *Pseudomonas sp.* 101. Dargestellt ist die Apo-Form, d.h., ohne Cofaktor und Substrat. Die beiden Untereinheiten sind zur besseren Unterscheidung farblich unterschiedlich dargestellt. Der Substratkanal des aktiven Zentrums jeder Untereinheit ist mit einem Pfeil angedeutet [Lamzin *et al.*, 1994]. Wasserstoffe an den Kohlenstoffatomen nicht dargestellt.

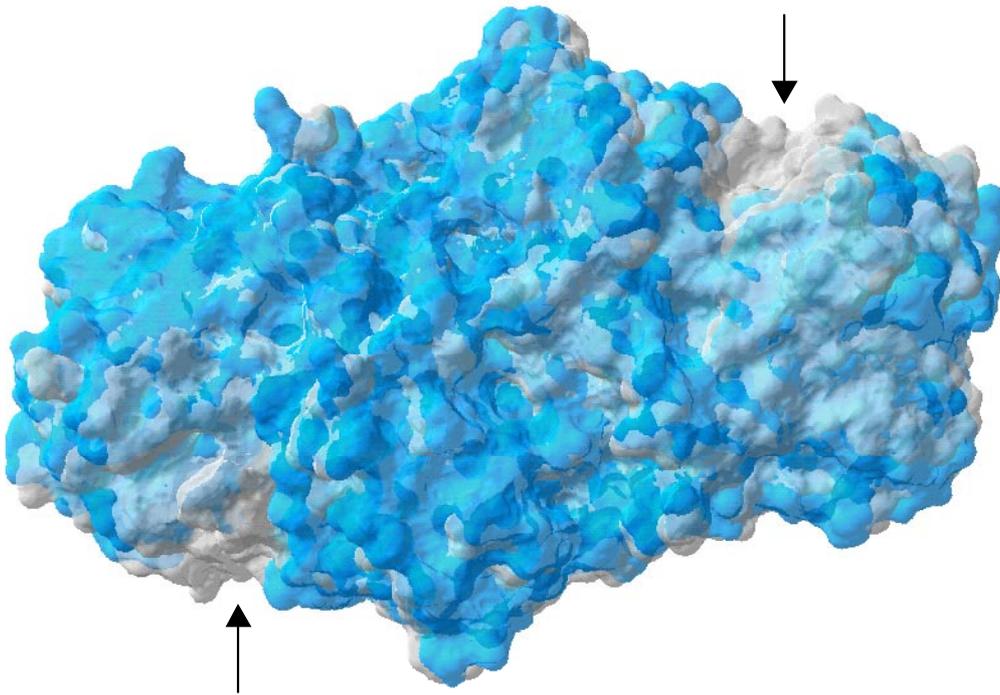


Abbildung 5: Oberflächenansicht der Kristallstruktur der FDH aus *Pseudomonas sp.* 101. Dargestellt ist die molekulare Oberfläche der Apo-, als auch der Holo-Form. Die Substratkanäle der Untereinheiten der Holo-Form sind durch Pfeile gekennzeichnet. Zu erkennen ist die Konformationsänderung, die die FDH durchführt, wenn die Substrate NAD und Formiat gebunden haben und die Substratkanäle in der Apo-Form geschlossen sind [Lamzin *et al.*, 1994]. Apo-Form, Substratkanal geöffnet (blau); Holo-Form, Substratkanal geschlossen (grau).

existieren in einer Untereinheit zwei globuläre Domänen, die Cofaktor-bindende Domäne und die katalytische Domäne. Die Cofaktor-bindende Domäne befindet sich nahe der Symmetrieachse des FDH-Dimers und bildet die Kontaktfläche zwischen den Untereinheiten (Abbildung 4). Sie ist verantwortlich für die Erkennung und Bindung des Cofaktors und ihre Struktur ist, im Gegensatz zur katalytischen Domäne, innerhalb der Familie der NAD-abhängigen Dehydrogenasen konserviert [Lamzin *et al.*, 1992; Kutsenko *et al.*, 1994].

Die katalytische Domäne liegt an der Peripherie des Dimers. In der Apo-Form ist der Zugang zum aktiven Zentrum weit geöffnet, so daß die Bindung des Formiats und des relativ großen Cofaktors ermöglicht wird. Die Konformationsänderung im Holo-Enzym führt dazu, daß das Formiat und das NAD in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, so daß der Übergangszustand stabilisiert wird und die Reaktion ablaufen kann (Abbildung 5). Die α -Helix des C-Terminus liegt im Holo-Enzym über dem Substratkanal und schließt das aktive Zentrum ab.

1.4.2.3 Der Reaktionsmechanismus

Die Kinetik der Oxidation des Formiats entspricht bei der *Candida boidinii*-FDH dem Ordered Bi-Bi-Mechanismus [Kato *et al.*, 1979; Blanchard & Cleland, 1980]. Zunächst bindet das NAD an das aktive Zentrum, erst dann kann das Formiat gebunden werden. Die Freisetzung der Produkte erfolgt in der Reihenfolge CO₂, dann NADH (Abbildung 6). Im Gegensatz dazu besitzt die *Pseudomonas sp.* 101-FDH einen Random Bi-Bi-Mechanismus [Popov & Lamzin, 1994].



Abbildung 6: Reaktionsschema der Ordered Bi-Bi-Kinetik der *Candida boidinii*-FDH. NAD (A), Formiat (B), CO₂ (P), NADH (Q), Enzym (E).

Anhand der Analyse der Röntgenkristallstruktur der *Pseudomonas sp.* 101-FDH konnten Aminosäurereste identifiziert werden, die das aktive Zentrum dieses Enzyms bilden und in allen bisher bekannten FDH-Sequenzen konserviert vorliegen [Allen & Holbrook, 1995, Galkin *et al.*, 1995]. Diese Aminosäurereste sind auch bei der *Candida boidinii*-FDH an der Katalyse beteiligt [Labrou & Rigden, 2001]. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, daß sich die Katalysemechanismen beider FDHs im wesentlichen nicht unterscheiden.

Die Wechselwirkungen zwischen den im aktiven Zentrum beteiligten Aminosäureseitenketten und den Substraten Formiat und NAD bewirken die Polarisierung der C-H-Bindung des Formiats und die positive Partialladung am C₄-Atom im Nicotinamid-Ring des NADs (Abbildung 7). Dadurch werden die Grundzustände destabilisiert, die Aktivierungsenergie für die Reaktion durch die Stabilisierung des Übergangszustandes herabgesetzt und somit der Hydridtransfer vom Formiat zum NAD ermöglicht.

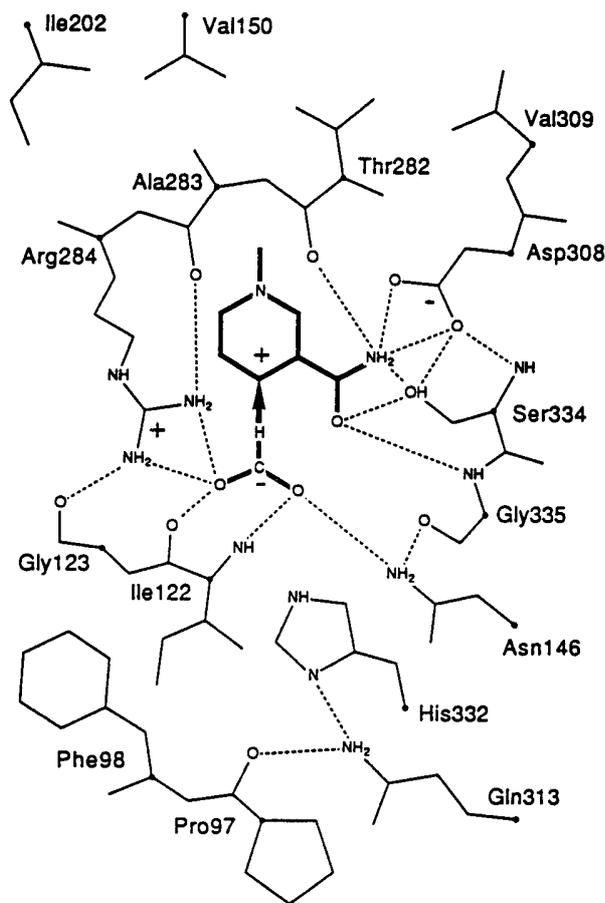


Abbildung 7: Räumliche Darstellung des aktiven Zentrums der *Pseudomonas sp.* 101-FDH. Gezeigt ist die Lage des NADs und Formiats im aktiven Zentrum und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren. Die Wasserstoffbrücken-Bindungen sind mit gestrichelten Linien dargestellt [Lamzin *et al.*, 1994].

1.5 Produktion und Aufarbeitung der Formiatdehydrogenasen

1.5.1 Produktion

1.5.1.1 Wachstumsgekoppelte Produktion mit *Candida boidinii*

Für Anwendungen im größeren Maßstab sollte die FDH in ausreichenden Mengen verfügbar sein. Gegenwärtig wird die kommerziell erhältliche NAD-abhängige FDH hauptsächlich mit Hilfe der Hefe *Candida boidinii* gewonnen [Weuster-Botz *et al.*, 1994; Weuster-Botz & Wandrey, 1995]. Die NAD-abhängige FDH wird als intrazelluläres Protein in hohen Konzentrationen in der Hefe *Candida boidinii* beim Wachstum auf

Tabelle 4: Vergleich der Preise von chemischen Katalysatoren und Enzymen [Rozzell, 1999].

Art	Katalysator	Preis [€ kg ⁻¹]
chemische Katalysatoren	BINAP	44.000
	ChiraPhos	11.000
	Platin	13.200
	Sharpless	11.000
	Pd(Diphos) ₂	5.500
	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	2.200
	Jacobsen	1.100
	Chirald	550
	Raney Nickel	33
Enzyme	Lactatdehydrogenase	110.000
	Schweineleberesterase	16.500
	Penicillinamidase	11.000
	Aspartase	11.000
	Trypsin	5.500
	Lipase	5.500
	Glucoseisomerase	550
	Detergenzprotease	275
	Glucoamylase	110

Methanol als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle gebildet [Sahm, 1977]. Durch Optimierung des Kultivierungsmediums konnte in einem kontinuierlichen Produktionsverfahren die Raum-Zeit-Ausbeute an FDH von 100 auf 150 U l⁻¹ h⁻¹ gesteigert werden [Weuster-Botz *et al.*, 1995].

1.5.1.2 Produktion rekombinanter Proteine mit *Escherichia coli*

1.5.1.2.1 Hochzelldichtekultivierung

Die Produktion des Zielproteins mit Hilfe von rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen weist einige Vorteile gegenüber den Wildtyp-Stämmen auf. Es wurde gezeigt, daß rekombinante Proteine in *Escherichia coli* in einer Konzentration von 19 g l⁻¹ exprimiert werden können [Strandberg *et al.*, 1994]. Ein weiterer Vorteil ist die relativ kurze Prozeßzeit von ein bis zwei Tagen bei Fed-Batch-Kultivierungen, im Gegensatz zu mehrwöchigen kontinuierlichen Prozessen [Riesenberg & Guthke, 1999]. Infolgedessen, und wegen der Möglichkeit, rekombinante Protein einfacher aufarbeiten zu können, sind die Enzymkosten gegenüber den Kosten für chemische Katalysatoren vergleichbar geworden [Rozzell, 1999] (Tabelle 4).

Escherichia coli ist der am häufigsten eingesetzte Wirtsorganismus zur Produktion rekombinanter Proteine da er zu den am besten charakterisierten Mikroorganismen gehört und ein etabliertes Expressionssystem darstellt. Jedoch können in *Escherichia coli* einige komplexe Proteine nicht in ihrer aktiven Form exprimiert werden, wie z.B. solche, die mehrere Disulfidbrücken und gleichzeitig ungepaarte Thiole besitzen, oder Proteine, die post-translationale Modifikationen, wie z.B. Glycosylierungen, zur Ausbildung ihrer Aktivität benötigen [Rietsch & Beckwith, 1998]. Ein weiteres Problem ist die Bildung von Inclusion-Bodies, in denen das überexprimierte Protein unlöslich und daher nicht aktiv vorliegt [Clark, 2001]. Trotz dieser Einschränkungen sind mittlerweile unzählige Verfahren zur rekombinanten Produktion von Proteinen in *Escherichia coli* beschrieben worden [Panda *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2000; Wilms *et al.*, 2001].

Da die meisten Proteine intrazellulär in *Escherichia coli* akkumuliert werden, ist die Produktivität bzw. die Raum-Zeit-Ausbeute proportional zur gebildeten Zellkonzentration. Aus diesem Grunde wurden Techniken zur Hochzelldichtekultivierung entwickelt, mit dem Ziel, die Zellkonzentration und damit die Produktivität steigern zu können. Gleichzeitig sind mit der Hochzelldichtekultivierung Vorteile, wie die Reduktion des Kultivierungsvolumens, eine vereinfachte Aufarbeitung, weniger Abwasser und geringere Investitionen in die Ausstattung verbunden [Lee, 1996; Riesenberg & Guthke, 1999].

Bei der Hochzelldichtekultivierung werden meist Fed-Batch-Verfahren zur Erzielung der hohen Zelldichten eingesetzt. Mittlerweile können hohe Zelldichten, d.h., Trockenzellmassen von mehr als 50 g l^{-1} , routinemäßig bei der rekombinanten Expression in *Escherichia coli* realisiert werden [Riesenberg & Guthke, 1999].

1.5.1.2.2 Zufütterungsstrategien

Hochzelldichtekultivierungen werden normalerweise unter Bedingungen der Substratlimitierung, wie z.B. der Limitierung der Kohlenstoffquelle, durchgeführt. Es werden nicht-gesteuerte, gesteuerte und geregelte Strategien eingesetzt (Tabelle 5).

Die gesteuerte exponentielle Zufütterungsstrategie wird bei der Hochzelldichtekultivierung am häufigsten eingesetzt. Sie verbindet die Vorteile des Zellwachstums bei einer konstanten spezifischen Wachstumsrate und der gleichzeitigen Vermeidung schädlicher Acetat-Bildungen durch Einstellung der Wachstumsrate unter den kritischen Schwellenwert, d.h., zwischen $0,1$ bis $0,3 \text{ h}^{-1}$ [Winter & Neubauer, 1999]. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Zufütterungsrate für das exponentielle Zellwachstum mit konstanter Wachstumsrate mit einer einfachen Massenbilanz berechnet werden kann [Korz *et al.*, 1995; Lee, 1996].

Tabelle 5: Vergleich der verschiedenen Zufütterungsstrategien bei Fed-Batch-Kultivierungen [Lee, 1996].

Strategie	Methode	Beschreibung
nicht-gesteuert	konstant	konstante, vorbestimmte Rate; dadurch sinkt die Wachstumsrate ständig
gesteuert	konstant gesteigert	konstant gesteigerte (Stufen, linear) Rate; das Absinken der Wachstumsrate kann kompensiert werden
	exponentiell gesteigert	exponentielle Rate; dadurch kann die Wachstumsrate konstant gehalten werden
geregelt nach	Gelöstsauerstoffkonzentration (DO-stat)	nach Substratverbrauch steigt die Gelöstsauerstoffkonzentration und Substrat wird nachdosiert
	pH-Wert (pH-stat)	nach Substratverbrauch ändert sich der pH-Wert und Substrat wird nachdosiert
	CO ₂ -Bildungsrate (CER)	nach Substratverbrauch sinkt die CO ₂ -Bildungsrate und Substrat wird nachdosiert
	Zellkonzentration	anhand der Zellkonzentration wird die Zufütterungsrate berechnet
	Substratkonzentration	anhand der Substratkonzentration wird die Zufütterungsrate berechnet

1.5.1.2.3 Produktivität

Die theoretisch maximal erzielbaren Trockenzellmassen von *Escherichia coli* liegen in einem Bereich von 200 g l⁻¹, ab einer Konzentration von 220 g l⁻¹ verliert die Zellsuspension ihren Flüssigkeitscharakter und wird hochviskos [Markl *et al.*, 1993]. Die bisher höchste gemessene Trockenzellmassen mit 175 g l⁻¹ wurde bei der rekombinanten Produktion von β -Polyhydroxybuttersäure in *Escherichia coli* erreicht [Lee & Chang, 1994]. Die produktivsten beschriebenen Verfahren liegen in einem Bereich von 1 bis 7 g l⁻¹ (Tabelle 6). Die höchste erzielte Produktivität liefert 19 g l⁻¹ an rekombinantem Protein [Strandberg *et al.*, 1994].

Zwischenzeitlich wurde ein Verfahren beschrieben, mit dem die bakterielle FDH aus *Pseudomonas sp.* 101 rekombinant in *Escherichia coli* produziert werden kann [Tishkov *et al.*, 1999]. Mit diesem Verfahren kann eine Raum-Zeit-Ausbeute an FDH von 280 U l⁻¹ h⁻¹ mit einer FDH-Expression von 50% des Gesamtproteins erzielt werden.

Tabelle 6: Produktion rekombinanter Proteine in *Escherichia coli* im Vergleich. Trockenzellmasse (DCW) [Lee, 1996 (1); Shin *et al.*, 1997 (2); Lim & Jung, 1998 (3); Li *et al.*, 1998 (4); Panda *et al.*, 1999 (5); Schmidt *et al.*, 1999 (6); Choi *et al.*, 2000 (7); Wilms *et al.*, 2001 (8)].

Stamm	Medium	Strategie	DCW [g l ⁻¹]	Protein	Proteinkonz. [g l ⁻¹]	Ref.
KA197	definiert	exponentiell	77	Protein A- β -Galactosidase	19,2	1
N4830-1	semi-definiert	exponentiell	-	Interferon- γ	7,4	3
BL21(DE3)	definiert	exponentiell	-	Humanes Mini-Proinsulin	7,0	2
JM103	semi-definiert	DO-stat	125	<i>Bacillus thuringiensis</i> -Toxin	6,6	1
DH1	semi-definiert	DO-stat	-	Humanes Proapo A-I	6,0	1
AM-7	definiert	Stufen	68	Humanes α -Konsensus-Interferon	5,6	1
HB101	definiert	pH-stat	-	Alkalische Phosphatase	5,2	7
BL21	definiert	exponentiell	70	Humanes Insulin	4,5	6
TG1	definiert	exponentiell	-	Interferon- α	4,0	1
W3110	definiert	exponentiell	100	L-N-Carbamoylase	3,8	8
MM-294	definiert	Glucosekonz.	-	Humanes Interleukin 2	3,3	1
M15	semi-definiert	konstant	-	Ovares Wachstumshormon	3,2	5
W3110	semi-definiert	exponentiell	-	Bovines Somatotropin	2,9	1
YK537	definiert	exponentiell	21,2	Humanes Knochenprotein 2A	2,8	4
B	semi-definiert	exponentiell	55	Humanes Interleukin 1- β	2,2	1
MC1061	komplex	Stufen	-	Humaner ILGF-1	1,8	1
M5248	semi-definiert	DO-stat	60	Humanes Interleukin 2	1,2	1
MC1061	komplex	konstant	-	Humanes Wachstumshormon	1,1	1
RV308	definiert	Zellkonz.	50	Mini-Antikörper	1,0	1
HB101	semi-definiert	Acetatkonz.	21	Humaner EGF	0,06	1

1.5.2 Aufarbeitung im technischen Maßstab

Mittlerweile sind verschiedene Protokolle zur Aufarbeitung der FDH aus *Candida boidinii* im Labor-, als auch im halbtechnischen Maßstab beschrieben worden. Im halbtechnischen Maßstab werden zum einen Flüssig/Flüssig-Extraktionen [Kroner *et al.*, 1982 a; Kroner *et al.*, 1982 b; Walsdorf *et al.*, 1990; Tishkov *et al.*, 1999], darunter auch Affinitäts-Flüssig/Flüssig-Extraktionen, eingesetzt [Cordes & Kula, 1986; Cordes & Kula, 1994]. Zum anderen werden chromatographische Verfahren, wie die Anionenaustausch- und Affinitätschromatographie, verwendet [Gieren; Labrou, 2000; Reichert *et al.*, 2001].

1.5.2.1 2-Phasen-Extraktion

Wäßrige 2-Phasen-Systeme setzen sich normalerweise aus einer wäßrigen Lösung mit zwei hydrophilen Polymeren oder einem Polymer/Salz-Gemisch zusammen. Oberhalb kritischer Konzentrationen dieser Komponenten findet eine spontane Phasentrennung statt, in den zwei Phasen liegen dann die jeweiligen Komponenten angereichert vor. Der Einsatz von wäßrigen, anstatt organischer Lösungsmittel bei nichtmischbaren 2-Phasen-Systemen ermöglicht es, diese klassische Separationstechnik bei der Extraktion von Zellen, Zellmembranen, Zellorganellen und auch Makromolekülen, wie Proteinen, einsetzen zu können [Kula, 1990; Zaslavsky, 1994].

Die wäßrige 2-Phasen-Extraktion wird bei der halbtechnischen Aufarbeitung bei vielen Proteinen eingesetzt, auch die NAD-abhängige FDH aus der Hefe *Candida boidinii* wurde damit aufgearbeitet (Reinheit: 35 – 50%, Ausbeute: 75%) [Kroner *et al.*, 1982 a; Kroner *et al.*, 1982 b]. Das gleiche Aufarbeitungsverfahren wurde auch bei der Reinigung der rekombinanten *Pseudomonas sp.* 101-FDH aus *Escherichia coli* eingesetzt (Reinheit: 45 – 55%, Ausbeute: 75%) [Tishkov *et al.*, 1999].

Eine Vereinfachung der Aufarbeitung konnte durch Modifikation der 2-Phasen-Extraktion erreicht werden. Hierbei werden nur zwei Extraktionsschritte durchgeführt und anschließend eine Anionenaustauschchromatographie nachgeschaltet (Reinheit: 40%, Ausbeute: 70%) [Gieren].

Die Reinigung von Proteinen mit wäßrigen 2-Phasen-Systemen kann mit Hilfe von Affinitätsliganden gesteigert werden [Kroner *et al.*, 1982 a; Kroner *et al.*, 1982 b; Walsdorf *et al.*, 1990]. Diese Liganden können Cofaktoren oder Inhibitoren des Proteins sein und werden kovalent an Polyethylenglykol gebunden. Mit Hilfe von Procion Red HE-3B als Pseudo-Analogon zum Cofaktor NAD konnte die FDH aus der *Candida boidinii* gereinigt werden (Reinheit: 50%, Ausbeute: 74%) [Cordes & Kula, 1986; Cordes & Kula, 1994].

1.5.2.2 Chromatographie

Mit einem kombinierten Verfahren aus Anionenaustausch- und Affinitätschromatographie kann die FDH aus der *Candida boidinii* gereinigt werden. Als Pseudo-Analogon zum Cofaktor NAD wird Cibacron Blue 3GA verwendet (Reinheit: 100%, Ausbeute: 64%) [Labrou, 2000].

Ein chromatographisches Verfahren zur Aufreinigung der rekombinanten *Candida boidinii*-FDH aus *Escherichia coli* im halbtechnischen Maßstab stellt die Affinitätschromatographie im Fließbett dar [Reichert *et al.*, 2001]. Hierbei wird nach Zellaufschluß die Suspension über ein Fließbett gegeben, die FDH bindet an dem Pseudo-

Analogon zum Cofaktor NAD, Procion Red HE-3B, und kann anschließend mit NAD eluiert werden. Anschließend wird eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (Reinheit: > 95%, Ausbeute: 75%).

1.6 Maßgeschneiderte Katalysatoren

1.6.1 Anforderungen an Enzyme als technische Katalysatoren

Häufig werden Enzyme für Anwendungen in industriellen Prozessen mit Eigenschaften benötigt, wie sie nicht in natürlich vorkommenden Enzymen gefunden werden, wie z.B. eine hohe spezifische Aktivität des Katalysators, und das auch bei unnatürlichen Substraten. Außerdem wird eine hohe Stabilität unter Prozeßbedingungen, d.h., hohe Temperaturen, extreme pH-Werte und der Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln, Detergentien und Oxidantien gefordert. Methoden zur Herstellung maßgeschneiderter Enzyme sind das Protein-Design und die gerichtete Evolution [Voigt *et al.*, 2000; Bornscheuer & Pohl, 2001].

1.6.2 Methoden zur Herstellung maßgeschneiderter Enzyme

1.6.2.1 Rationales Protein-Design

In den späten 1980er Jahren wurde erstmals gezeigt, daß man einzelne Aminosäuren von Proteinen durch ortsspezifische Mutagenese ihrer Gene austauschen kann. Dies ermöglichte nun, Enzyme gezielt verändern zu können und war der Startschuß für den Beginn des rationalen Protein-Designs [Balland *et al.*, 1985; Garvey *et al.*, 1990; Wagner & Benkovic, 1990]. Zum Beispiel konnte die Thermostabilität des Lysozyms durch den gezielten Austausch zweier Aminosäuren im Protein [Matthews *et al.*, 1987] oder durch die Einführung zweier Disulfidbrücken [Matsumara *et al.*, 1989] erhöht werden. Ein weiteres Beispiel ist die Erhöhung der Katalysegeschwindigkeit der Aspartatamino-transferase mittels ortsspezifischer Mutagenese [Vacca *et al.*, 1995]. Hier wurde die Geschwindigkeit Alanin zu racemisieren, um den Faktor sieben erhöht. Durch den Austausch eines Aspartatrestes gegen Alanin in der Cofaktor-Bindungsstelle einer NAD-abhängigen Lactatdehydrogenase konnte die Affinität des Enzyms zu NADP gesteigert werden [Bernard *et al.*, 1995]. Die Aminopeptidase PepC konnte durch Entfernen der letzten vier Aminosäuren am C-Terminus zu einer Oligopeptidase umgewandelt werden [Mata *et al.*, 1999]. Bei der 5-Lipoxygenase aus humanen Leukozykten wurde durch den Austausch von vier Aminosäuren eine 15-Lipoxygenase erhalten [Schwarz *et al.*, 2001].

Dieses sequenzbasierte Design von Proteinen setzt die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Proteins, gewonnen durch die Röntgenkristallstrukturanalyse oder NMR-Techniken, und die nachfolgende Modellierung dieser Struktur am Computer voraus. Anschließend wird mit Primern die ortsspezifische Mutation in die Gensequenz eingeführt, das rekombinante Protein in einem Wirtsorganismus exprimiert und biochemisch charakterisiert [Balland *et al.*, 1985; Harris & Craik, 1998; Voigt *et al.*, 2000].

Wegen dieser komplizierten Vorgehensweise ist es nur unter großem Zeitaufwand möglich, eine größere Anzahl verschiedener Proteine gleichzeitig zu erzeugen. Indes sind die zwei größten Probleme des rationalen Protein-Designs, erstens, daß die Sequenz-Struktur-Beziehungen und zweitens, daß die Struktur-Funktions-Beziehungen in den Proteinen nur unzureichend verstanden werden. Es ist immer noch nicht möglich, die Auswirkungen eines Aminosäureaustausches auf die Struktur zuverlässig vorherzusagen zu können. Selbst wenn die räumliche Struktur dieses veränderten Proteins richtig berechnet werden könnte, können die Auswirkungen dieser Konformationsänderung auf die veränderte Funktion dieses Proteins noch nicht vorhergesagt werden [Ryu & Nam, 2000].

Dieser Umstand behindert die rationale Vorgehensweise durch gezielten Aminosäureaustausch in vielen Fällen und hat schnell dazu geführt, daß eine neue Technik zur Gewinnung von Proteinen mit gewünschten Eigenschaften entwickelt wurde: Die gerichtete Evolution.

1.6.2.2 Gerichtete Evolution: „When blind is better“

Um die molekulare Biodiversität schneller nutzbar machen zu können, wurden neue Methoden zur Herstellung kombinatorischer Bibliotheken, welche individuelle Punktmutationen aufweisen, entwickelt. Dabei ahmt die gerichtete Evolution den Prozeß der Darwin'schen Evolution im Reagenzglas nach, indem sie die zufällige Mutagenese und/oder Rekombination mit Screening oder Selektion nach verbesserten Enzymen verbindet [Kuchner & Arnold, 1997; Arnold *et al.*, 2001].

Es gibt verschiedene Wege, die Evolution im Reagenzglas zu etablieren. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae* wurden alle erfolgreich als Organismen zur Expression der Genbibliotheken eingesetzt. Zur Randomisierung werden DNA-Bibliotheken durch fehlerhafte PCR (Error-Prone PCR) [Caldwell & Joyce, 1994; Ke & Madison, 1997], kombinatorische Oligonukleotid-Mutagenese [Reidhaar-Olson *et al.*, 1991], DNA-Shuffling [Stemmer, 1994 a, b], StEP-Rekombination (Staggered-Extension Process) [Zhao *et al.*, 1998] und *in vivo*-Rekombination [Low *et al.*, 1996; Bornscheuer *et al.*, 1998] hergestellt.

Die Error-Prone PCR arbeitet mit dem zufälligen Einbau einer Punktmutation bei jedem Amplifikationsschritt der Templat-DNA. Diese Methode besitzt den Vorteil, daß sie einfach und leicht anzuwenden ist. Jedoch ist sie durch die kleinen Bibliotheksgrößen, relativ zum Sequenzraum gesehen, beschränkt und bedingt einen großen Screening- und Selektionsaufwand.

Zum Beispiel wurde die P₄₅₀-Monooxygenase aus *Pseudomonas putida* durch gerichtete Evolution so verändert, daß sie Naphthalin ohne Cofaktor und mit 20-fach höherer Aktivität als das natürliche Enzym hydroxyliert [Joo *et al.*, 1999]. Die Enantioselektivität einer Hydantoinase konnte durch Austausch einer Aminosäure umgekehrt werden [May *et al.*, 2000]. In einem weiteren Beispiel wurde die Thermostabilität der *Bacillus subtilis* p-Nitrobenzylesterase signifikant mit einem Anstieg des T_m -Wertes um 14°C erhöht, ohne daß es zu einer Erniedrigung der spezifischen Aktivität bei Raumtemperatur kommt [Giver *et al.*, 1998].

Die Technik des DNA-Shufflings imitiert die natürliche Rekombination durch die homologe *in vitro*-Rekombination von Genen [Stemmer, 1994 a, b; Cramer *et al.*, 1998; Kolkman & Stemmer, 2001]. Bei dieser Methode wird eine Population verwandter Gene zufällig fragmentiert, anschließend denaturiert und hybridisiert. Die Elongation der 5'-Überhangsfragmente erfolgt durch eine DNA-Polymerase. Die Fragmentlängen steigen als ein Ergebnis der wiederholten PCR-Zyklen. Die DNA-Rekombination findet immer dann statt, wenn zwei Fragmente, die von unterschiedlichen Templat-Genen stammen, hybridisieren.

Durch DNA-Shuffling mit vier homologen Cephalosporinase-Genen und Selektion auf Antibiotikaresistenz konnte eine bis zu 540-fach höhere Aktivität gegenüber dem Antibiotikum Moxalactam gefunden werden [Cramer *et al.*, 1998]. Aus dem α/β -Barrel-Gerüst der Indol-3-Glycerinphosphat-Synthase konnte eine Phosphoribosylanthranilat-Isomerase durch DNA-Shuffling gewonnen werden [Altamirano *et al.*, 2000].

Anstatt nur die Eigenschaften eines Enzyms gezielt zu beeinflussen, ist es auch möglich, ganze Stoffwechselwege durch DNA-Shuffling zu verändern. Eine Desaturase und eine Zykklase aus dem Biosyntheseweg der Carotinoide wurden dazu in *Escherichia coli* rekombiniert und durch DNA-Shuffling so verändert, daß sie völlig neue Produkte, wie voll konjugierte oder zyklische Carotinoide hervorbringen [Schmidt-Dannert *et al.*, 2000]. Im Gegensatz zur Error-Prone PCR-Mutagenese erlaubt das DNA-Shuffling eine gezieltere Rekombination positiver Mutationen und generiert auf diese Weise Mutanten mit verbesserten Phänotypen. Zur Zeit erlaubt die DNA-Shuffling-Technik, kombiniert mit einer zuverlässigen Selektionsstrategie, die schnellste Entwicklung von Proteinen für technische Anwendungen [Ryu & Nam, 2000].

1.7 Stabilität von Enzymen

1.7.1 Stabilität der Enzyme in technischen Verfahren

Für die Anwendung der Enzyme in technischen Verfahren ist es wichtig, daß sie u.a. eine hohe Stabilität unter Prozeßbedingungen, d.h., physiologisch unüblichen Bedingungen, wie hohe Temperaturen, extreme pH-Werte und Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln, Detergentien und Oxidantien, aufweisen (Tabelle 7). Die Prozeßstabilität eines Enzyms kann mit der maximalen Zykluszahl ttn (Gleichung 1) oder der Halbwertszeit $t_{1/2}$ (Gleichung 30) ausgedrückt werden.

Die Desaktivierungswege der Proteine in technischen Anwendungen können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen in die chemische Desaktivierung und zum anderen in die physikalische Desaktivierung. Die chemische Desaktivierung kann als ein Prozeß definiert werden, bei dem kovalente Modifikationen stattfinden. Bei der physikalischen Desaktivierung wird die Proteinstruktur zerstört. Dies schließt die Denaturierung, Oberflächenadsorption, Aggregation und die Präzipitation ein (Tabelle 8).

1.7.2 Physikalische Desaktivierung

Proteine können, wie alle Polymere, Superstrukturen, d.h., Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen ausbilden und deshalb zahlreiche, nicht-chemische Veränderungen ihrer Struktur durchlaufen. Globuläre Proteine sind normalerweise so gefaltet, daß möglichst

Tabelle 7: Halbwertszeiten immobilisierter Enzyme unter Produktionsbedingungen [Rozzell, 1999].

Enzym	Halbwertszeit [d]
Aspartase	180 – 730
Penicillinamidase	> 180
Arginindesamidase	140
Transamidase	90
Lactase	90
Protease	> 60
Glucoseisomerase (60°C)	> 60
Tryptophansynthase	50
Cyclodextrin-Glykosyltransferase	> 45
Aspartat- β -Decarboxylase	45
Hydantoinase	30

Tabelle 8: Überblick über die Desaktivierungsprozesse bei Proteinen in technischen Anwendungen [Manning *et al.*, 1989].

Physikalische Desaktivierung	Chemische Desaktivierung
Denaturierung	Desamidierung
Aggregation	Hydrolyse
Präzipitation	Racemisierung
Adsorption	β -Elimination
	Oxidation
	Thiol-Disulfid-Austausch

wenige hydrophobe Gruppen an der Proteinoberfläche liegen [Creighton, 1983; Fersht, 1999]. Die Denaturierung eines Proteins beginnt mit dem Verlust seiner Quartär- und Tertiärstruktur, Sekundärstrukturelemente bleiben jedoch meist erhalten [Havel *et al.*, 1986; Backmann *et al.*, 1998]. Einmal entfaltet kann die Polypeptidkette weiter durch Adsorption (Assoziation mit Oberflächen) und/oder Aggregation (mit anderen Proteinen oder Reagentien) inaktiviert werden. Führt die Aggregation zu makroskopisch sichtbaren Produkten, bezeichnet man dies als Präzipitation.

Allgemein wird davon ausgegangen, daß ein Protein erst denaturiert werden muß, bevor es weiter durch Adsorption, Aggregation oder Präzipitation inaktiviert werden kann.

1.7.2.1 Denaturierung

Die Denaturierung eines Proteins bewirkt eine Veränderung der Tertiär-, manchmal auch der Sekundärstruktur [Backmann *et al.*, 1998]. Die Denaturierung kann reversibel oder irreversibel sein und sie ist von vielen Faktoren abhängig, wie u.a. von der Temperatur, Denaturierungsmitteln oder organischen Lösungsmitteln. Die reversible Denaturierung ist als ein Prozeß definiert, bei dem man ein natives Protein durch z.B. Hitze inaktiviert und anschließend durch langsames Absenken der Temperatur wieder das vollständig native Protein erhält. Die irreversible Denaturierung hingegen ist jeder andere Prozeß, bei dem das hitzegeschädigte Protein durch Absenken der Temperatur nicht wieder in den aktiven Zustand versetzt werden kann. Jedoch kann manchmal ein irreversibel denaturiertes Protein wieder in seinen ursprünglichen Zustand versetzt werden, indem man ein chaotropes Reagenz zugibt und dieses anschließend durch Dialyse wieder langsam entfernt.

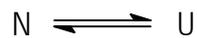


Abbildung 8: Denaturierung von Proteinen vom nativen (N, native) zum entfalteten (U, unfolded) Zustand.

Die Denaturierung ist der Übergang vom nativen (N, native) zum entfalteten (U, unfolded) Zustand des Proteins (Abbildung 8). Für solch ein System mit zwei Zuständen führt eine Temperaturerhöhung schnell vom nativen zum entfalteten Stadium, wenn die Schmelztemperatur T_m überschritten ist. Die Schmelztemperatur T_m ist die Temperatur, bei der 50% der Moleküle entfaltet vorliegen (d.h., $\Delta G = 0$), beim Absenken der Temperatur jedoch wieder in die native Form falten können. Ein erhöhter T_m -Wert ist ein Anzeichen für eine stabilere Proteinstruktur, allgemein jedoch wird die Stabilität eines Proteins durch die Entfaltungsenergie bei einer gegebenen Temperatur definiert. Der T_m -Wert ist stark vom pH-Wert und der Protein-Konzentration abhängig, z.B. beträgt der T_m -Wert des T4-Lysozyms 42°C bei pH 2,0, bei pH 6,5 dagegen 65°C [Wetzel *et al.*, 1988; Matthews, 1996].

Die irreversible Denaturierung bzw. Inaktivierung kann unterschiedliche Ursachen haben. Inaktivierte Proteine sind möglicherweise einfach nur derart mißgefaltet, daß sie bei Temperaturabsenkung nicht wieder in den nativen Zustand wechseln können [Novotny *et al.*, 1988; Fersht, 1999]. Andererseits können sie aber auch durch chemische Prozesse inaktiviert werden.

Die irreversible Denaturierung bzw. Inaktivierung ist der Übergang vom nativen (N, native) über den entfalteten (U, unfolded) zum inaktiven (I, inactive) Zustand des Proteins [Tomazic & Klibanov, 1988] (Abbildung 9). Die Inaktivierungstemperatur T_{50} ist diejenige Temperatur, bei der 50% der Moleküle nach Abkühlen inaktiv vorliegen. Da die Inaktivierung ein zeitabhängiger Prozeß ist, muß die Inkubationsdauer angegeben werden.

Beim T4-Lysozym ist die irreversible Denaturierung auf Konformationsänderungen zurückzuführen. Bei T4-Lysozym-Muteinen, welche eine zusätzliche Disulfidbrücke besitzen, kann die Aktivität durch Guanidiniumhydrochlorid jedoch nicht wiedergewonnen werden. Dies deutet auf eine chemische Inaktivierung hin [Wetzel *et al.*, 1988; Matthews, 1995; Matthews, 1996].



Abbildung 9: Irreversible Denaturierung von Proteinen vom nativen (N, native) über den entfalteten (U, unfolded) zum inaktiven (I, inactive) Zustand.

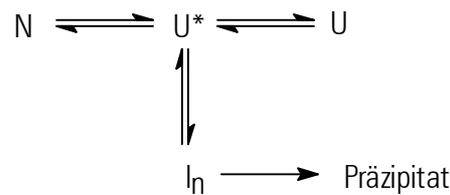


Abbildung 10: Modell der Denaturierung bei Interferon- γ vom nativen (N, native) über den teilweise entfalteten (U^* , unfolded) und entfalteten (U^* , unfolded) zum aggregierten inaktiven (I_n , inactive) Zustand.

1.7.2.2 Aggregation

Das Vorhandensein von teilweise gefalteten Intermediaten wurde bei vielen Proteinen nachgewiesen [Oliveberg, 2001]. Diese Intermediate spielen bei der Faltung von Proteinen eine wichtige Rolle. Daneben können sie auch bei der Entfaltung entstehen und zur Inaktivierung durch Aggregation beitragen, wie z.B. beim Interferon- γ [Arakawa *et al.*, 1987] (Abbildung 10).

Interferon- γ kann im sauren Milieu inaktiviert werden. Bei pH-Werten unter 4,5 und in Abwesenheit von NaCl dissoziiert das native Dimer in seine Monomere, welche teilweise entfaltet sind (U^*). Anschließende Dialyse führt einerseits wieder zu aktiven Dimeren (N), andererseits aber auch zu großen Aggregaten (I_n) mit erheblich verminderter Aktivität. Durch Circular-Dichroismus wurde gezeigt, daß die Aggregate noch viele Sekundärstrukturelemente besitzen, die Tertiärstruktur jedoch vollständig zerstört ist. Interferon- γ ist bei pH 4,5 stark positiv geladen und die Chlorid-Ionen können diese Ladung maskieren, so daß es den Monomeren ermöglicht wird, zu Dimeren zu assoziieren [Hsu & Arakawa, 1985].

1.7.2.3 Adsorption

Die Adsorption von Proteinen an Oberflächen ist ein oft beschriebenes Phänomen. Eines der am besten untersuchten Proteine in bezug auf Adsorption ist Insulin. Insulin kann an Oberflächen von Pumpen, von Glas- oder Plastikbehältnissen und an intravenösen Schläuchen adsorbieren [Seres, 1990].

1.7.3 Chemische Desaktivierung

Verschiedenste Möglichkeiten zur chemischen Modifikation von Proteinen sind bekannt, z.B. die Hydrolyse von Peptidbindungen oder Desamidierung der Asparagin- und Glutamin-Seitenketten. Andere Modifikationen sind die β -Elimination, die Racemisierung und die Oxidation von Methionin. Die Oxidation von Cysteinen kann zur Bildung von Disulfidbrücken oder dem Thiol-Disulfid-Austausch führen.

1.7.3.1 Oxidation

Alle Aminosäureseitenketten von Proteinen können von Hydroxyl-Radikalen oxidiert werden, jedoch sind die gebildeten Produkte bisher nur unzureichend charakterisiert [Berlett & Stadtman, 1997; Dean *et al.*, 1997] (Tabelle 9). Die Seitenketten von Cystein, Histidin, Tryptophan und Tyrosin sind in Proteinen potentielle Oxidationsstellen. Methionin kann sogar allein durch molekularen Sauerstoff oxidiert werden.

1.7.3.1.1 Oxidation des Methionins

Da die Thioethergruppe des Methionins ein schwaches Nukleophil darstellt und bei niedrigen pH-Werten nicht protoniert ist, kann es im sauren Milieu von vielen Reagentien

Tabelle 9: Auflistung der wahrscheinlichsten Modifikationen von Aminosäureseitenketten durch Oxidation mit Hydroxyl-Radikalen [Berlett & Stadtman, 1997].

Aminosäureseitenkette	Oxidationsprodukt
Arginin	Glutaminsäure-Semialdehyd
Cystein	Disulfid, Sulfen-, Sulfin-, Sulfonsäure
Glutamat	Oxalsäure, Brenztraubensäure
Histidin	2-Oxohistidin, Asparagin, Asparaginsäure
Lysin	α -Aminoadipinsäure-Semialdehyd
Methionin	Methioninsulfoxid, Methioninsulfon
Phenylalanin	2,3-Dihydroxyphenylalanin, 2-, 3- und 4-Hydroxyphenylalanin
Prolin	2-Pyrrolidon, 4- und 5-Hydroxyprolin-Pyrogutaminsäure, Glutaminsäure-Semialdehyd
Threonin	2-Amino-3-Ketobuttersäure
Tryptophan	2-, 4-, 5-, 6- und 7-Hydroxytryptophan, Nitrotryptophan, Kynurinin, 3-Hydroxykynurinin, Formylkynurinin
Tyrosin	3,4-Dihydroxyphenylalanin, Tyr-Tyr-Brücken, Tyr-O-Tyr, Cross-Linked Nitrotyrosin

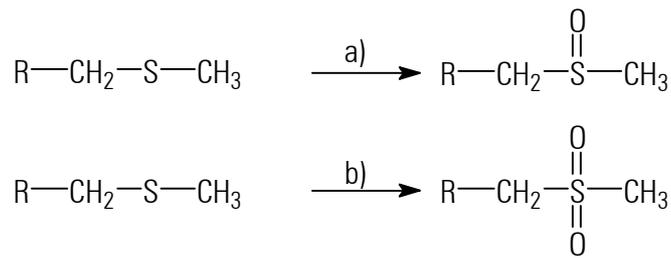


Abbildung 11: Mechanismen der Oxidation von Methionin in Proteinen. Unter milden Bedingungen mit H_2O_2 zum Sulfoxid (a), unter extremen Bedingungen mit Perameisensäure zum Sulfon (b) [Manning *et al.*, 1989].

selektiv oxidiert werden [Means & Feeney, 1971; Griffiths, 2000]. Zum Beispiel kann Wasserstoffperoxid die Indol-, Sulfhydryl-, Disulfid-, Imidazol-, Phenol- und Thioethergruppen von Proteinen bei neutralen oder leicht alkalischen Bedingungen modifizieren, unter sauren Bedingungen jedoch ist die Hauptreaktion die Oxidation des Methionins zum Methioninsulfoxid [Berlett & Stadtman, 1997, Stadtman & Berlett, 1998]. Um Methionin zum Sulfon zu oxidieren, bedarf es jedoch drastischerer Bedingungen und Reagentien wie z.B. 95%ige Perameisensäure (Abbildung 11).

Die Oxidation des Methionins zu seinem korrespondierenden Sulfoxid ist mit dem Verlust von biologischer Aktivität bei vielen Peptiden und Proteinen verbunden [Vale *et al.*, 1981; Brot & Weisbach, 1991; Stadtman & Berlett, 1998]. Es wurde gezeigt, daß das ribosomale Protein L12 aus *Escherichia coli* nach Oxidation eines Methionins zum Sulfoxid verminderte Aktivität aufweist und daß die Aktivität wieder hergestellt werden kann, wenn das Protein bei hohen Konzentrationen von β -Mercaptoethanol inkubiert wird [Caldwell *et al.*, 1978]. Die Wiederherstellung der Aktivität ist hier kongruent zur Reduktion des Methioninsulfoxids zum Methionin. Gleiche Beobachtungen wurden bei einer Sulfoxid-Variante von Trypsin gemacht [Holeysovsky & Lazdunski, 1968]. In vielen Fällen, wie z.B. bei der Ribonuclease [Jori *et al.*, 1968 a] und beim Lysozym [Jori *et al.*, 1968 b], bewirkt die Reduktion des Methioninsulfoxides mit Thiolen die fast vollständige Wiederherstellung der biologischen Aktivität.

Andererseits gibt es auch Beispiele, bei denen die Funktion durch die Oxidation des Methionins nicht beeinträchtigt wird. Aktive Monosulfoxid-Derivate der pankreatischen Ribonuclease, von α -Chymotrypsin und vom Trypsininhibitor wurden unter milder Wasserstoffperoxid-Behandlung im sauren Milieu (pH 1 – 3) isoliert. Auch EGF und Glucagon sind biologisch aktiv, wenn sie oxidiert werden [Manning *et al.*, 1989].

1.7.3.1.2 Oxidation des Cysteins

Die Thiol-Gruppe des Cysteins (RSH) kann zum Disulfid (RSSR) oder schrittweise über die Sulfensäure (RSOH) zur Sulfinensäure (RSO₂H) und schließlich zur Sulfonsäure (RSO₃H), abhängig von den Milieubedingungen, oxidiert werden. Die Oxidationsgeschwindigkeit bestimmen verschiedene Faktoren, wie z.B. Temperatur, pH-Wert, Puffer, Katalysator (z.B. Spuren von Metallionen) und die Sauerstoffkonzentration [Jocelyn, 1972]. Ein wichtiger Faktor ist auch die räumliche Anordnung der Thiol-Gruppe im Protein. In Fällen, bei denen der Kontakt zwischen den Thiol-Gruppen aus sterischen Gründen nicht möglich ist oder wenn das Protein nur eine Thiol-Gruppe besitzt, können intermolekulare Disulfidbrücken nicht ausgebildet werden. Unter geeigneten sterischen Bedingungen können jedoch intermolekulare Bindungen zu einem anderen Molekül ausgebildet werden, was zur Aggregation des Protein führt [Little & O'Brien, 1967].

Thiol-Gruppen werden nicht ausschließlich von Oxidationsmitteln, wie z.B. Jod, Eisencyanid, Tetrathionat und Wasserstoffperoxid oxidiert, sondern auch „spontan“ durch molekularen Sauerstoff (Autooxidation). Die Oxidation der Thiol-Gruppen durch molekularen Sauerstoff wird stark durch die Anwesenheit katalytischer Mengen von Metallionen, wie Eisen oder Kupfer, gefördert [Cavallini *et al.*, 1968].

Die Oxidationsgeschwindigkeit der Thiol-Gruppen wird daneben auch stark von den benachbarten Aminosäuren beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, daß die Oxidationsrate von zwei Thiol-Gruppen in einem Protein mit zunehmendem Abstand abnimmt. Auch elektronegative Gruppen in der Nachbarschaft, die den pK_a der Thiolgruppe anheben, wie z.B. Carboxyl-Gruppen, beeinflussen die Oxidationsrate. Dies zeigt, daß das Thiolat leichter oxidiert werden kann, als die undissoziierte Thiol-Gruppe und deshalb steigt üblicherweise die Oxidationsrate mit steigendem pH-Wert [Li *et al.*, 1995]. Bei 90°C und pH 8,0 wird die α -Amylase irreversibel durch Oxidation ihres Cysteins mit Luftsauerstoff, zusammen mit der Bildung mißgefalteter Strukturen, inaktiviert [Tomazic & Klibanov, 1988]. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskeln kann mit Hilfe von Wasserstoffperoxid durch Bildung einer Sulfensäure inaktiviert werden [Little & O'Brien, 1967].

1.7.3.2 Thiol-Disulfid-Austausch

Die Wechselwirkungen von Disulfidbindungen können zur nicht korrekten Paarung und damit zu einer veränderten räumlichen Struktur, die eine veränderte Aktivität bedingt, führen. Der Reaktionsmechanismus unterscheidet sich im basischen von dem im sauren Milieu [Lumper & Zahn, 1965]. Im neutralen bis basischen Milieu wird die Reaktion von

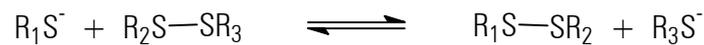


Abbildung 12: Mechanismus des Thiol-Disulfid-Austausches im neutralen und basischen Medium [Manning *et al.*, 1989].

Thiolen katalysiert. In Form von Thiolat-Ionen greifen sie nukleophil den Schwefel einer Disulfidbindung an (Abbildung 12).

Katalytische Mengen an Thiolen können durch die hydrolytische Spaltung von Disulfidbindungen entstehen und den Thiol-Disulfid-Austausch bewirken. Zum Beispiel wird ein Cystin des Lysozyms bei 100°C und neutralem pH-Wert durch β -Elimination so gespalten, daß ein freies Thiol entsteht, welches dann eine Disulfidbindung angreifen kann [Volkin & Klibanov, 1987]. Die Oligomerisierung bzw. Aggregation von BSA wird auch auf den Thiol-Disulfid-Austausch zurückgeführt [Kelly & Zydney, 1994].

Im sauren Milieu wird ein Sulfenium-Kation durch Angriff eines Protons auf die Disulfidbindung gebildet (Abbildung 13). Der Thiol-Disulfid-Austausch kann mit Thiol-verbrauchenden Reagentien verhindert werden, z.B. mit Kupfer-Ionen oder N-Ethylmaleinimid. Die irreversible Inaktivierung der Ribonuclease A bei 90°C und pH 8 konnte mit diesen Reagentien verlangsamt werden [Zale & Klibanov, 1986].

Enzyme mit falschen Disulfidbindungen können wieder mit Hilfe geringer Mengen an Thiolen, wie β -Mercaptoethanol, Glutathion oder Cystein, in den nativen Zustand gebracht werden [Galat & Creighton, 1981].

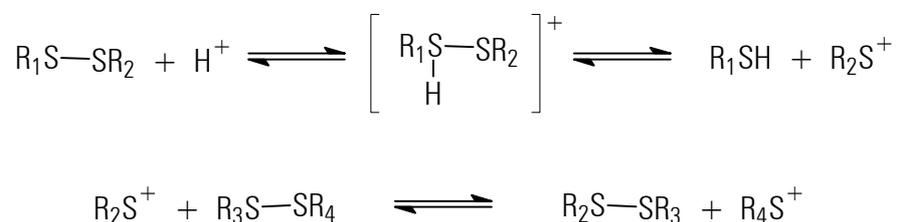


Abbildung 13: Mechanismus des Thiol-Disulfid-Austausches im sauren Medium [Manning *et al.*, 1989].

1.7.4 Möglichkeiten der Erhöhung der Proteinstabilität

1.7.4.1 Additive

Additive stabilisieren Proteine. Die einfachsten und effektivsten Additive sind Salze, sie vermindern die reversible Denaturierung durch nicht-spezifisches Binden an das Protein [Vieille & Zeikus, 2001]. Darüber hinaus sind auch bei Nicht-Metall-Proteinen spezifische Ionen-Bindungsstellen bekannt. Der stabilisierende Effekt durch Ionen bei der Thermoaktivierung wurde u.a. beim Subtilisin, Ribonuclease, Thermolysin, Parvalbumin, Alkalischer Phosphatase und α -Lactalbumin nachgewiesen [Russell & Fersht, 1988; Fersht, 1999].

Polyalkohole, wie Zucker oder Glycerin, sind als stabilisierende Additive bekannt [Li *et al.*, 1995; Knubovets *et al.*, 1999]. Bei niedrigen Konzentrationen an Polyalkoholen ist die Anzahl der Wassermoleküle um ein Proteinmolekül erhöht, um die hydrophoberen Alkohole fernhalten zu können. Dies führt zu einer erhöhten Stabilität. Bei höheren Polyalkohol-Konzentrationen ist dies nicht mehr möglich und das hydrophobere organische Lösungsmittel führt schließlich zur Denaturierung des Proteins.

Auch Detergentien können zur Stabilisierung von Proteinen beitragen, sowohl nicht-ionische, als auch anionische. Nicht-ionische Detergentien, wie Tween oder Pluronic können die Denaturierung verhindern [Tandon & Horowitz, 1987; Andersson *et al.*, 2000], die Adsorption von Proteinen an Oberflächen vermindern [Bohnert *et al.*, 1988] und die Aggregation und Präzipitation inhibieren [Lougheed *et al.*, 1983].

1.7.4.2 Chemische Modifikationen

Es ist möglich, die Stabilität von Proteinen durch kovalentes Binden an Polyethylenglycol (PEG) oder Polyoxyethylen zu erhöhen. Durch diese Immobilisierung können zum Teil sehr große Halbwertszeiten erzielt werden und hierdurch die Stabilität der Proteine wesentlich erhöht werden (Tabelle 7). Allerdings wirken sich diese Modifikationen bisweilen ungünstig auf die Aktivität aus [Li *et al.*, 1995].

Die Modifikation von basischen Aminosäureseitenketten in Proteinen wirkt sich oftmals thermostabilisierend aus. Es wurde gezeigt, daß Umwandlung von Lysin zum Homoarginin viele Proteine stabilisiert [Qaw & Brewer, 1986]. Die Methylierung basischer Aminosäureseitenketten wurde bei Prokaryonten gefunden, die einem Hitzeschock ausgesetzt waren [Desrosiers & Tanguay, 1988]. Wahrscheinlich führte diese Methylierung bei vielen Proteinen zu einer erhöhten Thermostabilität.

1.7.4.3 Austausch von Aminosäuren

Durch ortsspezifische Mutagenese und gerichtete Evolution können Aminosäuren ausgetauscht und damit die Eigenschaften von Proteinen verändert werden, z.B. durch den Austausch oxidationsanfälliger Aminosäuren [Manning *et al.*, 1989; Vieille & Zeikus, 2001].

1.7.4.3.1 Stabilisierung durch interne Wechselwirkungen

Während die Beziehungen zwischen einem Aminosäureaustausch und der Proteinstabilität noch weitestgehend unklar sind, sind jedoch einige Grundprinzipien erkannt. Die Verringerung der konformalen Flexibilität, Verbesserung der hydrophoben Packung und eine Erhöhung der Anzahl der Wasserstoffbrücken führen zu einer erhöhten Stabilität.

Glycin besitzt von allen natürlichen Aminosäuren den höchsten Freiheitsgrad bezüglich der Konformation. Der Austausch gegen ein Alanin sollte den Freiheitsgrad einschränken, deswegen eine Erhöhung der Entfaltungsentropie bewirken und damit zu einer erhöhten Stabilität führen. Beim T4-Lysozym wurde gezeigt, daß ein Austausch eines Glycins gegen ein Alanin die Stabilität um $1,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ erhöht [Matthews *et al.*, 1987].

1.7.4.3.2 Stabilisierung der α -Helix-Dipole

Dipole von α -Helices spielen bei der Proteinfaltung und der Stabilisierung von Superstrukturen eine wichtige Rolle. Während hydrophobe Interaktionen und Salzbrücken auch von Bedeutung sind, so stellen doch die α -Helix-Dipole den wichtigsten stabilisierenden Faktor einer α -Helix dar [Shoemaker *et al.*, 1985]. Die Stabilität eines α -Helix-Dipols wird verstärkt, wenn sich saure Gruppen nahe des N-Terminus und basische Gruppen nahe des C-Terminus befinden [Nicholson *et al.*, 1988].

Im T4-Lysozym wurden gezielt Aminosäuren ausgetauscht, um die α -Helix-Dipole zu beeinflussen und damit deren Stabilität zu erhöhen [Nicholson *et al.*, 1988]. Vier der elf α -Helices im T4-Lysozym besitzen keine sauren Gruppen in der Nähe des N-Terminus. Zwei Einzelmutanten mit S38D und N144D und die Doppelmutante wurden hergestellt. Beide Einzelmutationen bewirkten eine Erhöhung des T_m -Wertes von 2°C , die Doppelmutation wirkte sich mit einer Erhöhung von 4°C aus. Dies entspricht einer Stabilisierung von $6,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ für jeden Aminosäureaustausch.

Bei der *Pseudomonas sp.* 101-FDH wurde durch Erhöhung der Hydrophobizität von α -Helices die Thermostabilität verbessert. Durch den Austausch eines Serins zum Alanin an verschiedenen Helices konnte bei den Einzelmutanten eine Erhöhung der

Thermostabilität von 5 – 24% erzielt werden, eine 4-fach-Mutante besitzt eine um 50% verbesserte Thermostabilität. Bei allen Mutanten mit positiven Veränderungen blieben die kinetischen Parameter im Vergleich zum Wildtyp unverändert [Rojkova *et al.*, 1999].

1.7.4.3.3 Stabilisierung durch Einführung von Ionen-Bindungsstellen

Die Bindung von Ionen führt zu einer erhöhten Thermostabilität der Proteine. In mehr als 50% der 275 Aminosäuren des Subtilisin E wurden unterschiedliche Calcium-Bindungsstellen durch den Austausch einzelner Aminosäure, d.h. Einzelmutanten, eingeführt [Russell & Fersht, 1988; Bryan, 2000]. Dies führte zu erhöhten Thermostabilitäten.

1.7.4.3.4 Stabilisierung durch Einführung von Disulfidbindungen

Eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung von Proteinen ist die Einführung einer Disulfidbrücke mit dem Ziel, durch diese Modifikation die Entfaltungsentropie zu erniedrigen und damit die Tendenz zur reversiblen Denaturierung abzuschwächen [Matsamura *et al.* 1989]. Disulfidbrücken wurden u.a. in die Dihydrofolat-Dehydrogenase [Villafranca *et al.*, 1983], Subtilisin [Wells & Powers, 1986] und des T4-Lysozym [Wetzel *et al.*, 1988] eingeführt.

Allgemein läßt sich sagen, daß diese Mutationen in manchen Fällen zu einer erhöhten Stabilität gegenüber Guanidiniumhydrochlorid, jedoch fast immer zu einer erniedrigten Thermostabilität geführt haben. Dies wird auf die erhöhte Oxidationsanfälligkeit der Cystine zurückgeführt [Ahern & Klibanov 1985; Wells & Powers, 1986; Volkin & Klibanov, 1987].

Jedoch konnte bei der Thermolysin-ähnlichen Protease durch Einführung einer Disulfidbrücke (G8C/N60C) der T_{50} -Wert im Vergleich zum Wildtyp um 16,7°C erhöht werden [Mansfeld *et al.*, 1997].

1.7.4.3.5 Stabilisierung durch Entfernung oxidationsanfälliger Aminosäuren

Bei der Triosephosphat-Isomerase wurden zwei potentielle Desamidierungsstellen, Asn14Thr und Asn78Ile, entfernt. Diese Mutationen führten im Vergleich zum Wildtyp zu einer erhöhten Thermostabilität. Ebenso konnte Interleukin-1 α durch den Austausch Asn36Ser gegenüber Hitze stabilisiert werden [Wingfield *et al.*, 1987].

Tabelle 10: Rekombinante Cystein-defiziente FDH-Muteine. Die Cysteine sind mit Hilfe des rationalen Protein-Designs durch andere Aminosäuren gezielt ausgetauscht worden um die Oxidationsstabilität der FDH zu verbessern [Slusarczyk, 1997; Slusarczyk *et al.*, 2000].

rekombinante Formiatdehydrogenasen	Aminosäureaustausch
Wildtyp	-
Einzelmutanten	C23S C262V
Doppelmutanten	C23S/C262V C23S/C262A

Subtilisin ist eine Serin-Endoprotease, die ein breites Spektrum von Peptidbindungen in Proteinen spaltet. Als alkalistabiles Enzym wird Subtilisin in großen Mengen in der Waschmittelindustrie verwendet. In Waschmitteln wird allerdings auch immer Wasserstoffperoxid zur Bleiche der Wäsche zugegeben, was zur Inaktivierung des Subtilisins führte. Als Ursache wurde die Oxidation des Methionins 222 zum Sulfoxid und Sulfon, welches in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum liegt, ausgemacht. Durch den Austausch gegen ein Alanin oder ein Serin konnte das Subtilisin gegenüber Wasserstoffperoxid stabilisiert werden [Oxender & Fox, 1987; Bryan, 2000].

Durch den Austausch der beiden Cysteine der FDH aus *Candida boidinii* konnte das Enzym gegenüber Kupfer(II)-Ionen stabilisiert werden. Alle Muteine, ausgenommen die C262V-FDH, sind gegenüber der Oxidation durch Kupfer(II)-Ionen wesentlich stabiler. Nach 20-stündiger Inkubation mit Kupfer(II)-Ionen konnte beim stabilsten Mutein kein Aktivitätsverlust beobachtet werden, die WT-FDH wies jedoch nur noch 30% der ursprünglichen Aktivität auf [Slusarczyk *et al.*, 2000] (Tabelle 10).

1.8 Aktivität von Enzymen in technischen Verfahren

1.8.1 Aktivität der Enzyme in technischen Verfahren

1.8.1.1 Modell von Michaelis-Menten

Mit dem Modell von Michaelis-Menten kann man die Eigenschaften von Enzymen beschreiben. Bei vielen Enzymen variiert die Katalysegeschwindigkeit V mit der Substratkonzentration $[S]$. V ist definiert als die Anzahl der pro Zeiteinheit entstehenden Mole des Produkts. Diesen Verlauf beschreibt die Michaelis-Menten-Gleichung mit der

Enzymkonzentration $[E]$ und der Michaelis-Menten-Konstante K_M . Bei konstanter Enzymkonzentration steht für den Fall, daß $[S]$ klein ist, V in annähernd linearem Verhältnis zu $[S]$. Ist die Substratkonzentration dagegen hoch, so ist V praktisch unabhängig von ihr:

$$V = \frac{k_{cat}}{[S] + K_M} [E][S] \quad (2)$$

1.8.1.2 Das k_{cat} -Kriterium

In technischen Prozessen möchte man jedoch die volle Leistung des Katalysator ausnutzen. Bei hohen Substratkonzentrationen, wenn $[S] \gg K_M$, ist die Geschwindigkeit nur noch proportional zur Enzymkonzentration und der Wechselzahl k_{cat} und stellt eine Reaktion 1. Ordnung dar:

$$V = k_{cat} [E] \quad (3)$$

Die maximale Aktivität eines Enzyms wird mit der Wechselzahl k_{cat} (bzw. *tof*, turnover frequency) $[s^{-1}]$ ausgedrückt. Sie ist der Quotient aus den gebildeten Molen Produkt pro Zeit n_P $[\text{mol s}^{-1}]$ pro aktivem Zentrum n_Z $[\text{mol}]$:

$$k_{cat} = \frac{n_P}{n_Z} \quad (4)$$

Die Wechselzahl k_{cat} ist somit ein Kriterium für die Effizienz der katalysierten Reaktion. Deshalb ist für die Anwendung in technischen Prozessen eine möglichst hohe Wechselzahl interessant, denn je höher die Wechselzahl, desto weniger Enzym muß eingesetzt werden. Oftmals weisen Enzyme jedoch keine hohen Wechselzahlen auf, da sie für biologische Systeme optimiert wurden und sich hier die Anforderungen an die Enzyme im Vergleich zu technischen Verfahren unterscheiden.

1.8.2 Aktivität der Enzyme in biologischen Systemen

1.8.2.1 Das k_{cat}/K_M -Kriterium

Enzyme sind die Katalysatoren in biologischen Systemen. Unter physiologischen Bedingungen liegt das Verhältnis $[S]/K_M$ meistens zwischen 0,01 und 1,0 [Stryer, 1996]. Bei diesen niedrigen Substratkonzentrationen, wenn $[S] \ll K_M$, ist die Geschwindigkeit proportional zur Substratkonzentration, der Enzymkonzentration und der Konstanten k_{cat}/K_M und nimmt die Form einer Reaktion 2. Ordnung an:

$$V = \frac{k_{cat}}{K_M} [E][S] \quad (5)$$

Die physikalische Grenze der Konstante k_{cat}/K_M ist durch die Assoziationsgeschwindigkeit des Substrats mit dem Enzym limitiert. Die k_{cat}/K_M -Konstante ist somit ein Kriterium für die Effizienz der katalysierten Reaktion unter physiologischen Bedingungen. Die theoretisch maximale Aktivität des Katalysators, d.h., die maximale k_{cat}/K_M -Konstante, ist durch die Assoziation von dem Substrat mit dem Enzym limitiert.

1.8.2.2 Assoziation und Dissoziation

Die Obergrenze der Reaktionsgeschwindigkeit für jede uni- oder intramolekulare Reaktion ist die Frequenz einer molekularen Schwingung, d.h., 10^{12} bis 10^{13} s^{-1} .

Die Reaktionsgeschwindigkeit für eine bimolekulare Reaktion kann mit der Kollisionstheorie berechnet werden [Wedler, 1987].

$$k = Z p \exp\left(-\frac{E_a}{R T}\right) \quad (6)$$

Sie ist abhängig von der Kollisionsfrequenz Z , dem sterischen Faktor p und dem Energieaktivierungsterm E_a . Die maximale Geschwindigkeit für eine bimolekulare Reaktion kann erzielt werden, wenn die Aktivierungsenergie $E_a = 0$ und der sterische Faktor $p = 1$ ist. In diesem Fall ist die Reaktion nur durch die Kollisionsfrequenz der

beiden Moleküle bestimmt, d.h., von der Diffusion und man spricht von diffusionslimitierten Reaktionen [Wedler, 1987].

Mit der Annahme, daß die beiden Moleküle ungeladene Kugeln mit den Radien r_A und r_B sind, kann die Kollisionsfrequenz Z mit der Viskosität η berechnet werden.

$$Z = \frac{2 R T}{3000 \eta} \frac{(r_A + r_B)^2}{r_A r_B} \quad (7)$$

Es ergibt sich für zwei Moleküle mit denselben Radien bei 25°C in Wasser eine Kollisionsfrequenz von $7 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Dabei kollidieren zwei größere Moleküle mit der gleichen Frequenz wie zwei kleinere, da die größere Kollisionsoberfläche die langsamere Diffusion kompensiert. Dagegen ist die Frequenz für den Zusammenstoß von einem großen Molekül mit einem kleinen größer als $7 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Hier macht sich die größere Kollisionsoberfläche des größeren Moleküls mit der höheren Mobilität des kleineren Moleküls bemerkbar. Unter idealen Bedingungen kann die Kollisionsfrequenz, d.h. die Assoziation, maximal 10^9 bis $10^{11} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ betragen. Die obere Grenze für die Dissoziation beträgt 10^9 bis $10^{12} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Viele Konstanten für Reaktionen 2. Ordnung, die keinen Protonen- oder Hydroxid-Transfer einschließen, liegen in einem Bereich von $10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ [Eigen & Hammes, 1963].

1.8.2.3 Assoziation von Enzym und Substrat

Die Assoziationsraten von Proteinen mit anderen Molekülen werden u.a. stark von der Geometrie beeinflusst. Nur ein kleiner Teil eines Proteins ist bei einem Protein-Protein-Komplex beteiligt, was eine große sterische Inhibition darstellt. Aus diesem Grunde sind Protein-Protein-Assoziationsraten mit $10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ relativ klein.

Dagegen sind die Assoziationsraten von einem Enzym mit einem Substrat mit ungefähr $10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ sehr groß (Tabelle 11). Normalerweise besitzen sie Assoziationskonstanten von 10^6 bis $10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, die schnelleren sind nahe an der Diffusionslimitierung, die langsameren aber liegen signifikant unter dieser Grenze. Dies kann unter anderem daran liegen, daß die Assoziation nicht in einem Schritt erfolgt, sondern wie beim Lysozym, ein 2-Schritt-Prozeß ist [Fersht, 1999].

Tabelle 11: Assoziations- und Dissoziationsraten bei Enzym-Substrat-Interaktionen. Assoziationsrate (k_1), Dissoziationsrate (k_{-1}) [Fersht, 1999].

Enzym	Substrat	k_1 [$s^{-1} M^{-1}$]	k_{-1} [s^{-1}]
Alkoholdehydrogenase (Leber)	NADH	$3 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^1$
Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase	NAD	$2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^3$
Katalase	H_2O_2	$5 \cdot 10^6$	-
Katalase- H_2O_2	H_2O_2	$2 \cdot 10^7$	-
Kreatin-Kinase	ADP	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^4$
	MgADP	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^3$
Lactatdehydrogenase (Kaninchenmuskel)	NADH	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^4$
Lactatdehydrogenase (Schweineherz)	NADH	$6 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^1$
	Oxamat	$8 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^1$
Lysozym	$(NAG)_2$	$4 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^5$
Malatdehydrogenase	NADH	$5 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^1$
Pyruvatcarboxylase- Mn^{2+}	Pyruvat	$5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^4$

1.8.2.4 Das kinetische Optimum der Enzymkatalyse

Einige Enzyme besitzen eine k_{cat}/K_M -Konstante von $3 \cdot 10^8 s^{-1} M^{-1}$ (Tabelle 12). In diesen Fällen ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für diesen Parameter, welches eine apparente Konstante einer Reaktion 2. Ordnung ist, nahe an dem diffusionslimitierten Zusammenstoß von Enzym und Substrat. Da hier die Diffusion k_{cat}/K_M bestimmt, kann der Wert von 10^8 bis $10^9 s^{-1} M^{-1}$ nicht überstiegen werden und er stellt somit den oberen Grenzwert einer enzymkatalysierten Reaktion dar.

Diese Beschränkung gilt auch für Enzyme, die komplexere Reaktionswege, als die mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschriebenen, aufweisen. Ihre maximale Katalysegeschwindigkeit k_{cat} bei Substratsättigung hängt hier von mehreren Geschwindigkeitskonstanten ab. Der entscheidende Parameter für diese Enzyme ist jedoch k_{cat}/K_M . Tatsächlich liegen die k_{cat}/K_M -Konstanten der Enzyme Acetylcholinesterase, Carboanhydratase und Triosephosphat-Isomerase zwischen 10^8 und $10^9 s^{-1} M^{-1}$, was darauf hindeutet, daß sie ihr kinetisches Optimum unter physiologischen Bedingungen erreicht haben.

Tabelle 12: Enzyme mit k_{cat}/K_M -Werten nahe an der diffusionslimitierten Assoziationsrate [Fersht, 1999].

Enzym	Substrat	k_{cat} [s ⁻¹]	K_M [M]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]
Acetylcholinesterase	Acetylcholin	$1 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^8$
Carboanhydrase	CO ₂	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^{-2}$	$8 \cdot 10^7$
	HCO ₃ ⁻	$4 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^5$
Crotonase	Crotonyl-CoA	$6 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^8$
Katalase	H ₂ O ₂	$4 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^0$	$4 \cdot 10^7$
Fumarase	Fumarat	$8 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^8$
	Malat	$9 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^7$
β -Lactamase	Benzylpenicillin	$2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^8$
Triosephosphat-isomerase	Glycerinaldehyd-3-phosphat	$4 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^8$
Superoxiddismutase	Superoxid	-	-	$7 \cdot 10^9$

Ihre Katalysegeschwindigkeit wird nur durch die Geschwindigkeit beschränkt, mit der sie in Lösung ihrem Substrat begegnen. Jede weitere Erhöhung der Katalysegeschwindigkeit kann nur durch Senkung der Diffusionszeit erreicht werden. Tatsächlich sind Enzyme eines Stoffwechselweges manchmal zu Multienzymkomplexen zusammengefaßt, so daß das Produkt eines Enzyms sehr rasch vom nächsten aufgegriffen werden kann. Die durch die Diffusionsgeschwindigkeit in einer Lösung gesetzte Beschränkung kann also teilweise überwunden werden, wenn Substrate und Produkte im begrenzten Raum eines Multienzymkomplexes zusammengefaßt sind [Stryer, 1996].

2 Fragestellung

2.1 Motivation

Die Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* wird zur *in situ*-Regenerierung des Cofaktors NAD in der industriellen Biokatalyse eingesetzt [Kula & Wandrey, 1987; Liese *et al.*, 2000]. In dieser Arbeit sollten weitere Möglichkeiten untersucht werden, die FDH für die Anwendung in der organischen Chemie zu optimieren, wie die vereinfachte Herstellung des Katalysators (*Produktion und Aufarbeitung*), die Erhöhung der Prozeßstabilität (*Stabilitätsuntersuchungen*) und die Verbesserung der katalytischen Aktivität (*Erhöhung der spezifischen Aktivität*) (Abbildung 14).

2.2 Produktion und Aufarbeitung

Für Anwendungen in größerem Maßstab sollte die FDH in ausreichenden Mengen verfügbar sein. Gegenwärtig wird die kommerziell erhältliche NAD-abhängige FDH hauptsächlich mit Hilfe der Hefe *Candida boidinii* gewonnen [Weuster-Botz & Wandrey, 1995]. Zu diesem Verfahren existiert ein geeignetes Aufarbeitungsverfahren [Kroner *et al.*, 1982 a; Kroner *et al.*, 1982 b; Cordes & Kula, 1986].

Die Expression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli* ermöglicht oftmals eine sehr viel höhere Produktivität als die Herstellung in den Wildtyp-Stämmen. Da die FDH aus *Candida boidinii* zu Beginn dieser Arbeit rekombinant in *Escherichia coli* kloniert vorlag [Slusarczyk, 1997; Slusarczyk *et al.*, 2000], sollte eine Hochzelldichtekultivierung zur Produktion mit anschließender Aufarbeitung entwickelt werden.

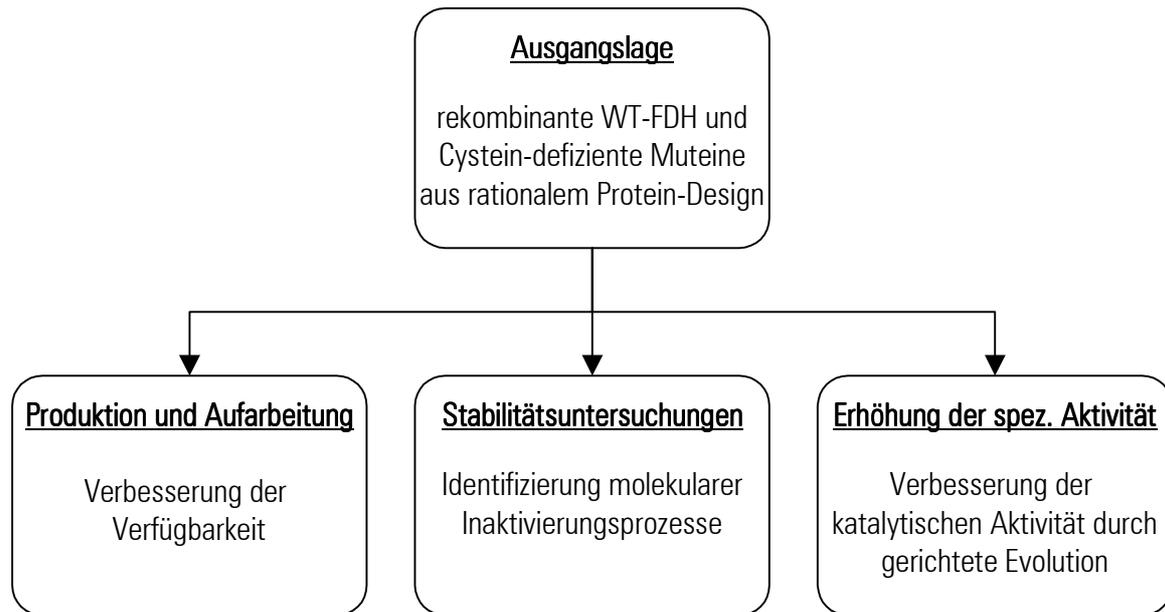


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Zielsetzungen dieser Dissertation.

2.3 Stabilitätsuntersuchungen

Für die Anwendung der Enzyme in technischen Verfahren ist es wichtig, daß sie u.a. eine hohe Stabilität unter Prozeßbedingungen, d.h., physiologisch unüblichen Bedingungen, wie hohe Temperaturen, extreme pH-Werte und der Anwesenheit von Detergentien, organischen Lösungsmitteln und Oxidantien, aufweisen.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß alle NAD-abhängigen FDHs durch Quecksilber- und Kupferionen stark inhibiert bzw. inaktiviert werden. Als Ursache könnte die Oxidation essentieller Sulfhydryl-Gruppen in Frage kommen [Schütte *et al.*, 1976; Egorov *et al.*, 1979; Allais *et al.*, 1983; Patel *et al.*, 1983; Avilova *et al.*, 1985; Izumi *et al.*, 1989, Tishkov *et al.*, 1993 b; Tishkov *et al.*, 1996]. Durch ortsspezifische Mutagenese wurden die Cysteine der rekombinant in *Escherichia coli* vorliegenden FDH gezielt ausgetauscht, um die Oxidationsempfindlichkeit des Wildtyps zu erniedrigen [Slusarczyk *et al.*, 2000].

Ziel war es, die Stabilität, und hier besonders die Oxidationsstabilität der verschiedenen Cystein-defizienten FDH-Muteine zu untersuchen, um den Inaktivierungsprozeß zu verstehen und gezielt solche mit erhöhter Stabilität für die Cofaktor-Regenerierung bereitstellen zu können.

2.4 Erhöhung der spezifischen Aktivität

Für die *in situ*-Regenerierung von NAD/NADH und NADP/NADPH sind chemische Verfahren, wie elektrochemische und photochemische beschrieben worden [Nakamura *et al.*, 1988; Ruppert & Steckhan, 1988; Fry *et al.*, 1994]. Bei diesen Methoden wird der Cofaktor oft unspezifisch regeneriert, die Katalysegeschwindigkeiten sind im allgemeinen jedoch hoch.

Die FDH aus *Candida boidinii* besitzt, wie alle bisher bekannten NAD-abhängigen FDHs mit 6 U mg^{-1} eine relativ geringe katalytische Aktivität. Dagegen sind NAD-abhängige Dehydrogenasen mit wesentlich höheren Wechselzahlen bekannt, wie z.B. die Leucindehydrogenase aus *Bacillus cereus* mit 340 U mg^{-1} [Ansorge & Kula, 2000 a]. Ziel sollte es nun sein, eine FDH mit höherer katalytischer Aktivität mittels der Methode der gerichteten Evolution zu finden.

3 Produktion und Aufarbeitung

3.1 Produktion

Zur Optimierung der Produktion der Formiatdehydrogenase (FDH) wurden insgesamt sechs Hochzelldichtekultivierungen mit der Wildtyp-FDH, sowie den Cystein-defizienten FDH-Muteinen durchgeführt. Die rekombinante Expression erfolgte in *Escherichia coli* JM105 mit dem Vektor pBTac2-FDH. Da die FDH intrazellulär in *Escherichia coli* akkumuliert wird, ist die Produktivität bzw. die Raum-Zeit-Ausbeute proportional zur gebildeten Zellkonzentration. Zur Erzielung hoher Zelldichten im technischen Maßstab wurde ein Fed-Batch-Verfahren mit exponentieller Zufütterung eingesetzt (Abbildung 15). Während der letzten drei Kultivierungen wurde eine neuartige Zufütterungsstrategie entwickelt.

3.1.1 Optimierung der Kultivierung

3.1.1.1 Zufütterungsstrategien

3.1.1.1.1 Fed-Batch mit Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors

Die zunächst angewendete Zufütterungsstrategie ist eine vordefinierte Steuerung zum C-Quellen-limitierten Wachstum auf einem semi-definierten Medium. Es wurde exponentiell zugefüttert, um die Wachstumsrate μ konstant und gleichzeitig unter dem kritischen Wert μ_{crit} zu halten, mit dem Ziel, die Acetat-Bildung zu vermeiden [Korz *et al.*, 1994]. Die wachstumshemmende Säureproduktion, wie z.B. die Acetat-Bildung, stellt eine Nebenreaktion durch unvollständige Oxidation des Substrates bei Sauerstofflimitierung oder bei Substratüberschuß dar.

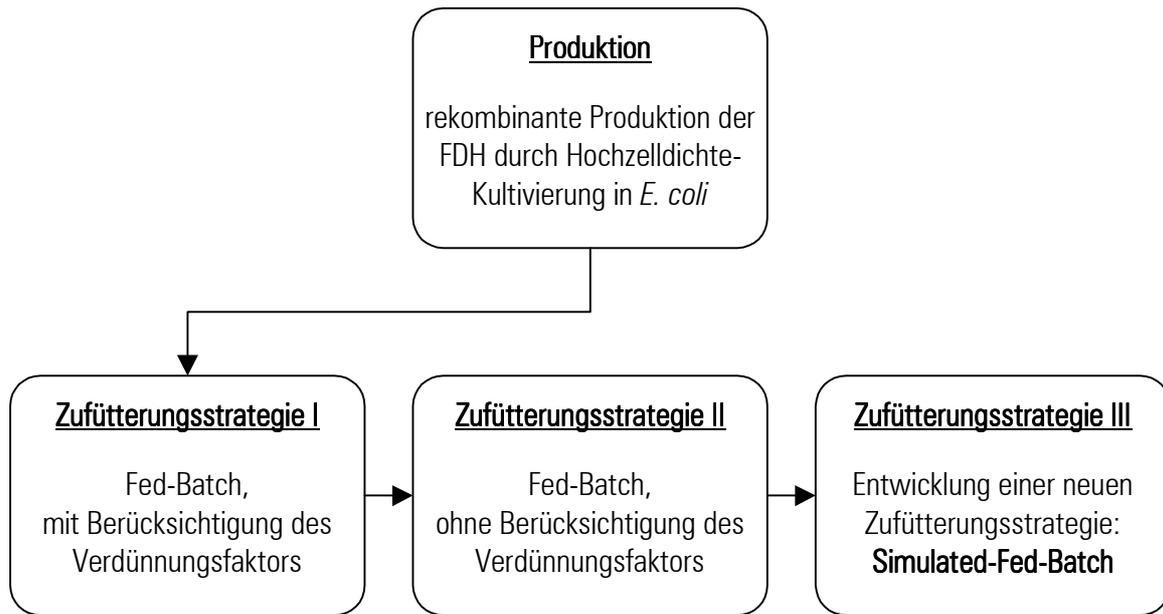


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Kultivierungsverfahrens zur rekombinanten Produktion der FDH in *Escherichia coli*.

Nach Verbrauch der Glucose im Batch-Medium wurde die Zufütterung gestartet. Die zunächst verwendete Regelstrategie berücksichtigt die Volumenzunahme während der Zufütterungsphase durch die Feed-Lösung, wobei die Bedingung $\mu < \mu_{crit}$ mit $\mu_{crit} = 0,14 \text{ h}^{-1}$ eingehalten werden mußte. Die Wachstumsrate μ betrug $0,12 \text{ h}^{-1}$ und die Erhaltungsstoffwechselkonstante m wurde vernachlässigt. Damit kann die allgemeine Massenbilanz formuliert werden

$$m_s(t) = F(t) S_F(t), \quad (8)$$

mit Berücksichtigung, daß die Substratkonzentration in der Feed-Lösung konstant ist, ergibt sich

$$F(t) = \frac{1}{S_F} \left(\frac{\mu(t)}{y_{X/S}} + m \right) V(t) X(t) \quad (9)$$

und durch die Vorgabe, daß μ konstant sein soll, müssen die Zellen exponentiell wachsen

$$F(t) = \frac{1}{S_F} \left(\frac{\mu(t)}{y_{X/S}} + m \right) X(t_0) V(t_0) \exp[\mu(t) (t - t_0)]. \quad (10)$$

Mit Einbeziehung der Volumenzunahme während der Zufütterungsphase

$$F'(t) = F(t) \frac{V(t)}{V(t_0)} \quad (11)$$

kann der zeitabhängige Verdünnungsfaktor

$$\mu(t) = \mu_{set} + \frac{1}{t} \ln \left(\frac{V(t)}{V(t_0)} \right) \quad (12)$$

mit der Bedingung

$$\mu_{set} < \mu_{crit} \quad (13)$$

berechnet werden.

Der Vorteil dieser Regelung liegt darin, daß die Volumenzunahme mit berücksichtigt werden kann und so eine konstante Wachstumsrate über den gesamte Verlauf der Zufütterungsphase möglich ist, d.h., die zeitabhängige Wachstumsrate $\mu(t)$ steigt um ca. 20% gegenüber μ_{set} , um die Volumenzunahme kompensieren zu können.

3.1.1.1.2 Fed-Batch ohne Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors

Die Regelstrategie mit Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde nach den ersten beiden Kultivierungen geändert, da mit ihr folgende Schwierigkeiten verbunden waren: Erstens, das aktuelle Flüssigkeitsvolumen wurde aus der theoretisch zugefütterten Menge berechnet, da das tatsächliche Volumen nicht gemessen werden konnte. D.h., ein verändertes Zupumpen konnte nicht berücksichtigt werden, genausowenig wie die

Volumenänderung durch die Korrekturmittel Säure bzw. Base. Zweitens, die konstante Wachstumsrate μ bereitete gegen Ende der Zellkultivierung zunehmend Probleme, da der Sauerstoffbedarf mit steigender Zelldichte steigt und infolgedessen die gewünschte Sauerstoffsättigung von 30% nicht mehr eingehalten werden konnte.

Um diese Probleme zu beseitigen, wurde der Term der zeitabhängigen Zunahme der Wachstumsrate nach Gleichung 12 entfernt. Dies hat zur Folge, daß die tatsächliche Wachstumsrate μ durch Volumenzunahme während der Kultivierung kontinuierlich um ca. 20% abnimmt. Dies ist von Vorteil, da die Zellen längere Zeit aufgrund der kontinuierlich sinkenden Wachstumsrate mit Sauerstoff versorgt werden können. Nachteilig ist, daß die Prozeßzeit um einige Stunden ansteigt. Es wurde mit folgender vereinfachter Strategie zugefüttert:

$$m_s(t) = \left(\frac{\mu}{y_{x/s}} + m \right) X(t_0) V(t_0) \exp[\mu (t - t_0)] \quad (14)$$

3.1.1.1.3 Neuentwickeltes Verfahren: Simulated Fed-Batch

Zur Vereinfachung der Produktion der FDH wurde eine neuartige Zufütterungsstrategie entwickelt, bei der die Batch-Phase simuliert wird und die Zellen nach Verbrauch der Glucose automatisch in die Fed-Batch-Phase übergehen.

Hierzu wird die Zufütterung bei dieser Methode schon mit der Inokulation gestartet, d.h., die Batch-Phase wird bei diesem Verfahren simuliert (Simulated Fed-Batch), mit dem Vorteil, daß das Ende der Batch-Phase nicht durch den Nachweis des Glucose-Verbrauchs festgestellt werden muß und nicht, wie sonst üblich, die Zufütterung angeschaltet werden muß.

Ziel ist es, die Batch-Phase zur schnellen Zellproduktion simulieren zu können. Deshalb wird innerhalb der normalen Dauer der Batch-Phase (ca. 8 h) genausoviel Glucose zugepumpt, wie normalerweise im Batch-Medium vorgelegt wird. Im normalen Fed-Batch lag die Glucose im Batch-Medium in einer Konzentration von 6 g l^{-1} vor. Im Simulated Fed-Batch wurden dagegen im Batch-Medium nur 2 g l^{-1} Glucose vorgelegt und die restlichen 4 g l^{-1} innerhalb der Batch-Phase, d.h., über 8 Stunden zugepumpt. Hierbei handelt es sich um die normale Fed-Batch-Zufütterungsstrategie, d.h., die Wachstumsrate wurde konstant auf $0,12 \text{ h}^{-1}$ gehalten.

Wenn das Batch-Medium im Simulated Fed-Batch mit Zellen angeimpft wird, liegt mit 2 g l^{-1} genug Glucose vor, das sie mit $\mu = \mu_{max}$ wachsen können, bis die Zellen nach ca. 8 Stunden in einer so hohen Zelldichte vorliegen, daß sie mehr Glucose aufnehmen könnten, als zugefüttert wird, d.h. die Zellen verstoffwechseln die Glucose ab diesem Zeitpunkt so schnell, daß keine Glucose mehr nachweisbar ist. Jetzt beginnt die eigentliche Zufütterungsphase, denn die Zellen können nur noch mit $\mu = \mu_{set}$ wachsen.

In der Batch-Phase können die Zellen aufgrund des Glucose-Überschusses mit der maximalen Wachstumsrate wachsen, d.h.,

$$\mu = \mu_{max} \cdot \quad (15)$$

Wenn die Glucose in der simulierten Batch-Phase verbraucht ist, können die Zellen nur noch mit der Wachstumsrate μ wachsen, d.h.,

$$m_s(t) = \left(\frac{\mu}{y_{X/S}} + m \right) X(t_0) V(t_0) \exp[\mu (t - t_0)] \quad (16)$$

mit der Bedingung

$$\mu < \mu_{crit} \cdot \quad (17)$$

Es konnte gezeigt werden, daß der Verlauf der Zellkultivierung mit dieser simulierten Batch-Phase identisch mit dem eines normalen Fed-Batches ist (Abbildung 16). Als Vergleichskriterium sind die Rührerdrehzahlen einer normalen Fed-Batch-Kultivierung und einer Kultivierung mit dem Simulated Fed-Batch dargestellt. Da der pO_2 konstant auf 30% mit Hilfe der Rührerdrehzahl geregelt wurde, kann anhand der Rührerdrehzahl der Sauerstoffverbrauch und damit das Zellwachstum verglichen werden. Bei ca. 8 Stunden Prozeßzeit war die Glucose verbraucht und die Zufütterung wurde beim herkömmlichen Fed-Batch-Verfahren gestartet. Nach ca. 20 Stunden haben die Zellen die stationäre Phase erreicht. Das gleiche Bild zeigt sich beim Simulated Fed-Batch, nur daß hier die Zufütterung bereits bei der Inokulation gestartet wurde.

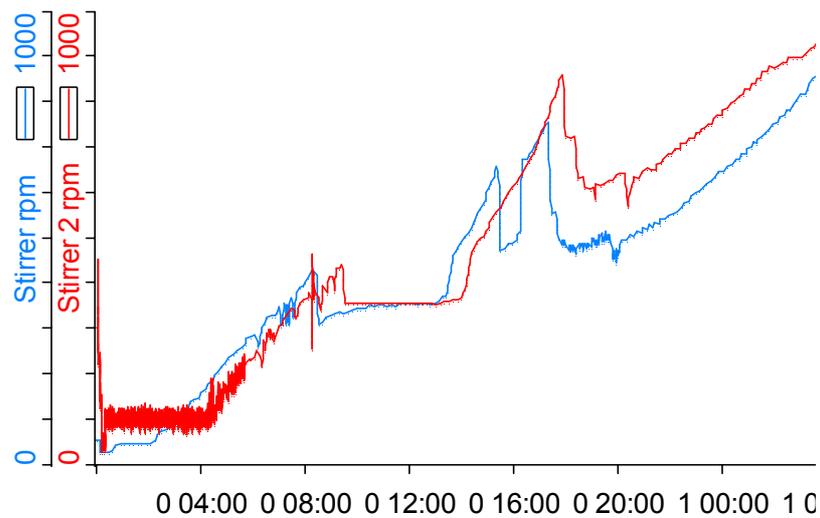


Abbildung 16: Vergleich des klassischen Fed-Batches mit dem Simulated Fed-Batch. Die Batch-Phase dauert bis ca. 9 Stunden Prozeßzeit, ab diesem Zeitpunkt war keine Glucose mehr nachweisbar. Ab ca. 20 Stunden Prozeßzeit befinden sich die Zellen im Steady-State. Zu erkennen ist, daß beide Kultivierungsverläufe nahezu identisch sind. Klassischer Fed-Batch mit Produktion von WT-FDH (rot), Simulated Fed-Batch mit Produktion von C23S-FDH (blau).

3.1.1.2 Sauerstoffeintrag

Um den Sauerstoffeintrag in den Fermenter sicherzustellen, wurde eine pO_2 -Regelsequenz programmiert (Tabelle 13). Der Sollwert von 30% Sauerstoffsättigung wurde mit Hilfe der Regelgrößen Rührerdrehzahl und Belüftungsrate und Überdruck eingestellt.

Tabelle 13: Entwickelte Regelungssequenz. Stirrer (Rührerdrehzahl [min^{-1}]), Flow (Begasungsrate [l min^{-1}]), Pressure (Überdruck [bar]), Ist-Wert (*.v), Soll-Wert (*.sp), Schrittweite (*.la).

Beschreibung	Programmierung
Regelalgorithmus	$\text{IF}(pO2.v < pO2.sp) \{ \text{Stirrer.sp} = \text{Stirrer.sp} * (100 + pO2.la * (pO2.sp - pO2.v) / 10) / 100 \}$ $\text{IF}(pO2.v > pO2.bv) \{ \text{Stirrer.sp} = \text{Stirrer.sp} * (100 - pO2.la * (pO2.v - pO2.sp) / 10) / 100 \}$
Regelbereich des Rührers	$\text{IF}(\text{Stirrer.sp} < 25) \{ \text{Stirrer.sp} = 25 \}$ $\text{IF}(\text{Stirrer.sp} > 1250) \{ \text{Stirrer.sp} = 1250 \}$
Regelung der Begasungsrate	$\text{Flow.sp} = 50 * \text{Stirrer.sp} / 1250$
Regelung des Überdrucks	$\text{Pressure.sp} = 1.5 * \text{Stirrer.sp} / 1250$

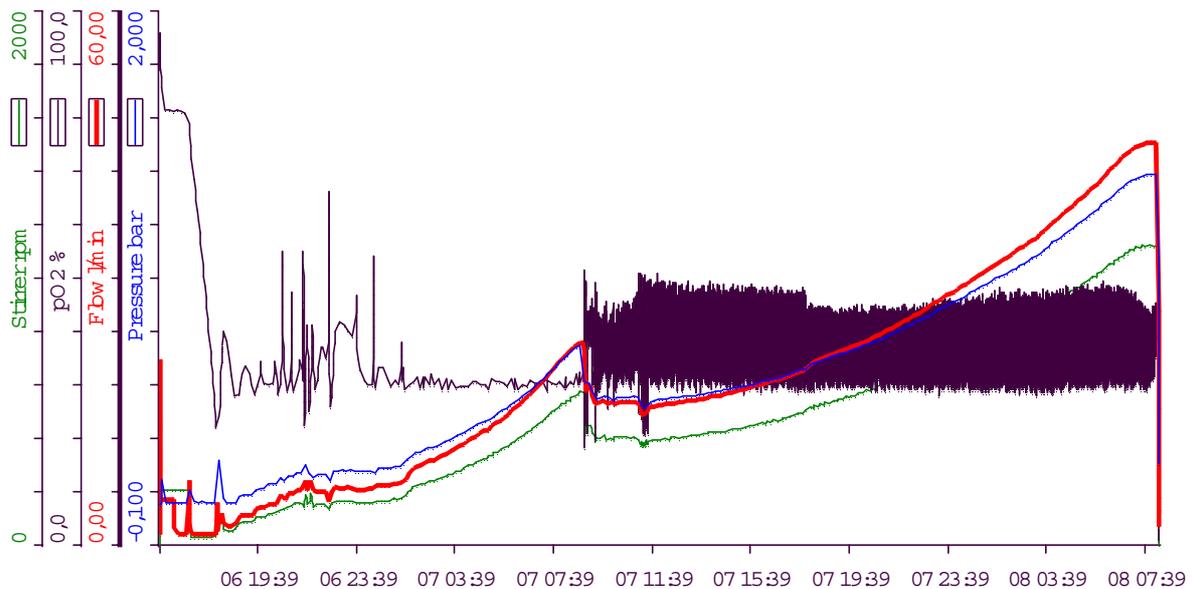


Abbildung 17: Regelung der Sauerstoffsättigung auf 30% über die gesamte Prozeßzeit. Durch das diskontinuierliche Zupumpen der Feed-Lösung oszilliert die Sauerstoffkonzentration im Steady-State, da die Zellen die Glucose sehr schnell verstoffwechseln. Es wurde die C23S/C262A-FDH produziert. pO_2 (schwarz); Belüftungsrate (rot); Rührerdrehzahl (grün); Druck (blau).

Mit dieser relativ einfachen Regelsequenz ließ sich der Soll-Wert unter allen Kultivierungsbedingungen schnell einstellen (Abbildung 17). Es ist zu erkennen, daß die Sauerstoffsättigung durch die Regelung der Belüftungsrate, Rührerdrehzahl und Überdruck konstant gehalten werden konnte. Im exponentiellen Anstieg der Regelgrößen Belüftungsrate, Rührerdrehzahl und Überdruck spiegelt sich das exponentielle Wachstum der Zellen wieder.

Problematisch erwies sich anfangs der unzureichende Sauerstoffeintrag in den Fermenter. Ab einer $OD_{600} > 160$ konnte eine 30%ige Sauerstoffsättigung nicht mehr gewährleistet werden und der Soll-Wert mußte auf 20% abgesenkt werden. Selbst die 20%ige Sauerstoffsättigung konnte nach einer Stunde nicht mehr eingehalten werden, so daß die Zellkultivierung abgebrochen werden mußte. Um den Sauerstoffeintrag zu erhöhen, wurde die Anordnung der Rührer verändert, d.h., die Rührerblätter wurden abgesenkt, um besser in das Medium eintauchen zu können. Des weiteren wurde die Zufütterungsstrategie geändert, indem der Verdünnungsfaktor nach Gleichung 12 nicht mehr berücksichtigt wurde.

3.1.1.3 Optimierung der IPTG-Induktion

Um den relativ teuren Induktor Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) optimal einsetzen zu können, wurde der Einfluß der IPTG-Konzentration in Abhängigkeit von der FDH-Bildungsrate untersucht. Hierzu wurde die Zunahme der Aktivität im Rohextrakt nach der Induktion verfolgt. Bei einer optischen Dichte von $OD_{600} = 60$ wurde induziert, hier befindet sich das System im Gleichgewicht (Abbildung 17). Vor der Induktion ist keine FDH-Aktivität zu messen, erst nach Induktion steigt die Volumenaktivität linear an (Abbildung 18).

Die Induktion wurde mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen durchgeführt und ein Optimum der FDH-Bildungsrate bei 1 mM IPTG gefunden (Abbildung 19). Mit zunehmender Induktorkonzentration steigt die FDH-Bildungsrate zunächst an und fällt bei höheren Konzentrationen wieder ab.

Es wurde versucht, die Produktbildungsrate durch eine zweite IPTG-Induktion 3 Stunden nach der ersten Induktion, weiter zu steigern. Diese zweite IPTG-Induktion zeigte allerdings keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

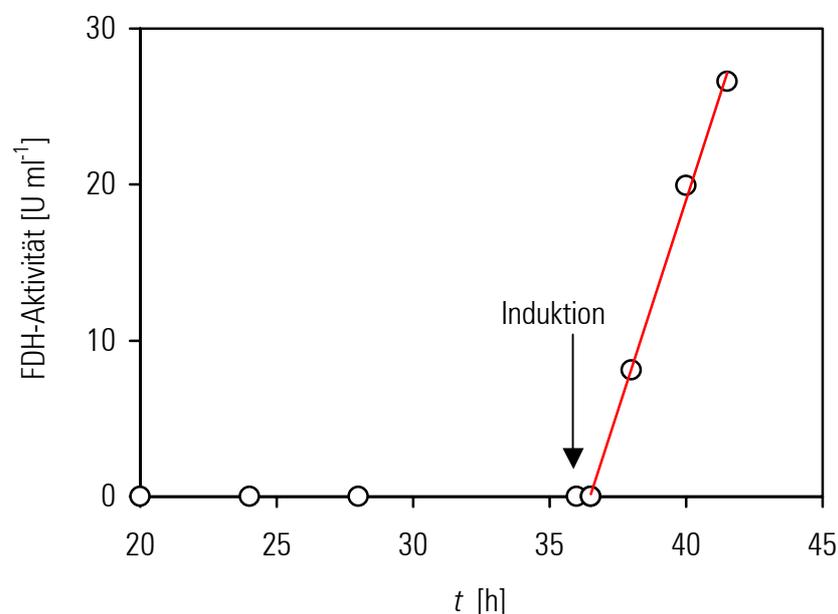


Abbildung 18: Zunahme der FDH-Aktivität nach Induktion. Es wurde bei 36 Stunden Prozeßzeit induziert. Aus dem linearen Anstieg kann die FDH-Bildungsrate bestimmt werden.

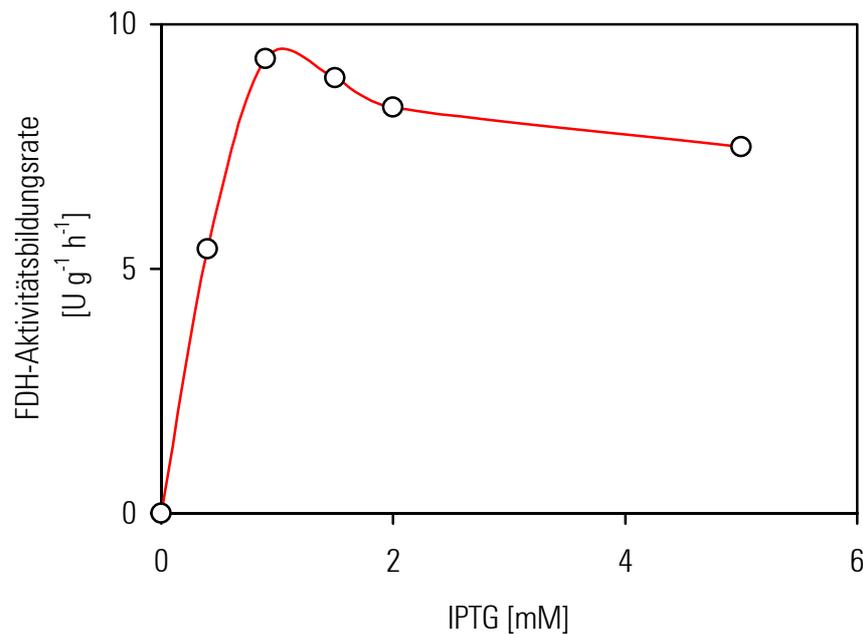


Abbildung 19: FDH-Bildungsrate in Abhängigkeit von der IPTG-Konzentration. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte von $OD_{600} = 60 - 70$.

3.1.1.4 Abbruchkriterium der Hochzelldichtekultivierung

Bei den optimierten Hochzelldichtekultivierungen trat ab einer optischen Dichte von $OD_{600} > 200$ Schaumbildung auf. Die Schaumbildung ließ sich auch durch Zugabe von Antischaum nur kurzzeitig verhindern und war letztendlich das Abbruchkriterium der Kultivierung, da der Schaum den Abluftfilter des Fermenters zuzusetzen drohte.

3.1.2 Ergebnisse der Optimierung

3.1.2.1 Einfluß der IPTG-Induktion auf die Wachstumsrate

Nach der IPTG-Induktion erniedrigte sich die Wachstumsrate μ , d.h., die Zellen verwendeten nicht mehr das gesamte Substrat für den Bau- und Erhaltungsstoffwechsel, sondern ein gewisser Anteil wurde für die Expression der FDH benötigt (Abbildung 20). Vor Induktion wuchsen die Zellen mit $0,12 \text{ h}^{-1}$, wie es durch die Fed-Batch-Strategie vorgegeben worden ist. Nach Induktion erniedrigte sich die Wachstumsrate auf $0,08 \text{ h}^{-1}$.

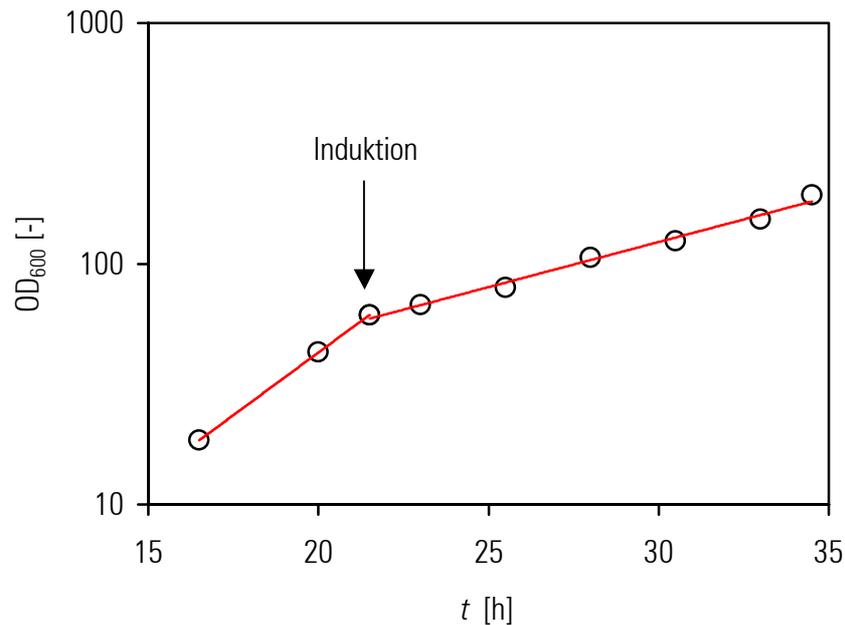


Abbildung 20: Erniedrigung der Wachstumsrate nach Induktion. Nach Induktion bei 21,5 h Prozesszeit erniedrigte sich die Wachstumsrate von $0,12 \text{ h}^{-1}$ auf $0,08 \text{ h}^{-1}$.

3.1.2.2 Produktbildungsrate

Nach der Induktion mit IPTG bei einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 60$ stieg die FDH-Konzentration ca. 7 Stunden linear an. Danach verlangsamte sich die Bildungsrate, blieb aber auch weiterhin konstant (Abbildung 21).

Es ist anzunehmen, daß 7 Stunden nach Induktion essentielle Bestandteile im Kultivierungsmedium verbraucht waren, d.h., eine Limitierung könnte die Ursache für die erniedrigte Produktbildungsrate sein.

Die spezifische Aktivität dagegen stieg zunächst linear an, blieb dann aber gegen Ende der Kultivierung konstant bei ca. $0,9 - 1 \text{ U mg}^{-1}$, d.h., die FDH wird am Ende der Kultivierung zu 15% des Gesamtproteins exprimiert (Abbildung 22).

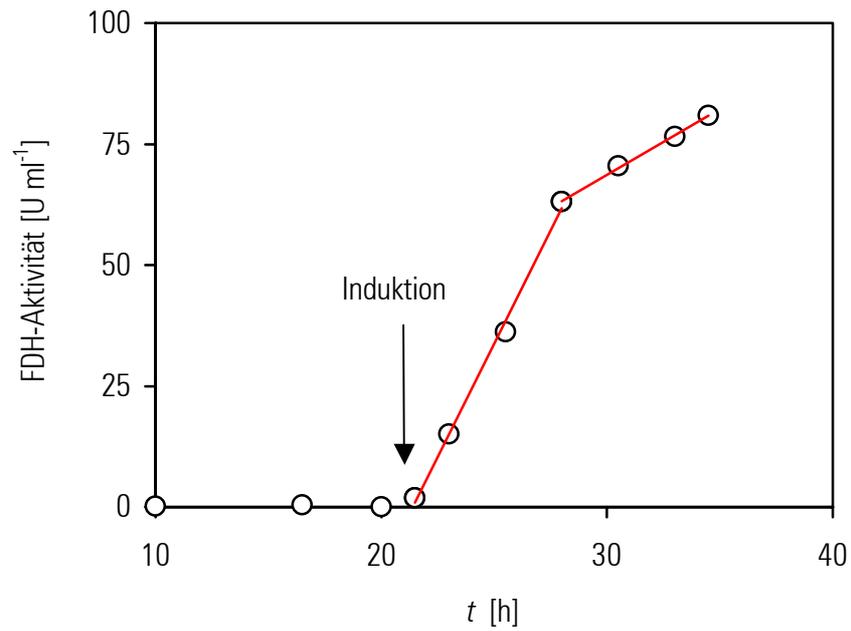


Abbildung 21: Zunahme der FDH-Bildung. Die Induktion erfolgte bei 21,5 h Prozeßzeit. Die Bildungsrate ist nach Induktion konstant, erniedrigte sich aber nach ca. 7 Stunden nach Induktion, blieb aber weiterhin konstant.

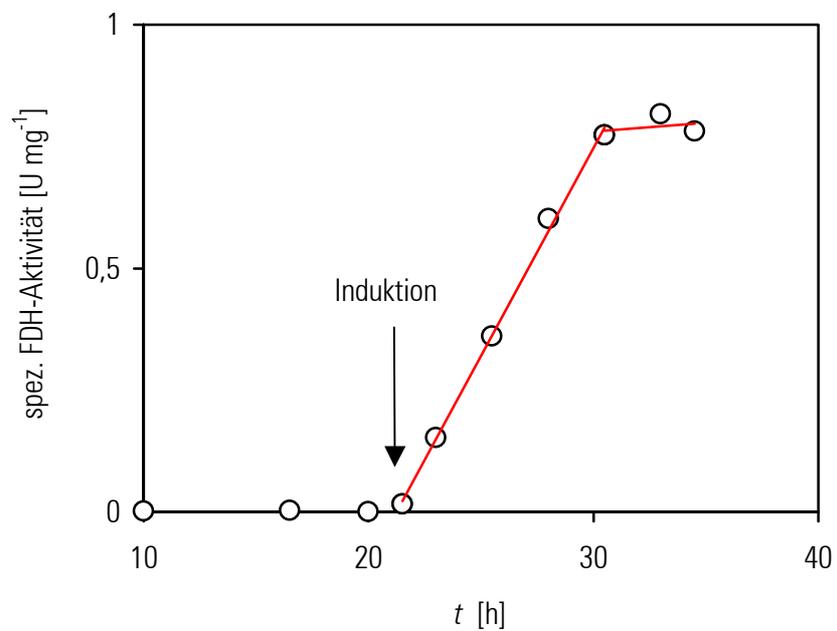


Abbildung 22: Zunahme der spezifischen FDH-Aktivität während der Kultivierung. Die Induktion erfolgte bei 21,5 h Prozeßzeit.

Tabelle 14: Ergebnisse der sechs Hochzelldichtekultivierungen. Biofeuchtmasse (WCW), Trockenzellmasse (DCW).

FDH	Prozeßzeit [h]	OD ₆₀₀ [-]	WCW [g l ⁻¹]	DCW [g l ⁻¹]	spez. Akt. [U mg ⁻¹]	Aktivität [U]
His ₆	42	163	324	65	0,4	100.000
C23S	37	178	348	70	0,8	280.000
WT	35	193	340	76	0,8	360.000
C23S/C262A	37	204	381	75	1,0	440.000
C23S/C262V	36	203	381	84	0,8	520.000
C262V	41	209	443	90	0,9	570.000

3.1.2.3 Automatisierung

Nach Ende der Optimierung der Hochzelldichtekultivierung konnte die rekombinante Produktion der FDH nach Inokulation vollständig automatisiert betrieben werden. Allein, die IPTG-Induktion mußte noch von Hand durchgeführt werden.

3.1.2.4 Übersicht über die Kultivierungsergebnisse

Die Ausbeuten lagen bei den sechs Zellkultivierungen zwischen 100.000 und 570.000 U mit einer maximalen Trockenzellmassekonzentration von 90 g l⁻¹ (Tabelle 14). Diese Unterschiede sind damit zu erklären, daß bei den einzelnen Kultivierungen die Bedingungen geändert wurden, um die rekombinante Produktion der FDH mittels Hochzelldichtekultivierung optimieren zu können.

Nach Optimierung der Kultivierungsbedingungen konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von 1.600 U l⁻¹ h⁻¹ erzielt werden. Dies entspricht einer FDH-Konzentration von 6,0 g l⁻¹.

3.2 Aufarbeitung

3.2.1 Adaptierung des bestehenden Verfahrens

Mit dem bestehenden Verfahren zur FDH-Aufarbeitung [Kroner *et al.*, 1982 a; Kroner *et al.*, 1982 b; Weuster-Botz *et al.*, 1994, Gieren], welches ursprünglich zur Aufarbeitung der mittels der Hefe *Candida boidinii* gewonnenen FDH entwickelt worden war, konnte auch die mit Hilfe der Hochzelldichtekultivierung gewonnene rekombinante *Candida boidinii*-FDH aus *Escherichia coli* aufgereinigt werden.

Um die Aufarbeitung zu vereinfachen und zu verbessern, sollte nun das bestehende *Candida boidinii*-Verfahren an die Erfordernisse der mit Hilfe der Hochzelldichtekultivierung gewonnenen rekombinanten *Candida boidinii*-FDH aus *Escherichia coli* angepaßt werden (Abbildung 23).

Das ursprüngliche *Candida boidinii*-Verfahren sah nach Zellaufschluß die Grundoperationen Hitzedenaturierung, Extraktionen und Chromatographie vor. Zur Adaptierung wurde das Protokoll in so fern verändert, als daß keine Hitzedenaturierung mehr durchgeführt wurde, da bei diesem Schritt kein Reinigungseffekt bei der rekombinant gewonnenen FDH erzielt werden kann und die Inaktivierung von Proteasen nicht notwendig ist. Damit konnte auch auf die Zugabe von Na-Formiat verzichtet werden. Des weiteren wurde bei der Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF nach dem

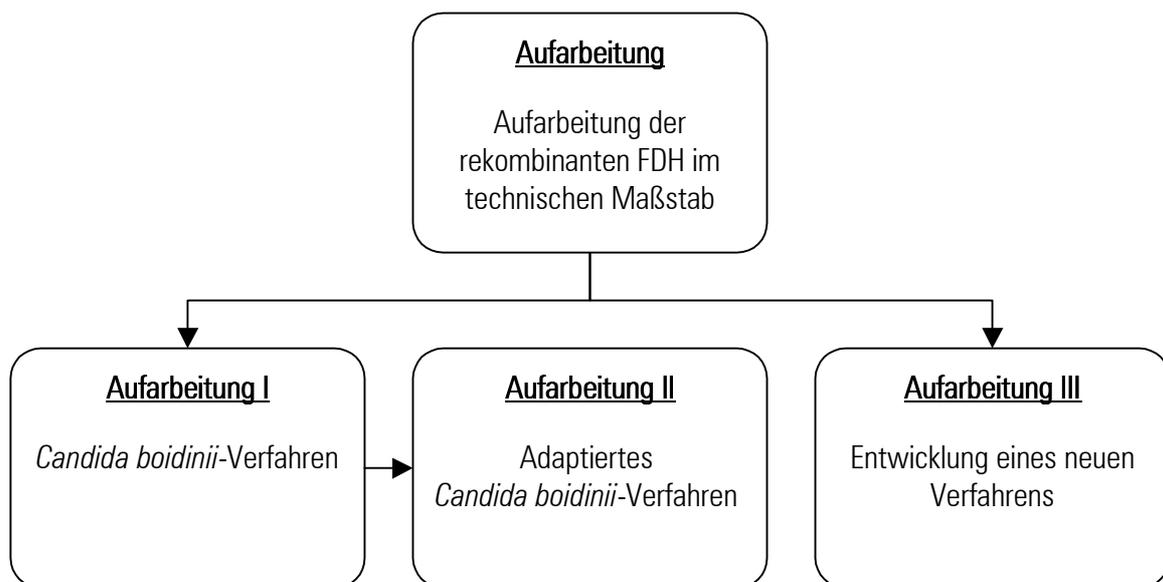


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Verfahrens zur Aufarbeitung der rekombinanten FDH, gewonnen mittels Hochzelldichtekultivierung. Einerseits wurde das bestehende *Candida boidinii*-Verfahren adaptiert, andererseits wurde ein neues Verfahren erarbeitet.

Tabelle 15: Schematische Darstellung des *Candida boidinii*-Verfahrens [Gieren] im Vergleich zum adaptierten Verfahren zur Aufreinigung der rekombinanten FDH aus *Escherichia coli*.

Grundoperationen	<i>Candida boidinii</i> -Verfahren	Adaptiertes Verfahren
Zellaufschluß	Mechanisch mit Kugelmühle/Homogenisator	Mechanisch mit Kugelmühle/Homogenisator
Proteinreinigung	Hitzenaturierung	-
Zellabtrennung	2-Phasen-System	2-Phasen-System
Abtrennung des PEGs	2-Phasen-System	2-Phasen-System
Abtrennung des PEGs	Ultrafiltration	Ultrafiltration
Proteinreinigung	Chromatographie	verbesserte Chromatographie
Volumenreduktion	Ultrafiltration	Ultrafiltration

Durchlauf anstatt mit 150 mM NaCl, wie im *Candida boidinii*-Verfahrens beschrieben, zuerst mit 60 mM NaCl gewaschen und anschließend mit 120 mM NaCl eluiert (Tabelle 15).

Diese Änderungen führten einerseits zu einer vereinfachten Aufarbeitung, da der Hitzenaturierungsschritt nicht mehr notwendig ist und andererseits zu einem größeren Reinigungseffekt, statt 2 – 3 U mg⁻¹, dies entspricht einer Reinheit von 30 – 50%, konnten nun 3 – 4 U mg⁻¹ mit einer Reinheit von 60 – 80% erzielt werden (Tabelle 16).

Tabelle 16: Aufreinigungstabelle des *Candida boidinii*-Verfahrens [Gieren] und des adaptierten Verfahrens. Bei beiden Fällen wurde die rekombinante C23S/C262A-FDH aufgereinigt.

Operation	<i>Candida boidinii</i> -Verfahren			adaptiertes Verfahren		
	Aktivität [U]	spez. Akt. [U mg ⁻¹]	Ausbeute [%]	Aktivität [U]	spez. Akt. [U mg ⁻¹]	Ausbeute [%]
Zellaufschluß	104.000	0,5	100	65.000	1,1	100
Hitzenaturierung	106.000	0,5	101	-	-	-
1. Phasen-System	87.000	0,4	83	51.000	1,1	79
2. Phasen-System	87.000	0,6	84	50.000	1,3	77
Anionenaustauscher	81.000	2,8	78	42.000	4,1	64
Glycerin-Stock	72.000	2,5	69	40.000	4,2	62

Tabelle 17: Schematischer Vergleich des *Candida boidinii*-, des adaptierten und des neuentwickelten Verfahrens zur Aufarbeitung der rekombinanten FDH aus *Escherichia coli*.

Operation	<i>Candida boidinii</i> - Verfahren	adaptiertes Verfahren	neues Verfahren
Zellaufschluß	Mechanisch mit Kugelmühle/ Homogenisator	Mechanisch mit Kugelmühle/ Homogenisator	PEG-Aufschluß
Proteinreinigung	Hitzenaturierung	-	-
Zellabtrennung	2-Phasen-System	2-Phasen-System	2-Phasen-System
Abtrennung des PEGs	2-Phasen-System	2-Phasen-System	-
Abtrennung des PEGs	Ultrafiltration	Ultrafiltration	-
Proteinreinigung	Chromatographie	verbesserte Chromatogr.	PEG-Fällung
Volumenreduktion	Ultrafiltration	Ultrafiltration	-

3.2.2 Entwicklung eines neuen Verfahrens

Um die Aufarbeitung weiter zu vereinfachen und kostengünstiger zu gestalten, wurde ein neues Verfahren entwickelt, welches im Vergleich zum adaptierten Verfahren weitere Vorteile aufweist. Erstens, hier entfällt die Separation der Zellen, es wird aus diesem Grunde kein Separator benötigt, zweitens, die Zellen werden nicht mehr mechanisch aufgeschlossen, d.h., es wird keine Kugelmühle bzw. Homogenisator benötigt und drittens, die Chromatographie- und die Ultrafiltrationsschritte entfallen (Tabelle 17). Die Chromatographie- und die Ultrafiltrationsschritte stellen den zeitaufwendigsten Teil der bestehenden Aufarbeitungsverfahren (*Candida boidinii*- und adaptiertes Verfahren) dar.

3.2.2.1 Zellaufschluß: PEG-Aufschluß

Untersuchungen zeigten, daß die Zellyse mit Lysozym prinzipiell eine geeignete Methode, um Zellen aufzuschließen, darstellen könnte. Die durch den Zellaufschluß freigesetzte DNA führte allerdings dazu, daß die Zellsuspension einen gelartigen Zustand annahm. Um dies zu vermeiden, wurde 30% PEG 400 vor Zugabe des Lysozyms zugegeben. Das PEG 400 beeinträchtigt den enzymatischen Zellaufschluß nicht, verhindert aber das Gelieren. Da PEG 400 nach dem Zellaufschluß für das 2-Phasen-System ohnehin zugegeben wird, ist das Lysozym/PEG 400-Aufschlußverfahren mit den nachfolgenden Aufreinigungsschritten kompatibel (Daten nicht gezeigt).

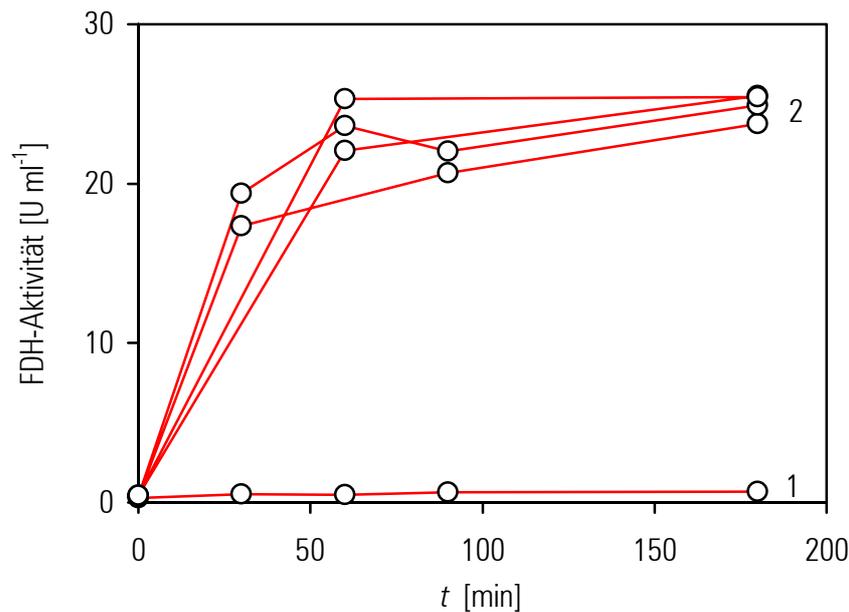


Abbildung 24: Vergleich der Aufschlußgeschwindigkeit der *Escherichia coli* JM105-Zellen durch PEG 400 in Abhängigkeit des Biofeuchtmasse-Anteils beim PEG-Aufschluß bei 37°C. Es wurde 30% (w/w) PEG 400 zu der Zellsuspension gegeben. Kontrolle, keine PEG 400-Zugabe (1); 20, 30, 40, 50% Biofeuchtmasse, von oben nach unten (2).

Überraschenderweise zeigten weitere Untersuchungen, daß die Zellen schon alleine durch PEG 400 bei 37°C vollständig innerhalb von zwei Stunden aufgeschlossen werden können (Abbildung 24). Die Aufschlußgeschwindigkeit ist dabei nicht von der Biomassekonzentration in der Aufschlußlösung abhängig.

Darüber hinaus kann der PEG 400-Aufschluß im Vergleich zum Ultraschall- und Kugelmühlenaufschluß die Zellen effektiver aufschließen, so daß eine ca. 20% höhere Volumenaktivität nach Zellaufschluß gemessen werden kann (Abbildung 25). In Vorversuchen konnte kein Unterschied bei der Ausbeute zwischen Kugelmühlen- und Ultraschallaufschluß festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Aufschlußsuspension setzt sich aus der Zellsuspension und PEG 400 zusammen (Tabelle 18). Der Grund, weshalb PEG 400 Zellen aufzuschließen vermag, ist noch nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung ist, daß das PEG durch Bildung einer Hydrathülle Wasser an sich bindet und so den osmotischen Druck extrem erhöht, was zu einer Deplasmolyse der Zellen führt [Meury, 1994].

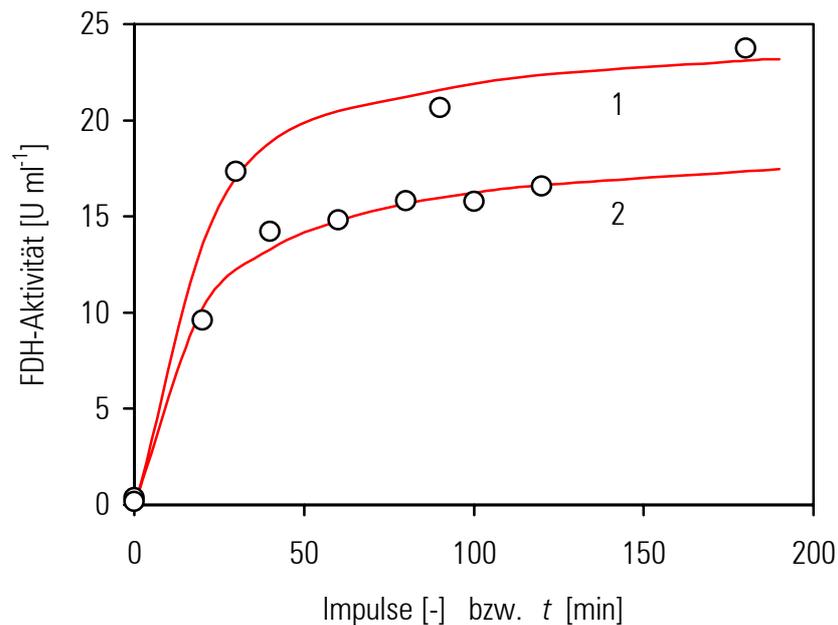


Abbildung 25: PEG 400- und Ultraschallaufschluß von *Escherichia coli* JM105-Zellen im Vergleich. Der Verdünnungsfaktor, hervorgerufen durch die PEG 400-Zugabe beim PEG-Aufschluß, ist bei der Darstellung der Meßergebnisse berücksichtigt. PEG-Aufschluß (1), Ultraschallaufschluß (2).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die Permeabilisierung der Zellmembran durch das PEG 400. Hitzedenaturiertes T4-Lysozym besitzt keine Muramidaseaktivität mehr, trotzdem weist es noch antibakterielle Wirkung auf. Dies wird auf den amphipathischen C-Terminus des T4-Lysozyms, der eine Helix ausbildet, zurückgeführt. Diese Helix kann die Zellmembranen von Bakterien, Pilzen und Pflanzen schädigen [Düring *et al.*, 1999]. Auch PEG 400 bildet eine amphipathische Helix mit seinen alternierenden Ethylen-Sauerstoff-Einheiten aus. Möglicherweise können diese PEG-Helices in die Zellmembran eindringen und sie permeabilisieren.

Tabelle 18: Zusammensetzung der PEG-Aufschlußlösung. Die Angaben in den Klammern stellen die Anteile für das folgende 2-Phasen-System dar (Tabelle 19). Die Zellsuspension stammt aus der Hochzelldichtekultivierung.

Zusammensetzung	Anteil [%] (w/w)
Zellsuspension	70 (43)
PEG 400	30 (18)

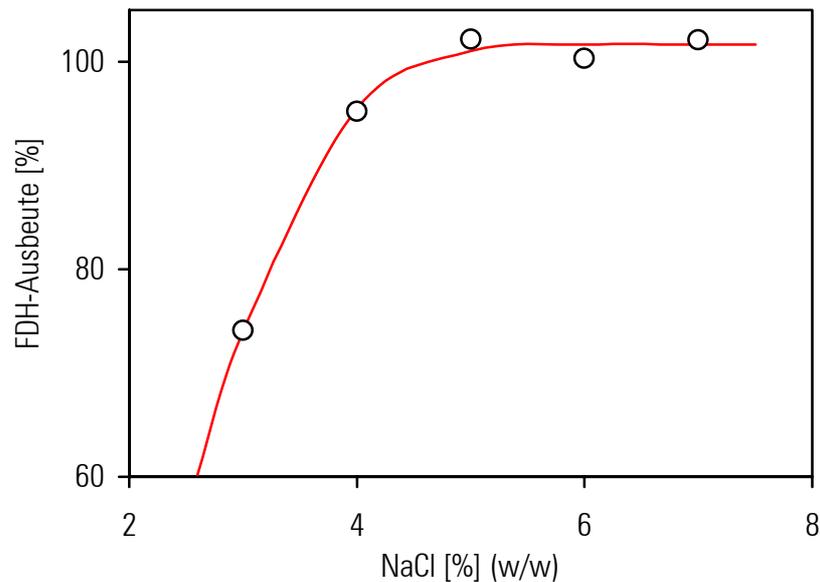


Abbildung 26: Dargestellt ist der letzte Schritt der Optimierung des neuen Phasen-Systems. Die FDH-Ausbeute in der Oberphase ist in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration aufgetragen. Das Phasen-System ist für eine Trennung bei einer Temperatur von 20°C optimiert.

3.2.2.2 Extraktion: PEG-Phasen-System

Nach dem Zellaufschluß durch PEG 400 sollte die Zellabtrennung mit Hilfe eines Polymer/Salz-Phasen-Systems (PEG 400/K₂HPO₄) erfolgen. Dazu war es nun notwendig, die Zusammensetzung des bestehenden 2-Phasen-Systems auf die neuen Bedingungen zu optimieren (Daten nicht gezeigt). Bei dem neuen Phasen-System wurde darüber hinaus Na-Formiat durch NaCl ersetzt, da bei diesem Verfahren kein Hitzedenaturierungsschritt vorgesehen ist (Abbildung 26).

Die Zusammensetzung des bisherigen und des neuentwickelten 2-Phasen-Systems sind in Tabelle 19 dargestellt. Nach ca. 2 Stunden hat sich das Phasen-System vollständig getrennt, bei 20°C konnte im Labormaßstab eine Ausbeute von 89% erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.3 Fällung: PEG-Fällung

Als Reinigungs- und Konzentrierungsschritt wurde anschließend eine PEG-Fällung etabliert. Dazu wird die Oberphase des Phasen-Systems abgenommen und ein PEG 6000/Wasser-Gemisch zugegeben. Die FDH fällt aus und das sedimentierte Präzipitat kann abgenommen werden (Abbildung 27).

Tabelle 19: Vergleich der Zusammensetzung des bei der Extraktion der FDH aus *Candida boidinii* eingesetzten 2-Phasen-Systems [Gieren] und des neuentwickelten 2-Phasen-Systems. Anteile aus PEG-Aufschluß (*) (Tabelle 18). Die Zellsuspension stammt aus der Hochzelldichtekultivierung.

Zusammensetzung	Anteil [%] (w/w)	
	<i>Candida boidinii</i> -2-Ph.-System	neues 2-Phasen-System
Zellsuspension	40	43*
PEG 400	18	18*
H ₂ O	18,7	21
K ₂ HPO ₄	6	5
PEG 1550	7	7
Na-Formiat	10	-
NaCl	0,3	6

Die PEG 6000-Konzentration wurde mit 20% so gewählt, daß die FDH vollständig präzipitiert, Fremdproteine aber möglichst in Lösung bleiben (Tabelle 20). Nach diesem Reinigungsschritt liegt die FDH als gefälltes Protein mit einer spezifischen Aktivität von ca. 2,5 U mg⁻¹ vor. Dies entspricht ca. 40% reinem Enzym. Mit dem bisherigen *Candida boidinii*-Verfahren wurde der gleiche Reinheitsgrad erzielt [Gieren].

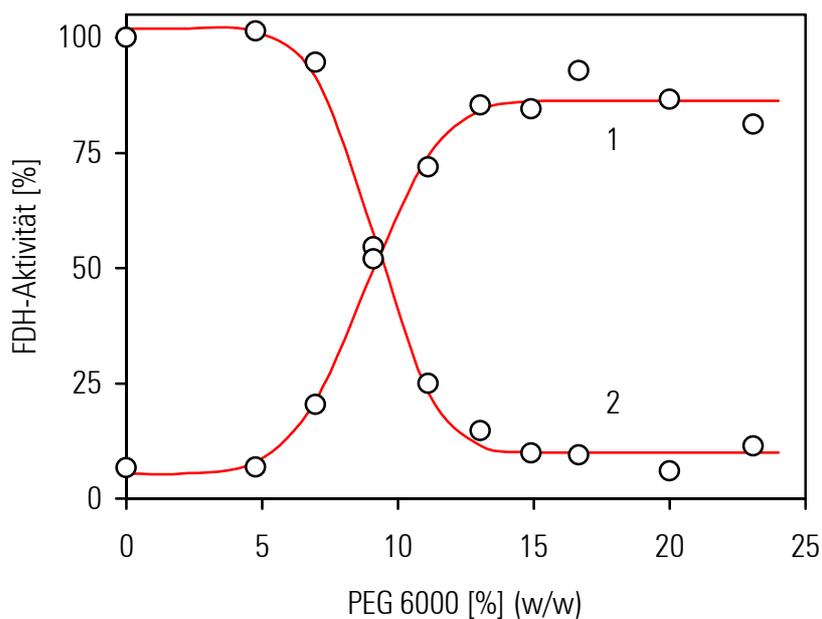


Abbildung 27: Optimierung der Fällung der FDH aus der Oberphase des 2-Phasen-Systems mit PEG 6000. Gefälltes Protein (1), Oberphase (2).

Tabelle 20: Zusammensetzung des PEG-Fällungssystems.

Zusammensetzung	Anteil [%] (w/w)
Oberphase des 2-Phasen-Systems	70
H ₂ O	10
PEG 6000	20

Die Wasserzugabe dient nicht allein dem Lösen des PEG 6000. Wenn es nicht zugegeben wird, bildet sich ein 2-Phasen-System aus und das Protein löst sich zum Teil in der Unterphase. Nach 2 – 3 Stunden ist das gefällte Protein sedimentiert und die Ausbeute beträgt > 95% (Daten nicht gezeigt). Das Volumen des gefällten Proteins kann durch Zentrifugation weiter verringert werden.

3.2.2.4 Lagerung

Die gefällte FDH kann ohne weitere Behandlung und ohne Aktivitätsverlust eingefroren werden. Des Weiteren kann die gefällte FDH nach Zugabe von Wasser lyophilisiert werden. Dabei treten Aktivitätsverluste von ca. 10% auf.

3.2.2.5 Ausbeuten bei Aufarbeitung im halbtechnischen Maßstab

Die Ausbeute im neuentwickelten Aufarbeitungsverfahren im halbtechnischen Maßstab liegt bei 62% (Tabelle 21). Die größten Verluste ergaben sich beim 2-Phasen-System. Dies kann auf die erhöhte Temperatur von 25°C während der Aufarbeitung zurückgeführt werden. Das 2-Phasen-System wurde für 20°C optimiert. Die FDH kann mit einer spezifische Aktivität von 2,5 U mg⁻¹ nach der Fällung erhalten werden, dies entspricht einer Reinheit von 40%.

Tabelle 21: Aufreinigungstabelle des neuentwickelten Aufarbeitungsverfahrens. Es wurde die rekombinante C23S/F285S-FDH aus *Escherichia coli* aufgearbeitet.

Operation	Aktivität [U]	spez. Aktivität [U mg ⁻¹]	Ausbeute [%]
PEG-Aufschluß	148.000	0,5	100
Phasen-System	73.000	-	61
PEG-Fällung	75.000	2,5	62

3.3 Diskussion

3.3.1 Produktion

Die Produktion von Proteinen mit Hilfe von rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen weist einige Vorteile gegenüber den Wildtyp-Stämmen auf. Infolgedessen wurde die rekombinante Produktion der FDH in *Escherichia coli* JM105 und vorhandenen pBTac2-FDH-Plasmiden [Slusarczyk, 1997] mit einem Fed-Batch-Verfahren durchgeführt. Hierzu wurde im Vergleich zu den bisher beschriebenen Verfahren [Korz *et al.*, 1994] eine neue Zufütterungsstrategie entwickelt. Hier wird die Zufütterung mit der Inokulation gestartet und die Zellen gelangen nach Verbrauch der C-Quelle automatisch in den Steady-State der eigentlichen Zufütterungsphase des Fed-Batches.

Im Vergleich zum bisherigen Verfahren zur Produktion der FDH mit Hilfe der Hefe *Candida boidinii* mit einer Raum-Zeit-Ausbeute an FDH von $150 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [Weuster-Botz & Wandrey, 1995] zeichnet sich die entwickelte Hochzelldichtekultivierung durch eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute an FDH von $1.600 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ aus. Die entwickelte Hochzelldichtekultivierung besitzt damit im Vergleich zum bisherigen Verfahren eine um 1.100% gesteigerte Produktivität.

Die Produktivität des entwickelten Verfahrens in bezug auf die Produktion an rekombinantem Protein liegt mit $6,0 \text{ g l}^{-1}$ im Bereich der produktivsten bisher beschriebenen Verfahren (Tabelle 6).

Mit dem verwendeten Plasmid pBTac2 und dem Wirtsorganismus *Escherichia coli* JM105 konnte eine FDH-Expression von 15% an löslichem Gesamtprotein erzielt werden. Jedoch können Expressionen von $> 50\%$ an löslichem Gesamtprotein erzielt werden [Ansorge & Kula, 2000 b]. Sollte es möglich sein, die Expression weiter zu verbessern, könnte eine nochmalige Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute bzw. der Produktivität verwirklicht werden.

3.3.2 Aufarbeitung

Für die Aufarbeitung der NAD-abhängigen FDH aus der Hefe *Candida boidinii* sind mittlerweile zahlreiche Verfahren beschrieben worden [Gieren; Cordes & Kula, 1986; Walsdorf *et al.*, 1990; Cordes & Kula, 1994; Labrou, 2000].

Ein Verfahren stellt die wäßrige 2-Phasen-Extraktion dar (Reinheit: 30 – 50%, Ausbeute: 75%) [Kroner *et al.*, 1982 a; Kroner *et al.*, 1982 b; Weuster-Botz *et al.*, 1994]. Mit diesem Verfahren konnte auch die rekombinante *Candida boidinii*-FDH aus *Escherichia coli* aufgearbeitet werden (Tabelle 16), jedoch ist dieses Protokoll ursprünglich für die

Aufarbeitung aus der Hefe *Candida boidinii* entwickelt worden. Deshalb wurde es an die Erfordernisse der Aufarbeitung aus *Escherichia coli* adaptiert. Dabei konnten Vereinfachungen bzw. Verbesserungen verwirklicht werden. Zum einen konnte auf die Hitzedenaturierung verzichtet werden, zum anderen mit dem Chromatographieschritt ein höherer Reinheitsgrad erzielt werden; anstatt einer Reinheit von 30 – 50% mit dem *Candida boidinii*-Verfahren wurde nun eine Reinheit von 60 – 80% mit einer Ausbeute von 70% mit dem adaptierten Protokoll erreicht.

Darüber hinaus wurde ein neues Verfahren entwickelt, welches sich durch weitere Vereinfachungen in der Aufarbeitung auszeichnet. Die Zellen werden mit PEG 400 aufgeschlossen, die Zelltrümmer mit einem PEG/Salz-Phasen-System abgetrennt und die FDH in einer PEG-Fällung gereinigt. Nach dieser Aufarbeitung lag die FDH mit einer Reinheit von 30 – 40% vor und es konnten Ausbeuten von 62% erzielt werden.

Das adaptierte Verfahren liefert im Vergleich zum neuentwickelten Verfahren eine höhere Reinheit bei vergleichbarer Ausbeute. Im kleineren Maßstab stellt es deshalb das geeignetere Verfahren zur Aufreinigung der FDH dar. Für die Aufreinigung im technischen Maßstab ist allerdings das neuentwickelte Verfahren zu bevorzugen, da die zeitaufwendigen Schritte, wie mechanischer Zellaufschluß, Ultrafiltration und Chromatographie entfallen und die erzielbare Reinheit für technische Prozesse ausreichend ist. Darüber hinaus kann auf den Einsatz der Geräte Homogenisator bzw. Kugelmühle und Separator verzichtet werden.

Für die Aufreinigung der rekombinanten *Candida boidinii*-FDH aus *Escherichia coli* ist am Institut für Enzymtechnologie, Düsseldorf, ein weiteres Verfahren entwickelt worden [Reichert *et al.*, 2001]. Mit diesem Verfahren kann die rekombinante FDH mittels Affinitätschromatographie im Fließbett aufgereinigt werden. Dabei wird nach Zellaufschluß die Suspension über ein Fließbett gegeben, die FDH bindet an ein Pseudo-Analogon zum Cofaktor NAD, Procion Red HE-3B, und kann anschließend mit NAD eluiert werden. Im Anschluß daran wird eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (Reinheit: > 95%, Ausbeute: 75%). Von Nachteil bei diesem Verfahren ist, daß es zwei Chromatographieschritte benötigt und deshalb ein großer technischer Aufwand erforderlich ist. Des weiteren besitzt das Affinitätschromatographiematerial nur eine geringe Kapazität für die FDH, so daß zur Aufreinigung im technischen Maßstab entweder viel Adsorbenz oder mehrere Säulenläufe benötigt werden.

4 Stabilitätsuntersuchungen

4.1 Homologiemodellierung der Struktur der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*

4.1.1 Entwicklung des Modells

Um die Lage der Aminosäureaustausche in den Cystein-defizienten FDH-Muteinen darstellen zu können, wurde eine theoretische 3D-Struktur der *Candida boidinii*-FDH berechnet (Abbildung 28).

Aufgrund der relativ großen Sequenzhomologie zwischen der *Candida boidinii*-FDH und anderer, bereits kristallisierter Dehydrogenasen, konnte die Homologiemodellierung durchgeführt werden. Dieses Homologiemodell beruht im wesentlichen auf der 3D-Struktur der *Pseudomonas sp.* 101-FDH, da die *Candida boidinii*-FDH zu diesem Enzym die größte Ähnlichkeit aller bisher aufgeklärten 3D-Strukturen hat (Tabelle 3, Tabelle 22). Es kann aufgrund der großen Homologie angenommen werden, daß das Modell die wesentlichen Teile der *Candida boidinii*-FDH richtig wiedergibt [Slusarczyk *et al.*, 2000; Labrou & Rigden, 2001].

Die Berechnung des Modells wurde an der Schweizer Proteindatenbank EXPASY (www.expasy.ch) mit dem Programm SWISS-MODEL durchgeführt [Guex *et al.*, 1999]. Die 3D-Strukturen konnten mit dem dort zur Verfügung gestellten Programm SWISS-PDB-Viewer, Version 3.7, visualisiert werden [Guex & Peitsch, 1997]. Bei der Berechnung einer 3D-Struktur werden zunächst strukturcharakterisierte Template gesucht, die eine möglichst hohe Sequenzhomologie zur Zielstruktur aufweisen (Tabelle 22). Es

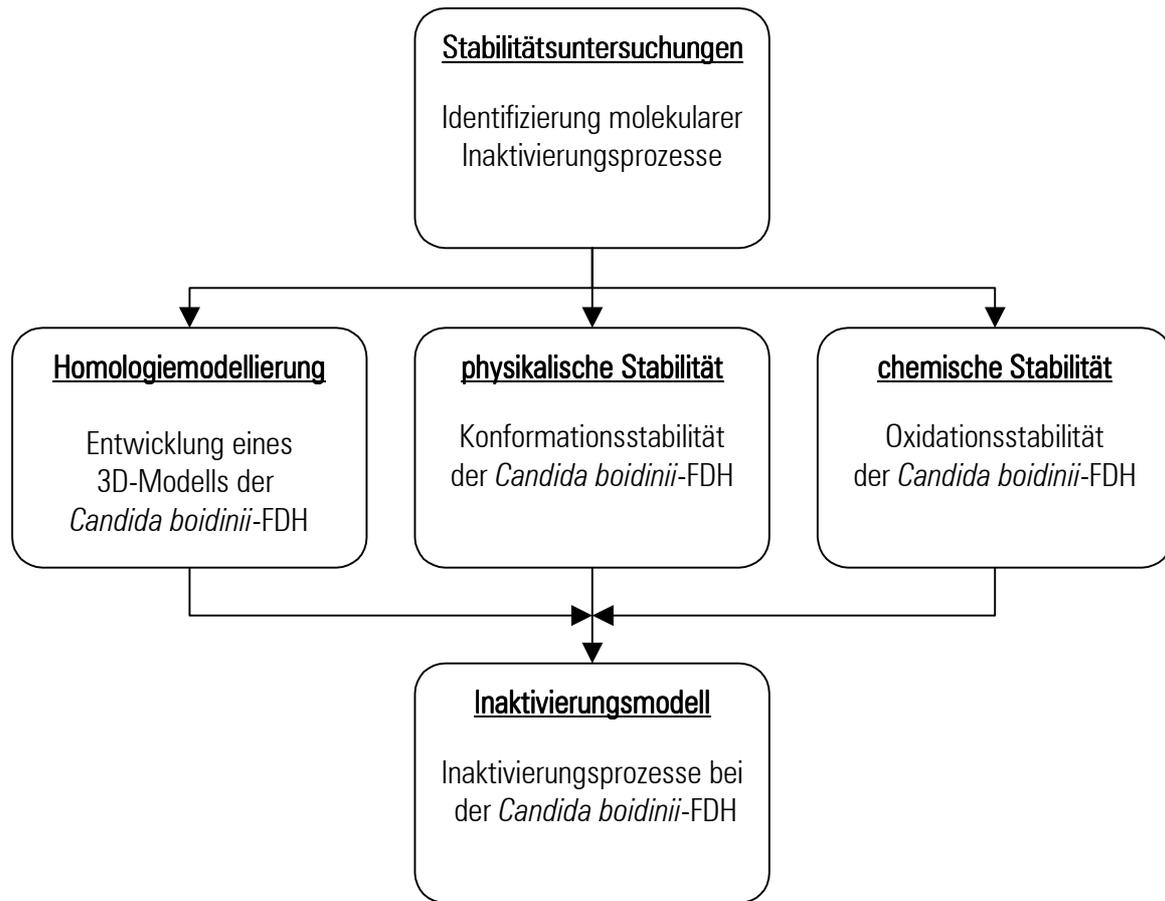


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Untersuchungen der molekularen Inaktivierungsprozesse bei der *Candida boidinii*-FDH.

wird allgemein davon ausgegangen, daß, wenn eine Zielsequenz eine 50%ige Sequenzhomologie an gleichen Aminosäuren zum Templat aufweist, das berechnete Kohlenstoffrückgrat eine Standardabweichung von 1 Å gegenüber der tatsächlichen Kristallstruktur besitzt [Chothia & Lesik, 1986]. Die kristallisierte FDH aus *Pseudomonas sp.* 101 besitzt eine Sequenzhomologie von über 50% gegenüber der Sequenz der *Candida boidinii*-FDH. Daher kann die 3D-Struktur der *Candida boidinii*-FDH von ihr abgeleitet werden.

Aufgrund der Beweglichkeit der N- und C-Termini eines Proteins im Kristall, kann von diesen oftmals die Lage nicht ermittelt werden und sie sind in der 3D-Struktur nicht abgebildet. Deshalb konnten auch die N- und C-Termini im Homologiemodell nicht berechnet werden (Tabelle 23). Die ersten 14 Aminosäuren am N-Terminus und die letzten 21 Aminosäuren am C-Terminus sind in der 3D-Struktur der *Candida boidinii*-FDH nicht dargestellt.

Tabelle 22: Sequenzhomologien der strukturcharakterisierten Template gegenüber der *Candida boidinii*-FDH-Sequenz. Datensatz einer Struktur in der Protein-Datenbank (*.pdb).

Enzym	Organismus	Kristallstruktur	Homologie [%]
NAD-abhängige Formiatdehydrogenase (Apo Form)	<i>Pseudomonas sp.</i> 101	2NAC.pdb	54,2
NAD-abhängige Formiatdehydrogenase (Holo Form)	<i>Pseudomonas sp.</i> 101	2NAD.pdb	54,2
D-2-Hydroxyisocaproatdehydrogenase	<i>Lactobacillus casei</i>	1DXY.pdb	27,4
Phosphoglyceratdehydrogenase	<i>Escherichia coli</i>	1PSD.pdb	27,2
D-Lactatdehydrogenase	theoretisches Modell	1DLD.pdb	25,8
D-Glyceratdehydrogenase (Apo Form)	<i>Hyphomicrobium methylovorum</i>	1GDH.pdb	24,7
D-Lactatdehydrogenase	<i>Lactobacillus helveticus</i>	2DLD.pdb	19,9

Die Zuverlässigkeit des berechneten Modells kann anhand des Ramachandran-Plots überprüft werden [Chothia & Finkelstein, 1990]. Im Ramachandran-Plot werden die Winkelkonformationen der Hauptkette angezeigt. Die Auftragung der Winkel φ und ψ des berechneten Modells im Ramachandran-Plot zeigt, daß nahezu alle Winkel in den erlaubten Bereichen liegen (Abbildung 29). Nur zwei Aminosäuren liegen in einem unerlaubten Bereich.

Tabelle 23: Übersicht über die globalen Homologien der aus 364 Aminosäuren bestehenden Zielsequenz *Candida boidinii*-FDH mit den homologen strukturcharakterisierten Templaten. Datensatz einer Struktur in der Protein-Datenbank (*.pdb).

Kristallstruktur	Globale Homologien
Zielsequenz	=====
2NAC.pdb	=====
2NAD.pdb	=====
1PSD.pdb	=====
1GDH.pdb	=====
1DXY.pdb	=====
1DLD.pdb	=====
2DLD.pdb	=====

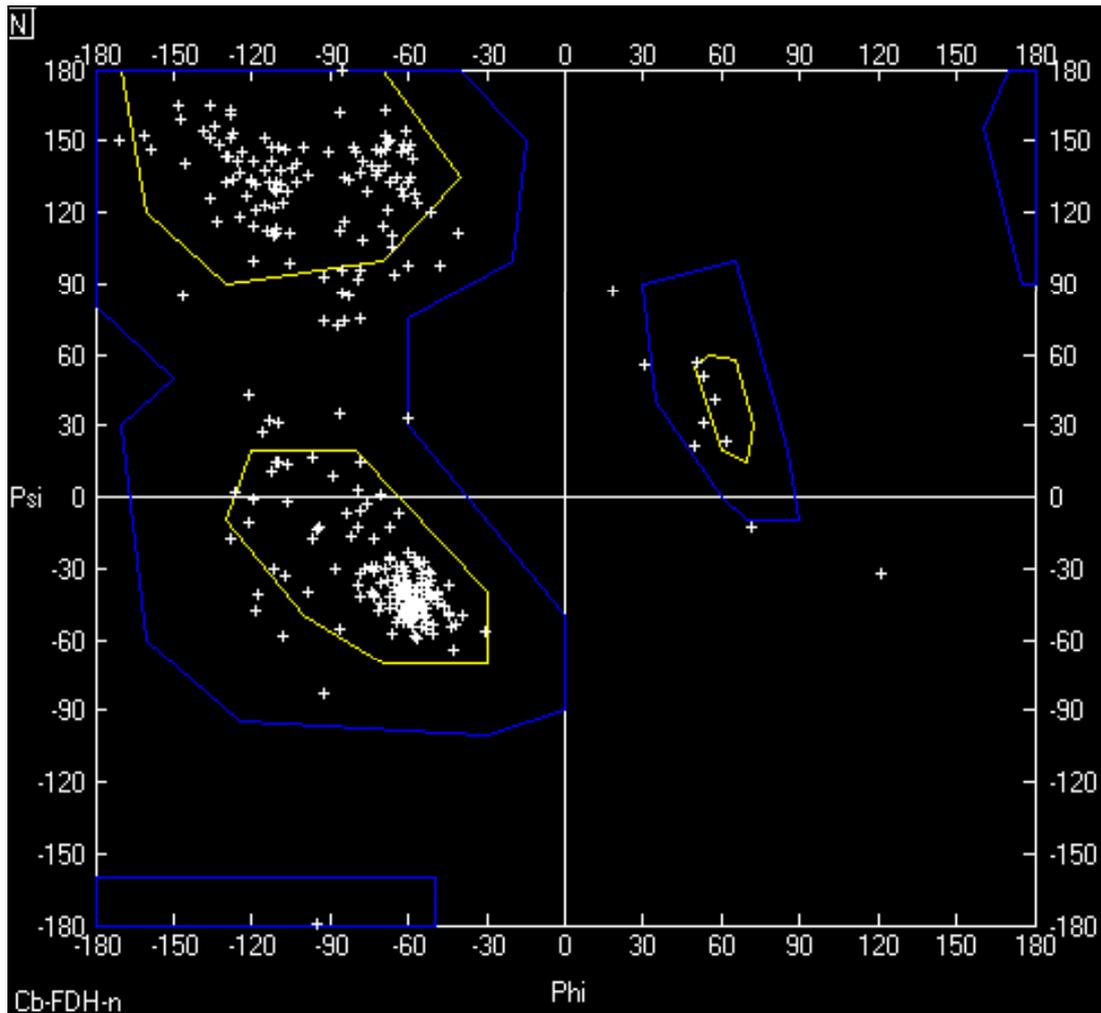


Abbildung 29: Ramachandran-Plot der berechneten Struktur der *Candida boidinii*-FDH. Die Winkel der Glycine sind nicht dargestellt. Sekundärstrukturbereiche (gelb), erlaubte Bereiche (blau).

Die berechnete FDH ist ein Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten mit je einem aktiven Zentrum pro Untereinheit. Wie bei vielen anderen Dehydrogenasen existieren in einer Untereinheit zwei globuläre Domänen, die Cofaktor-bindende Domäne und die katalytische Domäne (Abbildung 30). Eine Untereinheit weist zwei β -Faltblattbereiche, je einen in der Cofaktor-bindenden- und einen in der katalytischen Domäne, auf.

Anhand dieses Modells wurde die Lage der Cysteine untersucht, welche in den Cysteindefizienten FDH-Muteinen zum Teil oder vollständig durch andere Aminosäuren ersetzt worden sind [Slusarczyk *et al.*, 2000].

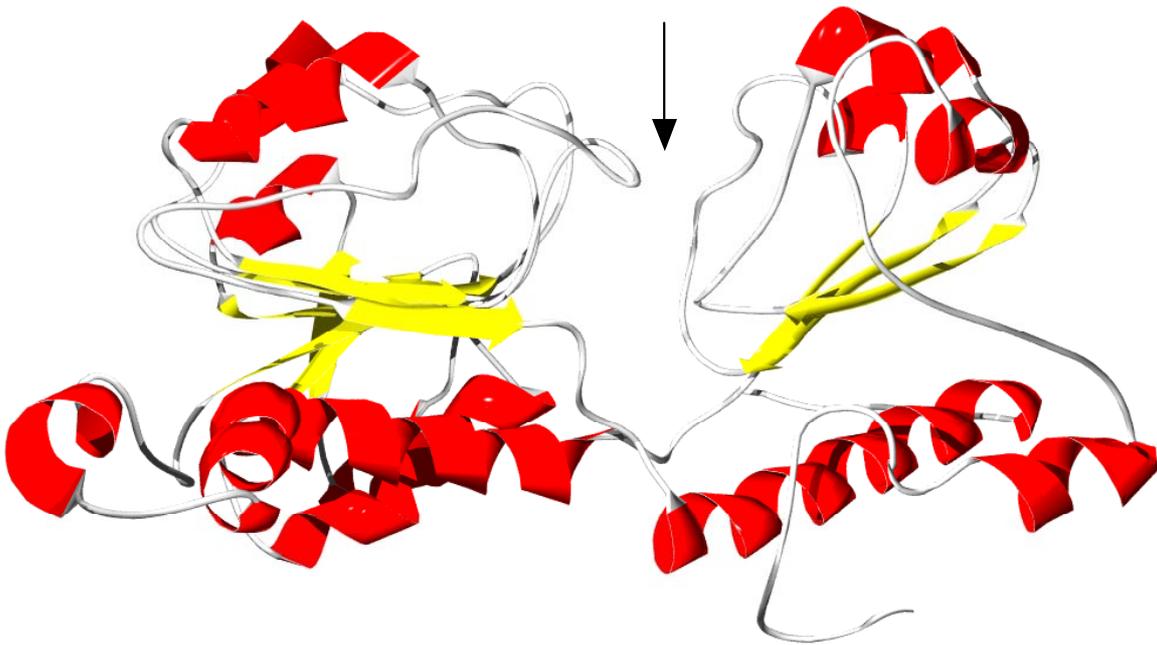


Abbildung 30: Aufbau einer Untereinheit der berechneten Struktur der *Candida boidinii*-FDH. Es ist die katalytische (rechts) und die Cofaktor-bindende Domäne (links) zu erkennen. Der Substratkanal wird von beiden Domänen begrenzt und liegt in der Mitte der Untereinheit (Pfeil). β -Faltblatt (gelb), α -Helix (rot).

4.1.2 Lage des Cysteins 262

Ersichtlich ist, daß das Cystein 262 zwar an der Oberfläche des Enzyms liegt, die Seitenkette mit dem Schwefelatom allerdings in das Proteininnere zeigt und damit der Oxidation nicht zugänglich ist. Aus sterischen Gründen kann an diesem Cystein im nativen Zustand keine Disulfidbrücke gebildet werden (Abbildung 31). Die Darstellung der Lage des Cysteins 262 im Kalottenmodell verdeutlicht die Lage des Schwefelatoms im Proteininneren (Abbildung 32).

4.1.3 Lage des Cysteins 23

Dagegen liegt das Cystein 23 nach dem Homologiemodell tatsächlich an der Oberfläche des Enzyms und wird aufgrund dessen der oxidativen Modifikation zugänglich sein (Abbildung 31). Ein weiteres Schwefelatom ist an der Proteinoberfläche zu erkennen, das des Methionins 129. Die Darstellung des Lage des Cystein 23 im Kalottenmodell verdeutlicht die Lage des Schwefelatoms an der Oberfläche (Abbildung 32).

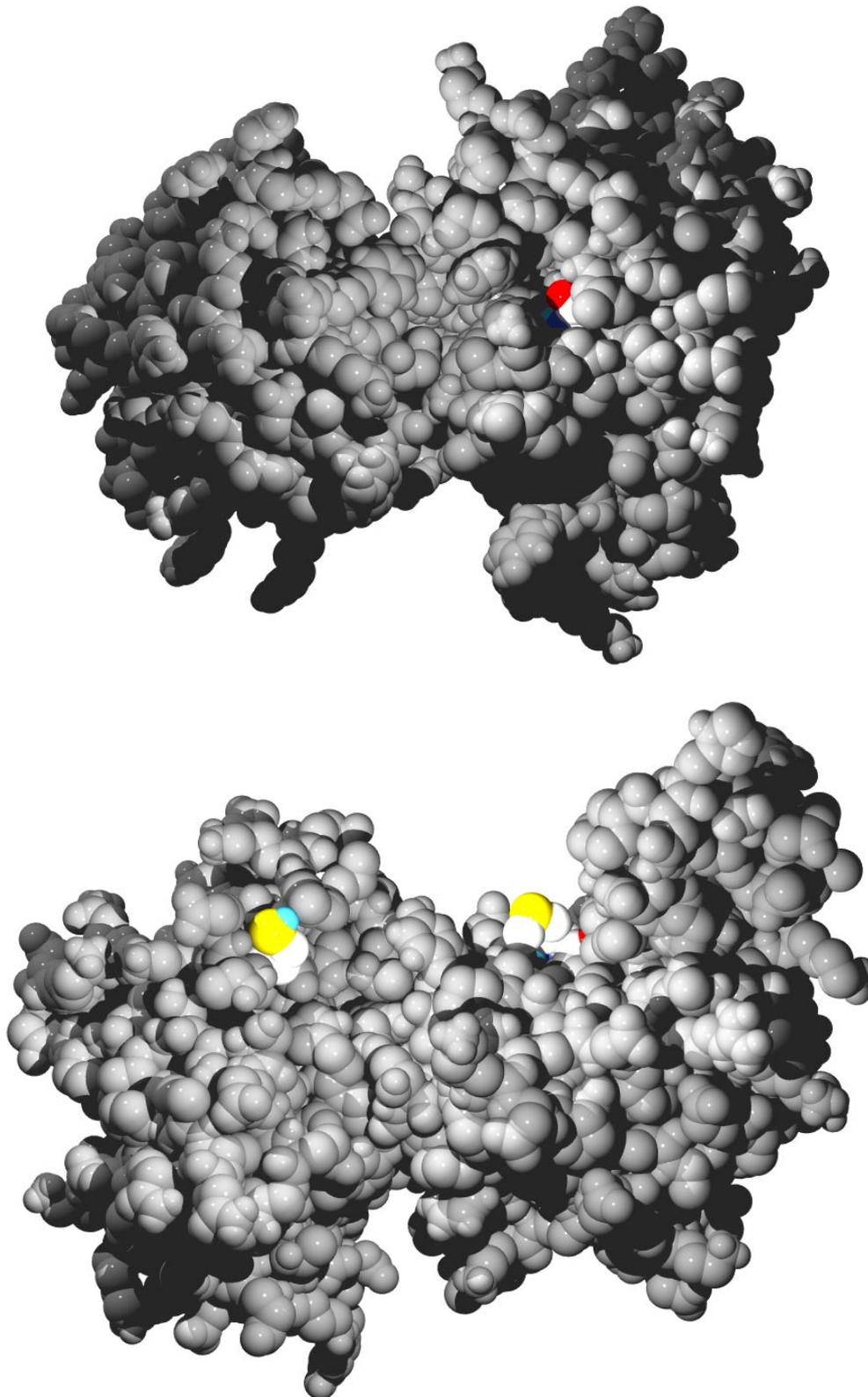


Abbildung 31: Oberflächenansicht des Homologiemodells der *Candida boidinii*-FDH. Oben: Von der Aminosäure Cystein 262 zeigt nur das Sauerstoffatom der Peptidbindung nach außen. Unten: Das in der linken Bildhälfte gelegene Schwefelatom (gelb) gehört zum Cystein 23, das in der rechten Bildhälfte gelegene Schwefelatom gehört zum Methionin 129. Wasserstoffatome an den Kohlenstoffatomen nicht dargestellt.

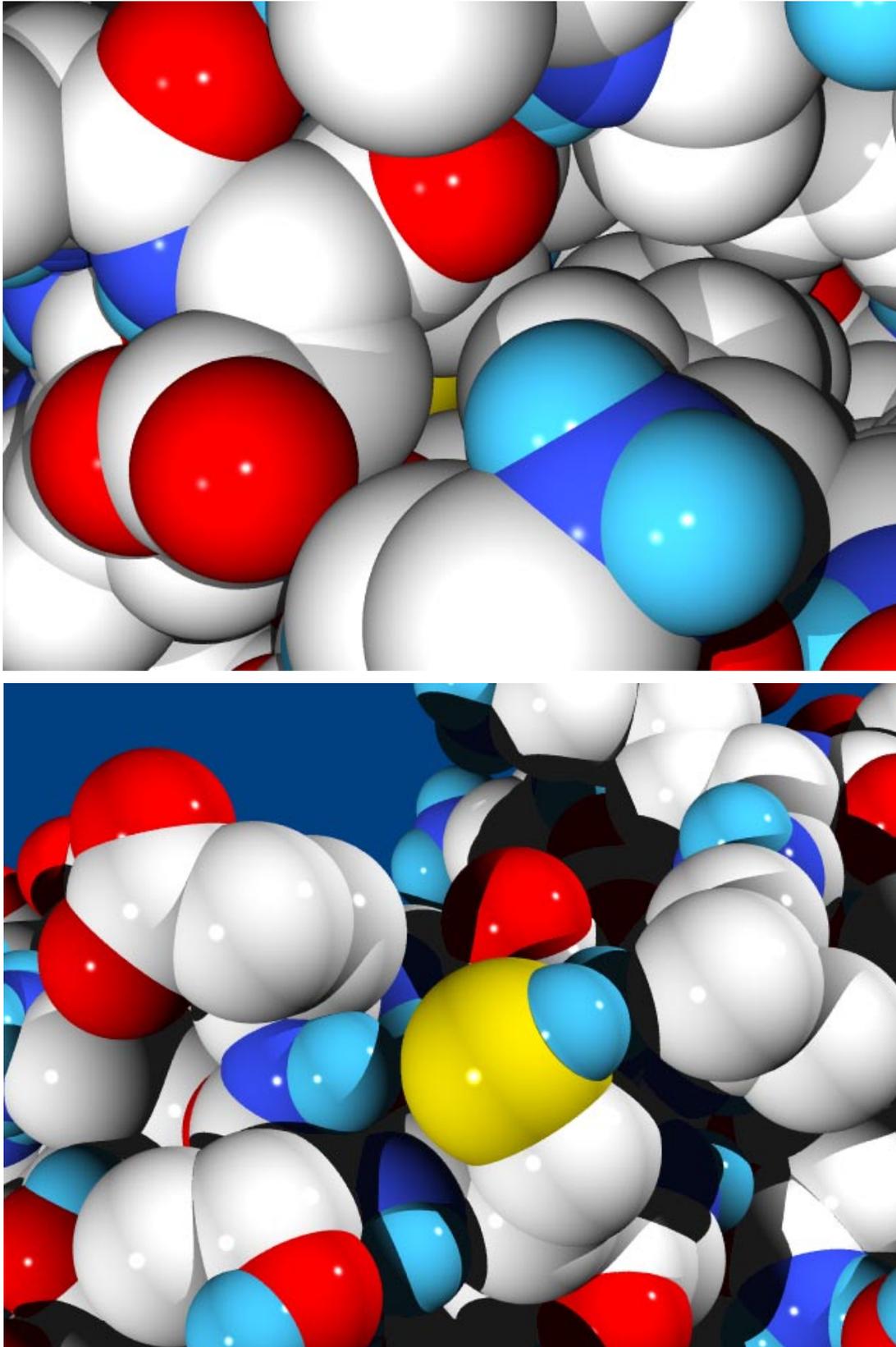


Abbildung 32: Kalottenmodellansicht des Homologiemodells der *Candida boidinii*-FDH. Oben: Das Schwefelatom des Cysteins 262 (gelb) liegt im Proteininneren. Unten: Das Schwefelatom des Cysteins 23 (gelb) liegt an der Proteinoberfläche und ist damit der Oxidation zugänglich. Wasserstoffatome an den Kohlenstoffatomen nicht dargestellt.

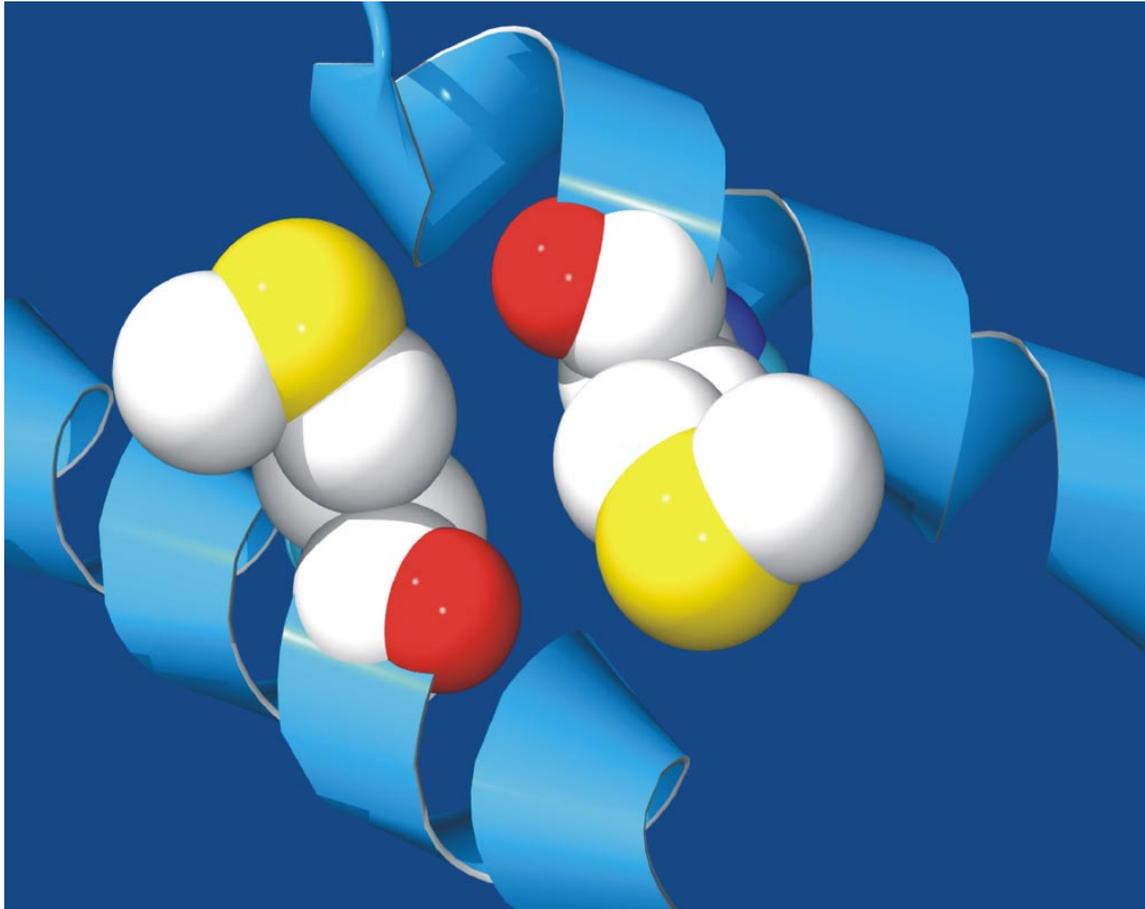


Abbildung 33: Darstellung der Lage der Methionine 129 in beiden Untereinheiten. Die beiden Methionine 129 der *Candida boidinii*-FDH scheinen aufeinander ausgerichtet zu sein. Wasserstoffatome an den Kohlenstoffatomen nicht dargestellt.

4.1.4 Lage des Methionins 129

Das Homologiemodell zeigt an der Enzymoberfläche das Schwefelatom des Methionins 129 (Abbildung 31). Da dieses Schwefelatom prinzipiell oxidiert werden kann, könnte dies zur Inaktivierung des Enzyms beitragen.

Das Methionin 129 liegt an der Kontaktfläche, an der sich die beiden Untereinheiten berühren. Bemerkenswerterweise hat sich gezeigt, daß das Methionin 129 der einen Untereinheit von dem Methionin 129 der anderen im Homodimer nur wenige Angström entfernt liegt (Abbildung 33). Alle bisher bekannten Sequenzen von NAD-abhängigen FDHs besitzen dieses Methionin. Dieses hochkonservierte Motiv könnte deshalb auf eine notwendige Funktion bei der Interaktion der beiden Untereinheiten hindeuten und eine Oxidation des Schwefels im Methionin 129 ist im FDH-Homodimer eher unwahrscheinlich.

4.2 Katalytische Aktivität

Die Cystein-defizienten FDH-Muteine weisen nur minimale Unterschiede bezüglich der kinetischen Parameter K_M Formiat, K_M NAD und K_i NADH auf [Slusarczyk *et al.*, 2000] (Tabelle 24).

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der rekombinanten FDHs war es notwendig, die Enzyme bis zur Homogenität zu reinigen. Dies wurde in zwei Schritten mit Hilfe der Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt.

Die Grobreinigung der FDH nach der Extraktion mittels 2-Phasen-System erfolgte durch Adsorption an das Säulenmaterial Q-Sepharose FF. Nach dem Waschen wurde mit einem Stufengradienten bei 150 mM NaCl bei pH 7,5 eluiert. Mit diesem Schritt konnten die schwach bindenden Proteine abgetrennt werden und ein Reinheitsgrad von ca. 80% erzielt werden.

Die Feinreinigung erfolgte bei pH 6,3 mit einem NaCl-Gradienten, der mit 50 mM NaCl gestartet und bei 150 mM NaCl nach 30 Minuten endete. Hier eluierte die FDH sofort nach dem Durchlauf und die stärker bindenden Proteine konnten abgetrennt werden. Die Aufreinigung wurde in einem SDS-Gel kontrolliert und es konnten keine Verunreinigungen festgestellt werden (Reinheitsgrad > 95%) (Abbildung 34).

Die anschließende Bestimmung der spezifischen Aktivität V_{max} ist in Tabelle 25 dargestellt. Mit einem Molekulargewicht von 40.370 g mol⁻¹ pro Untereinheit kann die Wechselzahl k_{cat} berechnet werden (Gleichung 21).

Tabelle 24: K_M - und K_i -Werte der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine [Slusarczyk *et al.*, 2000].

Formiatdehydrogenase	K_M Formiat [mM]	K_M NAD [μ M]	K_i NADH [μ M]
WT	6	45	17
C23S	6	44	16
C262V	4	41	9
C23S/C262V	5	44	11
C23S/C262A	5	45	13

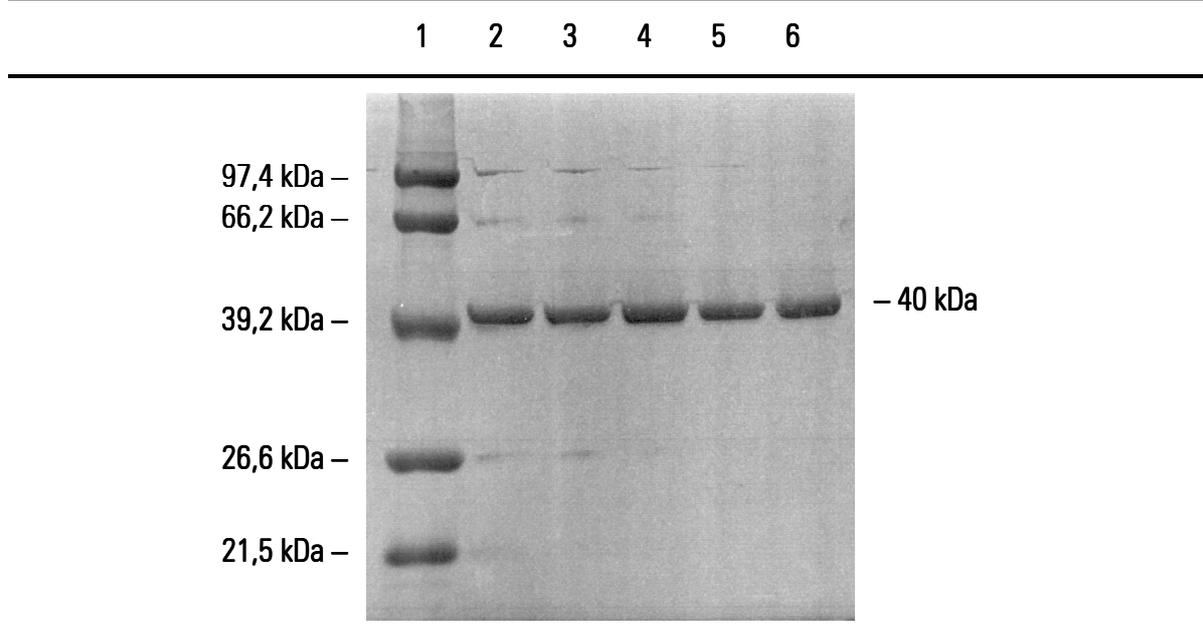


Abbildung 34: Reinigung der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine bis zur Homogenität. Dargestellt ist die Auftrennung in der SDS-PAGE. Die zu erkennenden Nebenbanden stammen vom Marker, da beim Befüllen der Tasche die Marker-Probe in die daneben liegenden Taschen gelaufen ist. Marker (1), WT-FDH (2), C23S-FDH (3), C262V-FDH (4), C23S/C262V-FDH (5), C23S/C262A-FDH (6).

Die Einzelmutanten weisen gegenüber der WT-FDH einen Verlust an spezifischer Aktivität von ca. 10%, die Doppelmutanten von ca. 20% auf. Die negativen Auswirkungen bezogen auf die katalytische Aktivität steigen mit zunehmender Zahl an Aminosäureaustauschen. Da die Aminosäuren gezielt in bezug auf die Verbesserung der Oxidationsstabilität ausgetauscht worden sind, ist es auch nicht wahrscheinlich, daß die katalytische Aktivität der Cystein-defizienten FDH-Muteine davon unbeeinflusst sein würde.

Tabelle 25: Spezifische Aktivitäten V_{max} und Wechselzahlen k_{cat} der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine. Die Bestimmung erfolgte in 500 mM Na-Formiat und 2 mM NAD bei 30°C.

Formiatdehydrogenase	V_{max} [U mg ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]
WT	6,3	4,2
C23S	5,5	3,7
C262V	5,6	3,8
C23S/C262V	4,9	3,3
C23S/C262A	5,1	3,4

4.3 Physikalische Stabilität

4.3.1 Thermostabilität

Die physikalische Stabilität eines Proteins kann in Form der Thermostabilität gemessen werden. Die irreversible Denaturierung der *Candida boidinii*-FDH, der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine wurde anhand der Thermoinaktivierung untersucht. Hierbei ist die Inaktivierungstemperatur T_{50} von der Inkubationsdauer und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ von der Temperatur abhängig. Beide Parameter stellen ein Maß für die physikalische Stabilität eines Proteins dar und können ineinander umgerechnet werden.

Die *Candida boidinii*-FDH und die rekombinante WT-FDH unterscheiden sich in ihrer Thermostabilität nicht, da sie die gleichen Enzyme sind, die nur in unterschiedlichen Organismen exprimiert wurden (Tabelle 26). Alle Cystein-defizienten FDH-Muteine besitzen eine geringere Thermostabilität im Vergleich zur WT-FDH. Die Mutante C23S/C262V-FDH weist mit 44°C sogar einen um 13°C erniedrigten T_{50} -Wert gegenüber der WT-FDH auf. Dieses Ergebnis ist auch zu erwarten, da die Oxidationsstabilisierung durch den Austausch der Cysteine nicht mit einer Erhöhung der Thermostabilität eines Proteins korreliert ist. Unter den Muteinen ist die C23S-FDH das stabilste Enzym.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei der *Bst*VI Restriktionsendonuklease aus *Bacillus stearothermophilus* V bezüglich der Thermostabilität gemacht. Auch hier wurden zwei Cysteine gegen jeweils ein Serin ersetzt um die Oxidationsstabilität zu erhöhen. Beide Einzelmutanten, C134S und C167S, sind gegenüber dem Wildtyp in bezug auf Thermostabilität instabiler [Loyola, *et al.*, 1999]. Beim Subtilisin E wurde hingegen ein Serin gegen ein Cystein (S161C) ausgetauscht. Dies führte zu einer 2 – 4-fach erhöhten Halbwertszeit bei Thermoinkubation und wird auf die Möglichkeit der Oligomerisierung durch Disulfidbrückenbildung zurückgeführt [Takagi *et al*, 2000].

Tabelle 26: T_{50} -Werte und Halbwertszeiten der *Candida boidinii*-FDH, der rekombinanten WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine.

Formiatdehydrogenase	T_{50} -Wert (20 min) [°C]	$t_{1/2}$ (50°C) [min]
<i>Candida boidinii</i>	56,8	281
WT	56,8	281
C23S	51,7	42
C262V	49,1	13
C23S/C262V	44,2	3
C23S/C262A	47,6	8

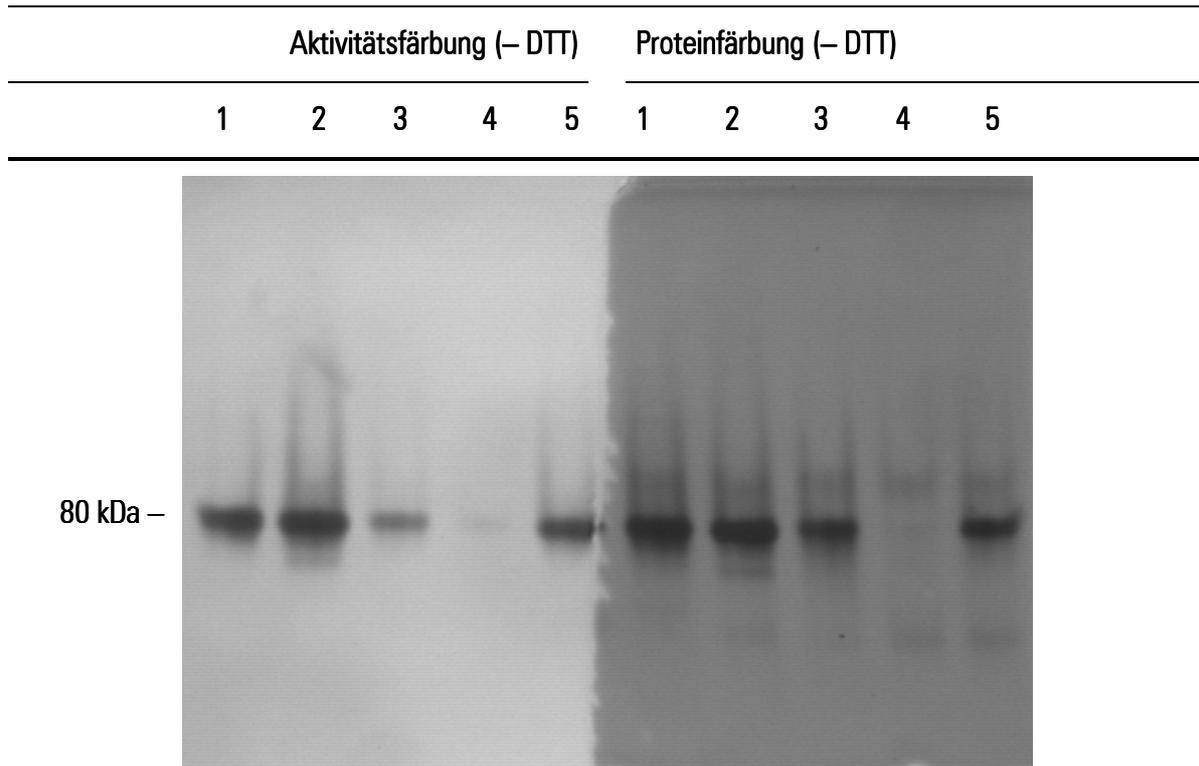


Abbildung 35: Darstellung der thermoinaktivierten FDHs in der nativen PAGE. Proben bei 50°C (20 min) inkubiert. WT-FDH (1), C23S-FDH (2), C262V-FDH (3), C23S/C262V-FDH (4), C23S/C262A-FDH (5). Proben vor Auftrag aufs Gel nicht mit DTT reduziert (– DTT).

Die durch die Thermoinaktivierung hervorgerufenen Veränderungen bei 50°C wurden in der nativen PAGE untersucht (Abbildung 35). Nach der Elektrophorese kann im Gel der nativen PAGE neben der Proteinfärbung auch eine Aktivitätsfärbung durchgeführt werden, d.h., mit der Aktivitätsfärbung kann biologisch aktive FDH nachgewiesen werden.

In den Gelen ist keine aktive C23S/C262V-FDH nachweisbar, noch kann sie mit der Proteinfärbung detektiert werden (Abbildung 35, Bahn 4). Da die C23S/C262V-FDH die instabilste Mutante gegenüber der Thermoinkubation ist (Tabelle 26), aggregierte das Protein bei der Thermoinkubation bei 50°C und wurde nicht ins Gel aufgenommen.

Veränderungen in der Laufhöhe der Banden der übrigen FDHs konnten nicht festgestellt werden (Abbildung 35, Bahnen 1 – 3; 5). Dies deutet darauf hin, daß bei dieser Art der Thermoinaktivierung tatsächlich nur die physikalische und nicht auch die chemische Stabilität gemessen wird, da sich chemische Modifikationen, wie das Auseinanderbrechen des Peptidrückgrates oder kovalentes Cross-Linking, einerseits in einer veränderten Laufhöhe bemerkbar machen müßten und andererseits keine oder nur sehr schwache Aktivität nachweisbar sein dürfte.

4.3.2 Stabilisierung mit dem Additiv Glycerin

Glycerin ist, wie alle Polyole, als stabilisierendes Additiv bekannt [Gekko & Timasheff, 1981; Li *et al.*, 1995; Knubovets *et al.*, 1999]. Der stabilisierende Effekt des Glycerins in bezug auf die Thermoaktivierung kann auch bei der FDH nachgewiesen werden (Abbildung 36). Es zeigt sich, daß die Stabilisierung bei allen Cystein-defizienten FDH-Muteine proportional zur Glycerin-Konzentration ist (Abbildung 37). Das Glycerin bewirkt außerdem, daß die inaktivierte FDH bei hohen Glycerin-Konzentrationen in Lösung bleibt und während der Inkubation nicht präzipitiert (Abbildung 38).

4.3.3 Physikalische Stabilität im Vergleich zur Gesamtstabilität

Bis heute sind die Möglichkeiten, Prozeßstabilitäten von Proteinen in Modellsystemen zu untersuchen nur unzureichend, da die Vielzahl der Parameter, die Einfluß auf die Stabilität haben können, letztlich nur im realen System gegeben sind. In technischen Systemen setzt sich die Gesamtstabilität, d.h., die Prozeßstabilität aus der chemischen und der physikalischen Stabilität zusammen.

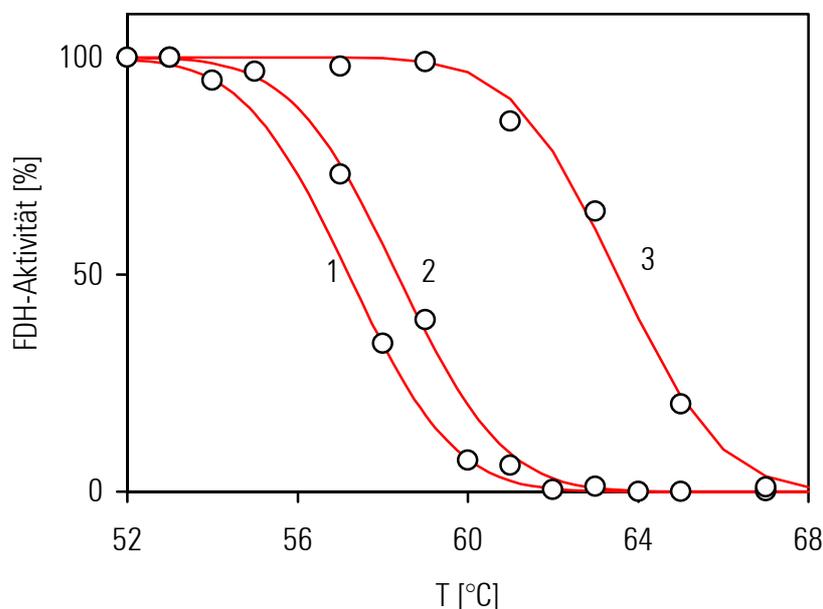


Abbildung 36: Änderung der Aktivität der WT-FDH in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur und der Glycerin-Konzentration bei 20 min Inkubationsdauer. 0% [v/v] Glycerin (1), 10% [v/v] Glycerin (2), 50% [v/v] Glycerin (3).

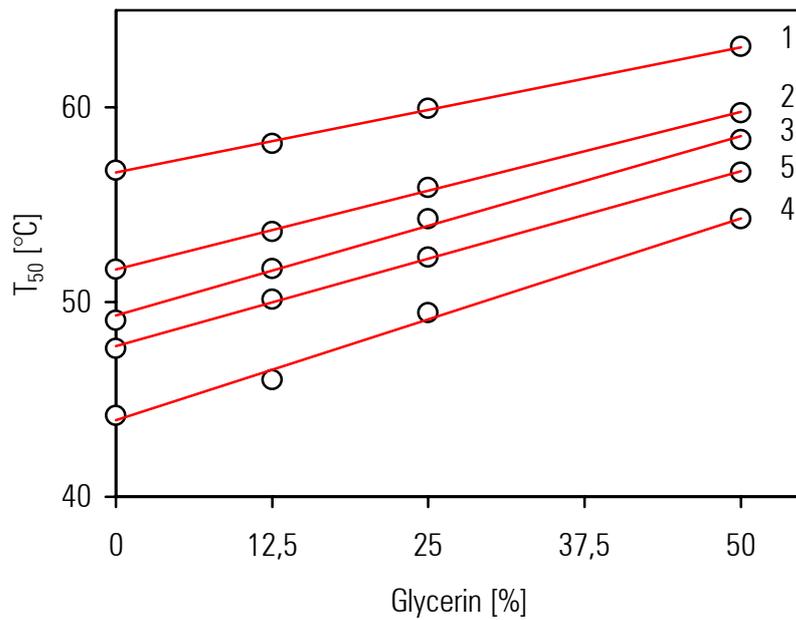


Abbildung 37: Änderung der T_{50} -Werte der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Mutante in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration bei 20 min Inkubationsdauer. WT-FDH (1), C23S-FDH (2), C262V-FDH (3), C23S/C262V-FDH (4), C23S/C262A-FDH (5).

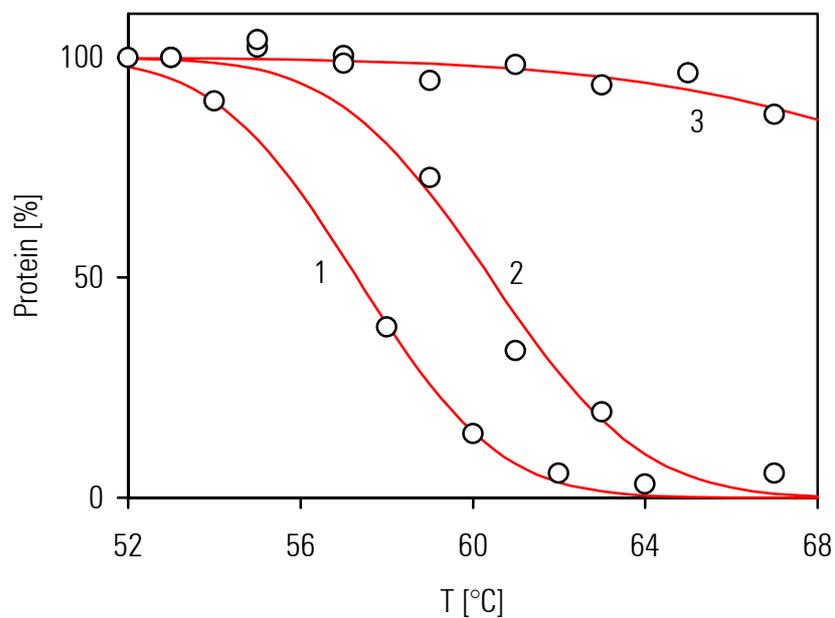


Abbildung 38: Änderung der Proteinkonzentrationen der WT-FDH in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur und der Glycerin-Konzentration bei 20 min Inkubationsdauer. 0% [v/v] Glycerin (1), 10% [v/v] Glycerin (2), 50% [v/v] Glycerin (3).

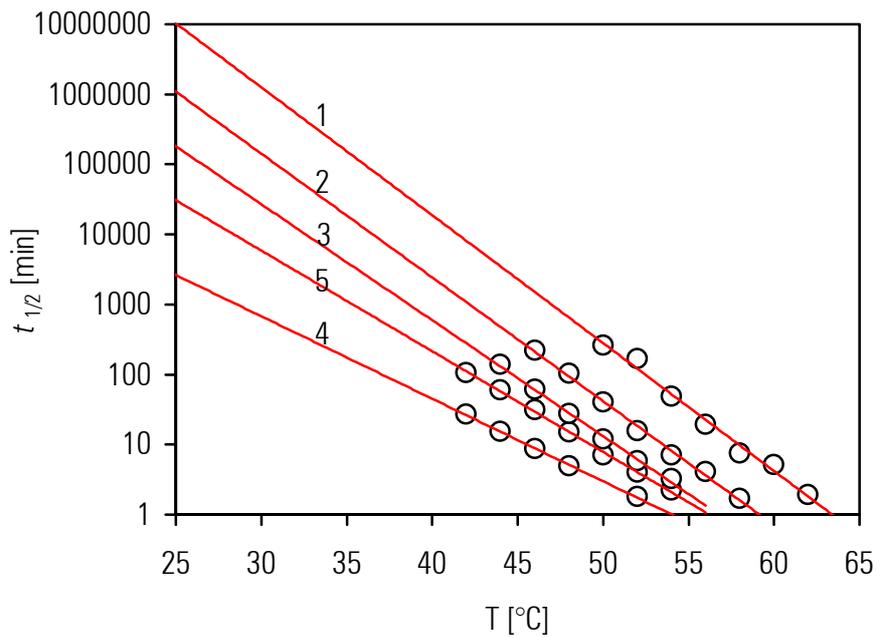


Abbildung 39: Bestimmung der Halbwertszeiten zwischen 42°C und 60°C in 100 mM KP_i -Puffer, pH 7,5 bei 20 min Inkubationsdauer. WT-FDH (1), C23S-FDH (2), C262V-FDH (3), C23S/C262V-FDH (4), C23S/C262A-FDH (5).

Es wurde nun untersucht, ob allein mit Hilfe der Thermostabilität die Gesamtstabilität der FDH beschrieben werden kann. Die Thermostabilität stellt, wie in Abbildung 35 gezeigt, in erster Linie einen Parameter der physikalischen Stabilität dar. Bei erhöhter Temperatur laufen jedoch auch chemische Reaktionen schneller ab, so daß die Thermostabilität eine geeignete Methode zur schnellen Bestimmung der Gesamtstabilität, d.h. der Summe aus physikalischer und chemischer Stabilität, eines Proteins darstellen könnte.

Zunächst wurden dazu die Halbwertszeiten der Thermoinaktivierung zwischen 42° und 60°C in einem Intervall von 2°C in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5 bestimmt und Regressionsgeraden durch die Meßwerte gelegt (Abbildung 39). Die Regressionsgeraden lassen sich gut an die Meßwerte anpassen. Die WT-FDH ist gegenüber den Muteinen das stabilste Enzym, d.h., alle Mutationen führen zur Erniedrigung der Thermostabilität der Enzyme.

Anschließend wurde versucht, die Halbwertszeiten der verschiedenen FDHs bei 30°C in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5 zu ermitteln (Tabelle 27). Dies gelang nur bei der WT- und C262V-FDH, da diese Enzyme bei dieser Temperatur die instabilsten sind. Bei den anderen Cystein-defizienten FDH-Muteinen ist die Halbwertszeit bei 30°C > 1000 min.

Tabelle 27: Bestimmung der Halbwertszeiten bei 30°C der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine anhand der Regressionsgeraden (Abbildung 39) und der tatsächlich gemessenen Werte in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5. Nicht bestimmt (n.b.; Halbwertszeiten > 1000 min).

Formiatdehydrogenase	$t_{1/2}$ (30°C) [min]	
	berechnet	gemessen
WT	1.300.000	328
C23S	150.000	n.b.
C262V	22.000	221
C23S/C262V	586	n.b.
C23S/C262A	5.000	n.b.

Werden die Halbwertszeiten bei 30°C mit Hilfe der Regressionsgeraden (Abbildung 39) berechnet, kommt man zu sehr viel höheren Halbwertszeiten, als die experimentell bestimmten tatsächlich aufweisen (Tabelle 27). Die WT-FDH müßte nach dieser Berechnung eine Halbwertszeit von 2,5 Jahren aufweisen, experimentell bestimmt man dagegen jedoch ein Halbwertszeit von 328 min.

Auch fällt auf, daß die WT-FDH bei hohen Temperaturen das stabilste Enzym ist, bei 30°C jedoch zu den instabileren gehört (Tabelle 27). Dies erklärt sich damit, daß die Dauer der Messung bei den hohen Temperaturen (42° – 64°C) 20 min betrug, bei 30°C jedoch mehrere Stunden, um die Halbwertszeit hinreichend genau ermitteln zu können. Bei den hohen Temperaturen mit kurzer Inkubationszeit scheint nur die physikalische Stabilität, d.h. die Konformationsstabilität gemessen zu werden und hier ist die WT-FDH das stabilste Enzym (Tabelle 26). Dagegen spielen bei den Messungen bei 30°C und langer Inkubationszeit weitere Faktoren, wie z.B. die Oxidationsstabilität eine entscheidende Rolle. Die im folgenden Kapitel „Chemische Stabilität“ vorgestellten Untersuchungen zeigen, daß die WT-FDH tatsächlich zu den oxidationsempfindlicheren FDHs gehört.

Die Thermostabilität bei hohen Temperaturen ist folglich für die Beschreibung der Gesamtstabilität, d.h., der Prozeßstabilität eines Proteins kein signifikantes Kriterium, da mit ihr bei der FDH ausschließlich die physikalische Stabilität, d.h., die Konformationsstabilität, untersucht werden kann. Daraus folgt, daß neben der physikalischen auch die chemische Stabilität einen signifikanten Einfluß bei 30°C, d.h. der Temperatur, bei der die FDH in technischen Prozessen eingesetzt wird, besitzen muß.

4.4 Chemische Stabilität

4.4.1 Oxidationsstabilität

Die chemische Stabilität, und hier im besonderen die Oxidationsstabilität, der Cystein-defizienten FDH-Muteine wurde im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Die Oxidationsgeschwindigkeit wird von verschiedenen Faktoren bestimmt, wie z.B. der Temperatur, pH-Wert, Puffer, der Sauerstoffkonzentration und der Anwesenheit von Katalysatoren, wie z.B. Spuren von Metallionen [Jocelyn, 1972]. Daneben ist auch die räumliche Anordnung der Thiol-Gruppe im Protein für die Oxidationsempfindlichkeit ein entscheidender Faktor [Little & O'Brien, 1967].

4.4.2 Oxidation mit Wasserstoffperoxid

Die Stabilität der Cystein-defizienten FDH-Muteine gegenüber Wasserstoffperoxid wurde im Vergleich zum Wildtyp untersucht (Tabelle 28). Wasserstoffperoxid kann die Thiol-Gruppe des Cysteins schrittweise über die Sulfensäure (RSOH) zur Sulfinsäure (RSO₂H) und schließlich zur Sulfonsäure (RSO₃H) oxidieren. Unter den relativ milden Bedingungen im Testansatz ist dabei die Bildung der Sulfinsäure am wahrscheinlichsten [Manning *et al.*, 1989].

Alle Muteine mit dem C23S-Austausch sind gegenüber der Oxidation durch Wasserstoffperoxid stabiler als die WT- oder die C262V-FDH. Dies deutet darauf hin, daß im nativen Zustand nur das an der Oberfläche liegende Cystein 23 oxidiert werden kann, nicht aber das ins Proteininnere weisende Cystein 262. Die bei der Oxidation durch Wasserstoffperoxid auftretenden unterschiedlichen Modifikationen der WT-FDH und den Cystein-defizienten Muteinen können in der nativen und SDS-PAGE untersucht werden.

Tabelle 28: Vergleich der Halbwertszeiten der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine bei Oxidation mit 150 mM Wasserstoffperoxid in 100 mM KP_i-Puffer pH 7,5. Oxidationsempfindliche FDHs (rot).

Formiatdehydrogenase	$t_{1/2}$ [min]
WT	3,3
C23S	7,3
C262V	2,4
C23S/C262V	6,9
C23S/C262A	7,8

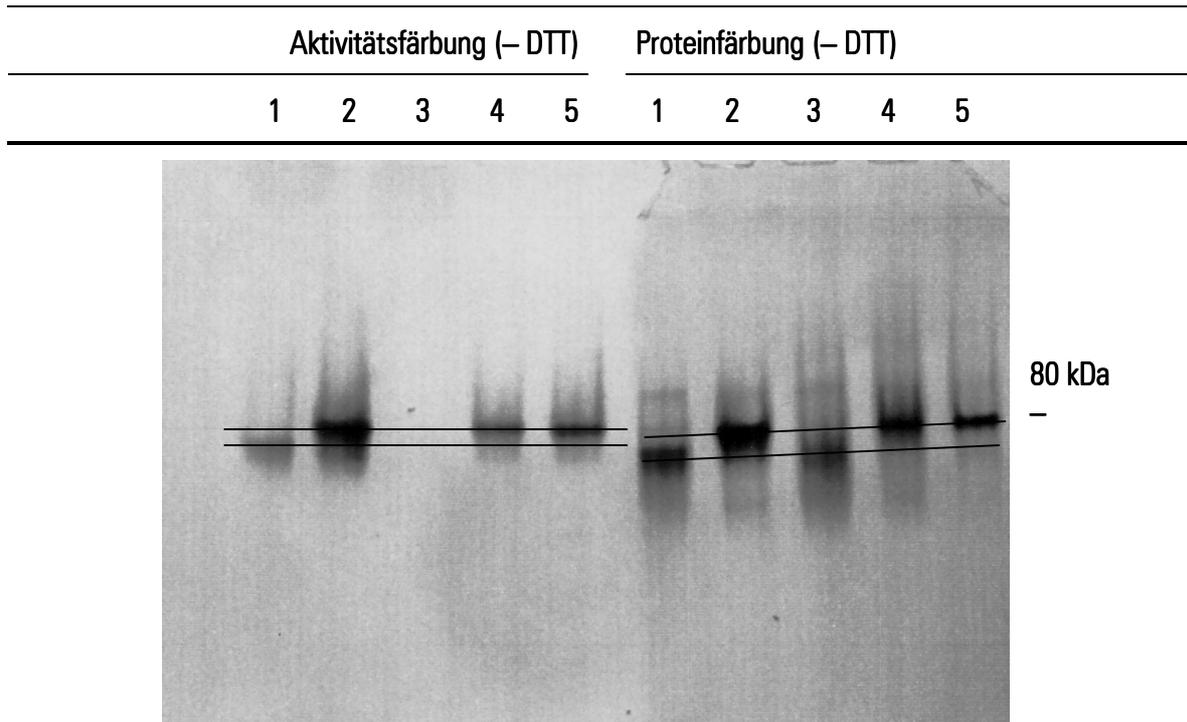


Abbildung 40: Untersuchungen der Auswirkungen der Oxidation mit Wasserstoffperoxid in der nativen PAGE. Es ist eine Bandenverschiebung bei der WT- und C262V-FDH, vermutlich als Folge der zusätzlichen negativen Ladung zu erkennen. WT-FDH (1), C23S-FDH (2), C262V-FDH (3), C23S/C262V-FDH (4), C23S/C262A-FDH (5). Proben vor Auftrag aufs Gel nicht mit DTT reduziert (– DTT).

Neben der Proteinfärbung kann in der nativen PAGE auch eine Aktivitätsfärbung durchgeführt werden, d.h., biologisch aktive FDH kann nachgewiesen werden. In der SDS-PAGE werden die Proteine linearisiert und sie verlieren ihre Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur. Durch Zugabe von DTT in der SDS-PAGE können Disulfidbrücken reduziert und somit gespalten werden.

Nach dem Homologiemodell der *Candida boidinii*-FDH liegt nur das Cystein 23 an der Oberfläche, nicht aber das Cystein 262. Infolgedessen sollte nur das Cystein 23 oxidiert werden, nicht aber das Cystein 262. In der nativen PAGE zeigt sich, daß bei der WT- und bei der C262V-FDH, welche beide das Cystein 23 besitzen, eine Verschiebung der 80 kDa-Bande zu erkennen ist (Abbildung 40).

Dies kann durch die zusätzlich gewonnene negative Ladung der gebildeten Sulfon-/Sulfonsäure am Cystein 23 erklärt werden, die zu einer schnelleren Wanderung des Proteins durch das Gel führt.

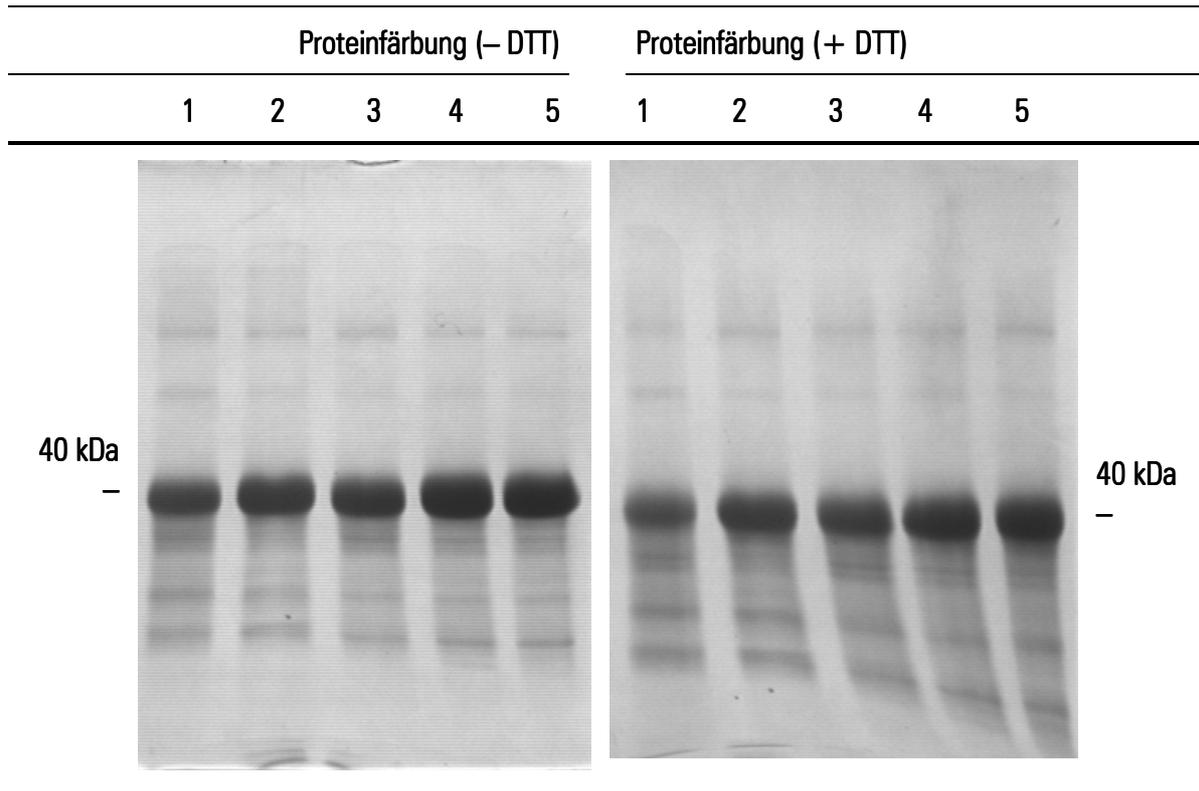


Abbildung 41: Untersuchungen der Auswirkungen der Oxidation mit Wasserstoffperoxid in der SDS-PAGE. Die Bandenverschiebung ist aufgrund der Kompensation der negativen Ladung durch das SDS nicht aufgetreten. WT-FDH (1), C23S-FDH (2), C262V-FDH (3), C23S/C262V-FDH (4), C23S/C262A-FDH (5). Proben vor Auftrag aufs Gel mit DTT reduziert (+ DTT), nicht reduziert (– DTT).

Da die WT- und C262V-FDH gegenüber Wasserstoffperoxid instabiler als die übrigen FDHs sind (Tabelle 28), wurden sie durch die Oxidation so geschädigt, daß sie in der Aktivitätsfärbung nicht deutlich zu erkennen sind (Abbildung 40; Bahn 1 und 3). In der Proteinfärbung sind jedoch die korrespondierenden Banden vorhanden und die Bandenverschiebung zu erkennen.

Die durch Oxidation der Cysteine mit Wasserstoffperoxid hervorgerufene Bandenverschiebung konnte auch beim Yap1-Transkriptionsfaktor beobachtet werden. Die Verschiebung verschwand durch Zugabe von DTT. Es wird vermutet, daß die Oxidation von zwei Cysteinen die Aktivierung des Transskriptionsfaktors bewirkt [Delaunay *et al.*, 2000].

In der SDS-PAGE kann sich die eine zusätzliche negative Ladung des oxidierten Cysteins 23 nicht mehr bemerkbar machen, da diese eine zusätzliche Ladung gegenüber den vielen, die durch das Anlagern des SDS an die Proteinkette hinzukommen, untergeht (Abbildung 41). Alle Banden laufen auf der gleichen Höhe, sowohl unter nicht-reduzierenden, als auch unter reduzierenden Bedingungen.

4.4.3 Oxidation mit Kupfer(II)-Ionen

Die Stabilität der Cystein-defizienten FDH-Muteine im Vergleich zur WT-FDH wurde gegenüber Kupfer(II)-Ionen untersucht. Kupfer(II)-Ionen können die Thiol-Gruppe des Cysteins oxidieren, indem ein Disulfid (RSSR) gebildet wird [Manning *et al.*, 1989].

Alle Muteine mit einem C23S-Austausch weisen eine höhere Stabilität als die WT-FDH auf (Tabelle 29). Die Einfachmutante C23S-FDH ist hierbei die stabilste der Cystein-defizienten FDHs. Die Oxidation des Cysteins 23 scheint folglich durch Kupfer(II)-Ionen katalysiert zu werden.

Dagegen ist die Einfachmutante C262V-FDH etwas instabiler als die WT-FDH. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, daß Valin keine ähnliche Aminosäure zu Cystein ist und somit die physikalische Stabilität des Enzyms beeinträchtigt, wie auch bei der Thermostabilität beobachtet werden kann (Tabelle 26). In den Doppelmutanten scheint sich einerseits der stabilisierende Effekt des Cystein 23-Austausches in bezug auf die Oxidationsstabilität und andererseits der destabilisierende Effekt des Einbringens von Alanin oder Valin an der Position 262 in bezug auf die Konformationsstabilität bemerkbar zu machen.

Die bei der Oxidation durch Kupfer(II)-Ionen auftretenden unterschiedlichen Modifikationen der WT-FDH und den Cystein-defizienten Muteinen wurden in der nativen und SDS-PAGE untersucht.

Nach dem Homologiemodell der *Candida boidinii*-FDH sollte nur das Cystein 23 oxidiert werden können, nicht aber das Cystein 262. In der nativen PAGE zeigt sich, daß bei der WT-FDH eine zweite Bande in der Aktivitätsfärbung bei ca. 160 kDa zu erkennen ist (Abbildung 42, Bahn 1). Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß das unter nativen Bedingungen zugängliche Cystein 23 eine Disulfidbrücke zu einem anderen Molekül

Tabelle 29: Vergleich der Halbwertszeiten der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine bei Oxidation mit 50 μ M CuSO₄ in 100 mM KP_i-Puffer pH 7,5.

Formiatdehydrogenase	$t_{1/2}$ [min]
WT	38
C23S	657
C262V	20
C23S/C262V	68
C23S/C262A	155

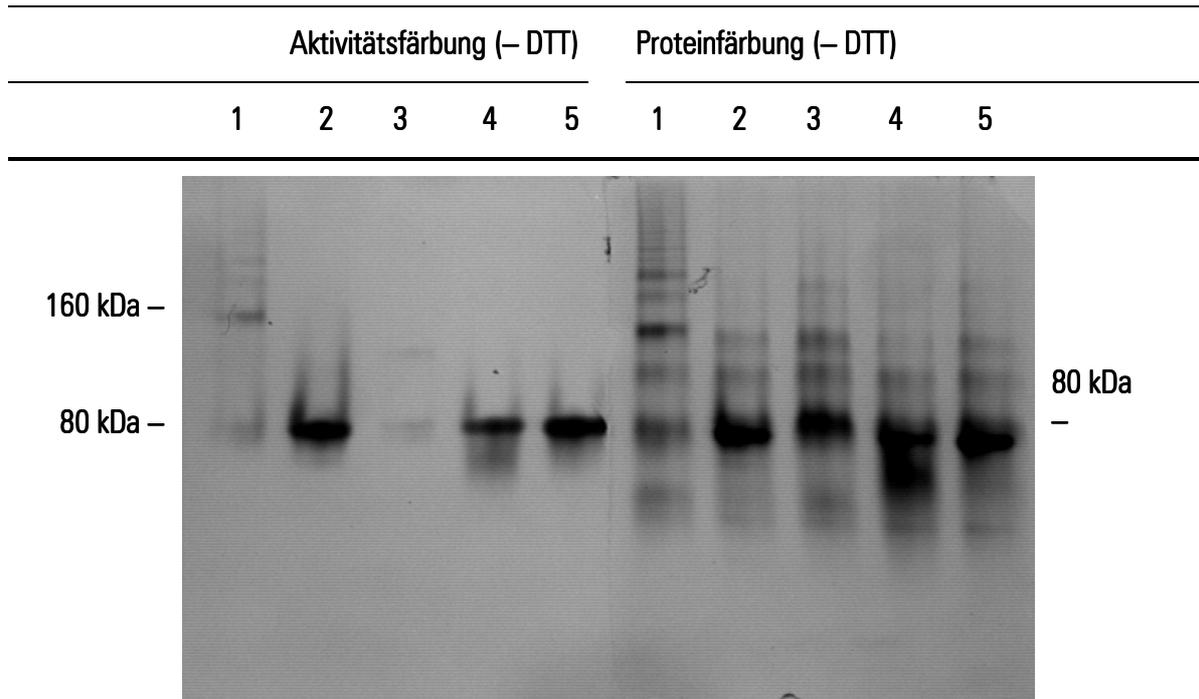


Abbildung 42: Untersuchungen der Auswirkungen der Oxidation mit Kupfer(II)-Ionen in der nativen PAGE. WT-FDH (1), C23S-FDH (2), C262V-FDH (3), C23S/C262V-FDH (4), C23S/C262A-FDH (5). Proben vor Auftrag aufs Gel mit DTT nicht reduziert (– DTT).

bilden kann. Die C262V-FDH, bei der auch eine zweite Bande in der Aktivitätsfärbung bei ca. 160 kDa zu erwarten wäre, ist gegenüber der Oxidation mit Kupfer(II)-Ionen die instabilste FDH (Tabelle 29). Dies hat zur Folge, daß sie durch die Oxidation ihre Aktivität verloren hat und infolgedessen nicht detektiert werden kann.

Kupfer(II)-Ionen können nicht nur die Bildung von Disulfidbrücken katalysieren. Die Seitenketten von Histidin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin sind in Proteinen potentielle Oxidationsstellen [Berlett & Stadtman, 1997; Dean *et al.*, 1997]. Deshalb ist in der Proteinfärbung bei allen FDHs mehrere Banden zu erkennen (Abbildung 42). Jedoch kann sowohl bei der WT-, als auch bei der C262V-FDH eine Bande bei 160 kDa beobachtet werden (Abbildung 42, Bahn 1 und 3).

In der SDS-PAGE wird das Protein aufgefaltet und es können sich sowohl inter-, als auch intramolekulare Disulfidbrücken bilden (Abbildung 43). Wenn die Proben vor der Auftrennung im Gel mit DTT reduziert werden, ist nur noch die Bande des Monomers bei 40 kDa zu sehen, sowohl die inter-, als auch die intramolekularen Disulfidbrücken werden vollständig reduziert.

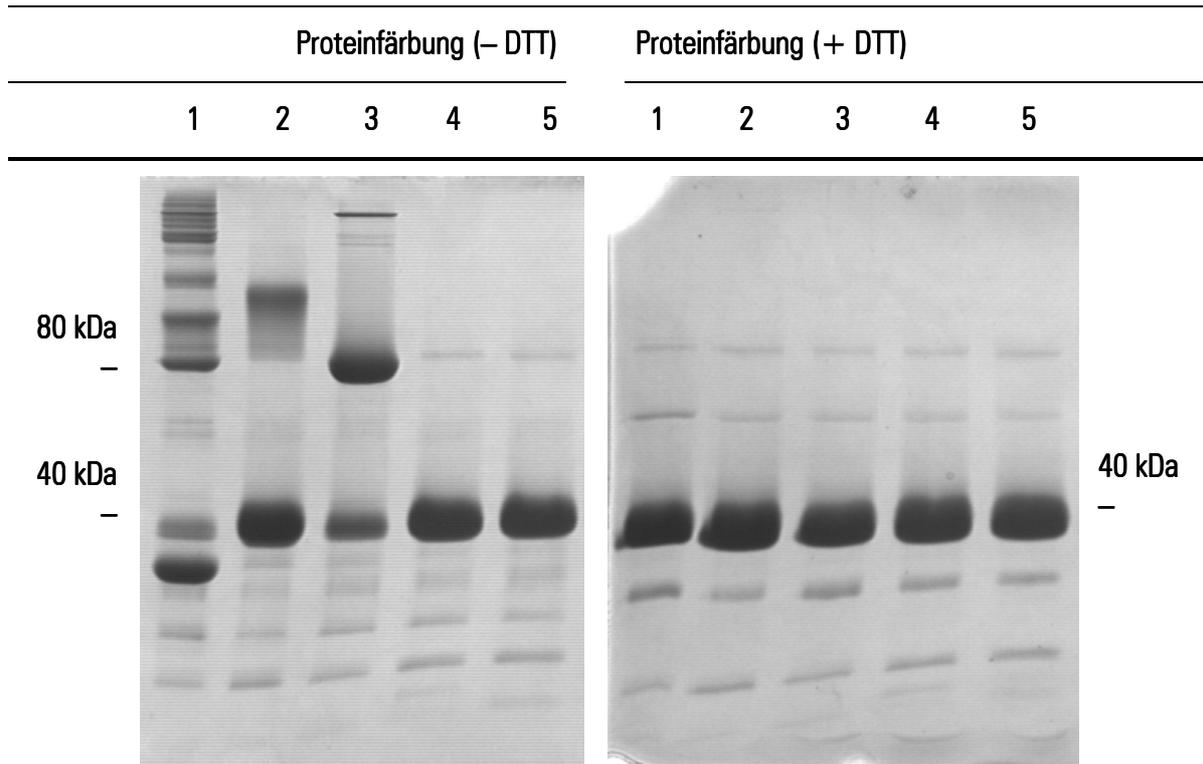


Abbildung 43: Untersuchungen der Auswirkungen der Oxidation mit Kupfer(II)-Ionen in der SDS-PAGE. DTT reduziert alle inter- und intramolekularen Disulfidbrücken. WT-FDH (1), C23S-FDH (2), C262V-FDH (3), C23S/C262V-FDH (4), C23S/C262A-FDH (5). Proben vor Auftrag aufs Gel mit DTT reduziert (+ DTT), nicht reduziert (– DTT).

Die WT-FDH ist die einzige der untersuchten FDHs, die zwei Cysteine besitzt. Sie kann aufgrund dessen unter nicht-reduzierenden Bedingungen polymerisieren und intermolekulare Disulfidbrücken bilden, d.h., längere Ketten bestehend aus mehreren Molekülen (Dimere, Trimere, Tetramere, usw.) (Abbildung 43; Bahn 1). Das Dimer besitzt mit 80 kDa genau das doppelte Molekulargewicht einer Untereinheit der FDH.

Darüber hinaus kann die WT-FDH, da sie zwei Cysteine pro Monomer besitzt, eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen dem Cystein 23 und dem Cystein 262 bilden. Diese Bindung führt dazu, daß das Molekül gefaltet vorliegt, im Gegensatz zu den durch das SDS entfalteten Proteinketten, und infolgedessen ein kleineres Volumen einnimmt, damit schneller durch das Gel wandert und dadurch unterhalb der 40 kDa-Bande bei ca. 38 kDa läuft.

Die beiden Einzelmutanten können dagegen im entfalteten Zustand nur Dimere bilden, da sie nur noch ein Cystein pro Molekül besitzen. Die zweite Bande der C262V-FDH läuft mit 80 kDa auf gleicher Höhe wie die bei der WT-FDH, dagegen läuft das Dimer der

C23S-FDH langsamer durch das Gel. Hier sind die Cysteine 262 der beiden Moleküle kovalent miteinander verbunden und es scheint, daß durch sterische Einflüsse das Dimer ein größeres Volumen einnimmt.

Die Doppelmutanten hingegen können wegen der Abwesenheit sämtlicher Cysteine auch keine Disulfidbrücken bilden.

Die Bildung von Oligomeren, die durch intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und deren Bildung durch Kupfer(II)-Ionen katalysiert wird, ist ein häufig beobachtetes Phänomen. Bei der Ribonuclease A, Lysozym und der Proteindisulfid-Isomerase konnten Dimere/Oligomere durch Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken beobachtet werden. Diese Dimer-/Oligomer-Bildung konnte durch den Zusatz von DTT verhindert werden. [Gao & Mehta, 2001].

Bei der Mannitolpermease (EII^{mtl}) aus *Escherichia coli* wurden zwei Cysteine identifiziert, die intermolekulare, durch Kupfer (II)-Ionen katalysierte Disulfidbrücken bilden können. Es gibt C124-C124-, C384-C384- und C124-C384-verbundene Dimere [Montfort *et al.*, 2001]. Auch FGF-1 kann Homodimere über Disulfidbrücken mit Kupfer(II)-Ionen als Katalysator bilden. Bei der C131S-Mutatante von FGF-1 wird die Dimerisierung verhindert [Patrie *et al.*, 1999].

4.4.4 Inaktivierung der FDH durch Bildung inter- und intramolekularer Disulfidbrücken

Um die Ergebnisse der Oxidationsversuche mit Wasserstoffperoxid und Kupfer(II)-Ionen, daß das Cystein 23 das oxidationsanfällige Cystein der FDH ist, zu überprüfen, wurde eine über ein Jahr bei -20°C in 50% Glycerin gelagerte *Candida boidinii*-FDH bei 50°C inkubiert und unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE untersucht (Abbildung 44).

Es zeigt sich das gleiche Bild, wie bei der Inaktivierung mit Kupfer(II)-Ionen. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE finden sich drei Banden bei 39, 40 und 80 kDa.

In der SDS-PAGE werden alle nicht-kovalenten Bindungen aufgebrochen, d.h., das Homodimer ist hier auf Höhe der 40 kDa-Bande des Markers zu finden, da es entfaltet ist und so nur das Monomer zu sehen sind.

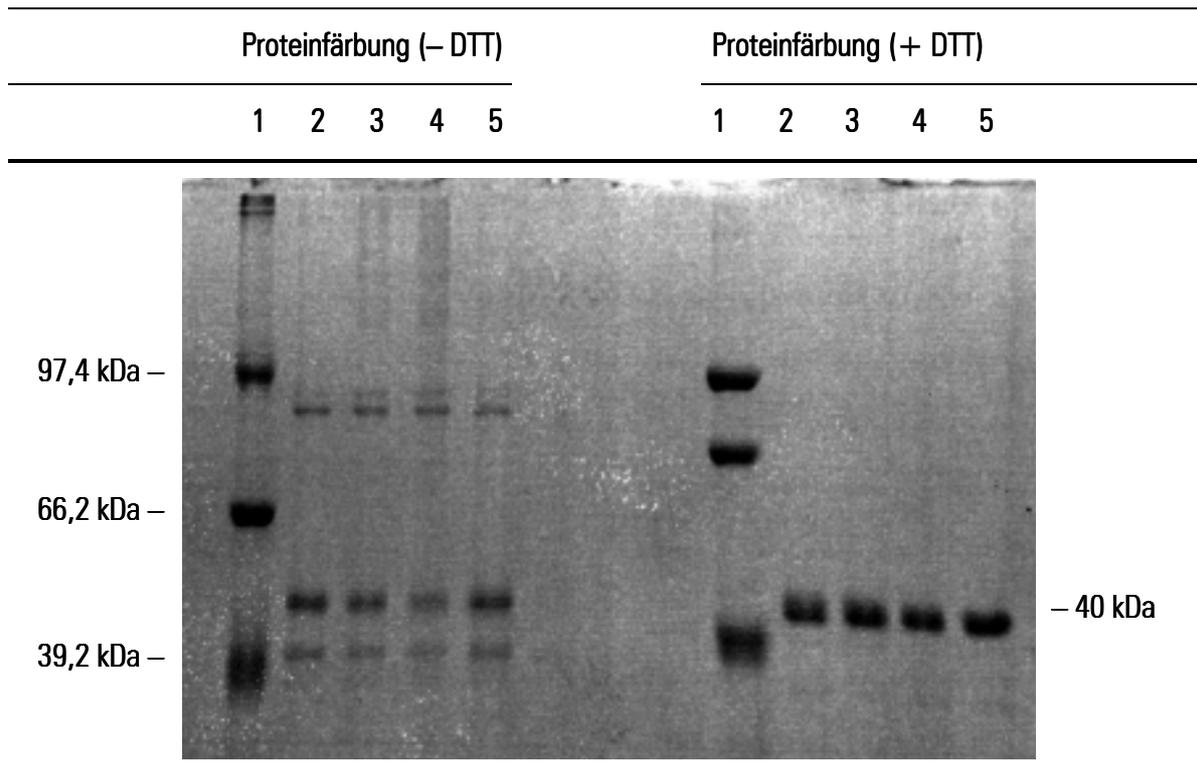


Abbildung 44: Untersuchung der über 1 Jahr bei -20°C in 50% Glycerin gelagerten *Candida boidinii*-FDH in der SDS-PAGE. Marker (1), 50, 58 und 64°C Inkubationstemperatur für 20 min (2 – 4), Kontrolle ohne Thermoinkubation (5). Proben vor Auftrag aufs Gel mit DTT reduziert (+ DTT), nicht reduziert (– DTT).

Eine weitere Bande unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist bei ca. 80 kDa zu erkennen. Sie könnte unter nativen Bedingungen das Homotetramer darstellen, d.h., insgesamt ein Molekulargewicht von 160 kDa aufweisen, da es aus zwei Homodimeren besteht, die durch C23-C23-Disulfidbrückenbindungen miteinander verbunden sind (Abbildung 45). Über der 80 kDa Bande gibt es eine kleine Nebenbande, was auf zwei Konformationenszustände des Dimers in der SDS-PAGE schließen läßt. Eine weitere Polymerisierung zu größeren Aggregaten konnte nicht festgestellt werden.

Auf Höhe von 39 kDa ist eine Bande zu finden, die unter der 40 kDa-Bande des normalen Monomers läuft. Sie könnte einem Monomer entsprechen, welches durch teilweise Entfaltung intramolekulare C23-C262-Disulfidbrückenbindungen ausbilden konnte. Damit weist es ein kleineres Volumen auf, was ein geringeres Molekulargewicht in der SDS-PAGE vortäuscht.

Unter reduzierenden Bedingungen findet sich nur noch eine Bande bei 40 kDa. Dies belegt, daß das Monomer und das Tetramer über Disulfidbrückenbindungen verbunden sind, da diese Bindungen durch die Reduktion mit DTT wieder aufgelöst werden können.

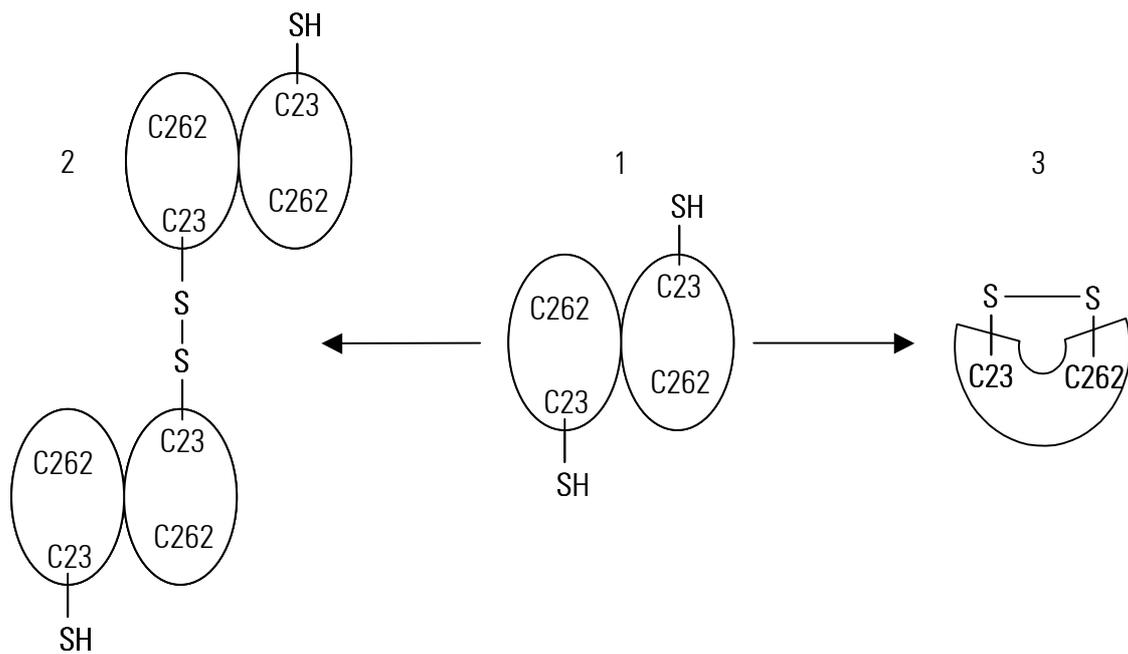


Abbildung 45: Inaktivierungsprozesse bei der FDH. Das native Homodimer der FDH (1) kann über die Cysteine 23 durch intermolekulare Disulfidbrücken kovalent verbunden werden (2). Andererseits kann ein entfaltetes Monomer der FDH durch intramolekulare Disulfidbrücken verbunden werden (3).

Dagegen hat die Thermoinkubation auf chemische Modifikationen keine Auswirkungen (Abbildung 44). Dies bestätigt das Ergebnis der Untersuchungen zur Thermostabilität (Abbildung 35).

Die bei der Lagerung der FDH aufgetretenen Veränderungen können auch beim Einsatz in technischen Verfahren auftreten. Hier ist mit der Anwesenheit von Schwermetallen, wie Kupfer im Betriebswasser zu rechnen. Dabei kann die Inaktivierung der FDH in zwei unterschiedliche Prozesse unterteilt werden. (I) Die Dimerisierung kann im nativen Zustand der FDH, (II) die Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken jedoch nur bei teilweise oder völlig entfaltetem Enzym geschehen (Abbildung 45).

4.5 Diskussion

Ein wichtiger Faktor für die Oxidationsanfälligkeit von Cysteinen ist die räumliche Anordnung der Thiol-Gruppe im Protein. In Fällen, bei denen der Kontakt zwischen den Thiol-Gruppen aus sterischen Gründen nicht möglich ist oder wenn das Protein nur eine

Thiol-Gruppe besitzt, können keine intramolekulare Disulfidbrücken ausgebildet werden. Unter geeigneten sterischen Bedingungen können jedoch intermolekulare Bindungen zu einem anderen Molekül ausgebildet werden, was zur Aggregation des Protein führt [Little & O'Brien, 1967].

Für die FDH konnte sowohl durch Bestimmung der Halbwertszeiten, als auch durch die PAGE-Untersuchungen dargestellt werden, daß die Vorhersagen des Homologiemodells zutreffen und nur das Cystein 23 unter nativen Bedingungen aus sterischen Gründen der Oxidation zugänglich ist, nicht aber das Cystein 262, welches im nativen Zustand im Proteininneren liegt und infolgedessen nicht oxidiert wird.

Anhand dieser Untersuchungen kann angenommen werden, daß der wahrscheinlichste chemische Inaktivierungsmechanismus im nativen Zustand der FDH die Oligomerisierung zu Tetrameren über intermolekulare Cys23-Cys23-Brücken ist. Die Dimerisierung/Oligomerisierung ist ein häufig beobachtetes Phänomen, das *in vitro* zur Desaktivierung der Proteine führen kann. Die Polymerisierung wurde bei der Filtration von BSA beobachtet, was zu einem Verlust an löslichem Protein führte [Kelly & Zydney, 1994].

In vivo scheint der Dimerisierung/Oligomerisierung im Gegensatz dazu eine biologische Funktion zuzukommen, sie ist z.B. zur Aktivierung eines Proteins notwendig oder scheint beim Transport von Proteinen vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat wichtig zu sein [Patrie *et al.*, 1999; Gao & Mehta, 2001; Montfort *et al.*, 2001].

Im entfalteten Zustand können einzelne Monomere durch Bildung von intramolekularen Cys23-Cys262-Brücken verknüpft sein. Diese Wechselwirkung der Cysteine führt dann letztlich zu einer irreversiblen Denaturierung, die den vollständigen Verlust der Aktivität bedingt.

5 Erhöhung der spezifischen Aktivität

5.1 Grenzen der Aktivität

5.1.1 Anforderungen an Enzyme in technischen Anwendungen

Für Anwendung von Enzymen in technischen Prozessen ist eine möglichst hohe Wechselzahl k_{cat} interessant. Allerdings sind Enzyme für biologische Systeme optimiert und weisen infolgedessen oftmals keine große katalytische Aktivität auf. Mittlerweile ist es durch den Austausch von Aminosäuren möglich, die Aktivität von Enzymen zu beeinflussen [Arnold, 2001]. Ziel war es, die spezifische Aktivität der FDH mittels gerichteter Evolution zu erhöhen (Abbildung 46).

Zur Ausnutzung der vollen Leistung des Katalysators werden in technischen Prozessen hohe Substratkonzentrationen eingesetzt. Bei hohen Substratkonzentrationen ist die Katalysegeschwindigkeit proportional zur Enzymkonzentration $[E]$ und der Wechselzahl k_{cat} und stellt damit eine Reaktion 1. Ordnung dar:

$$V = k_{cat} [E] \quad (18)$$

Daher ist bei der Anwendung in technischen Prozessen, neben der Stabilität, eine möglichst hohe Wechselzahl k_{cat} interessant, denn je höher die Wechselzahl, desto weniger Enzymmenge muß bei gleicher Produktivität eingesetzt werden.

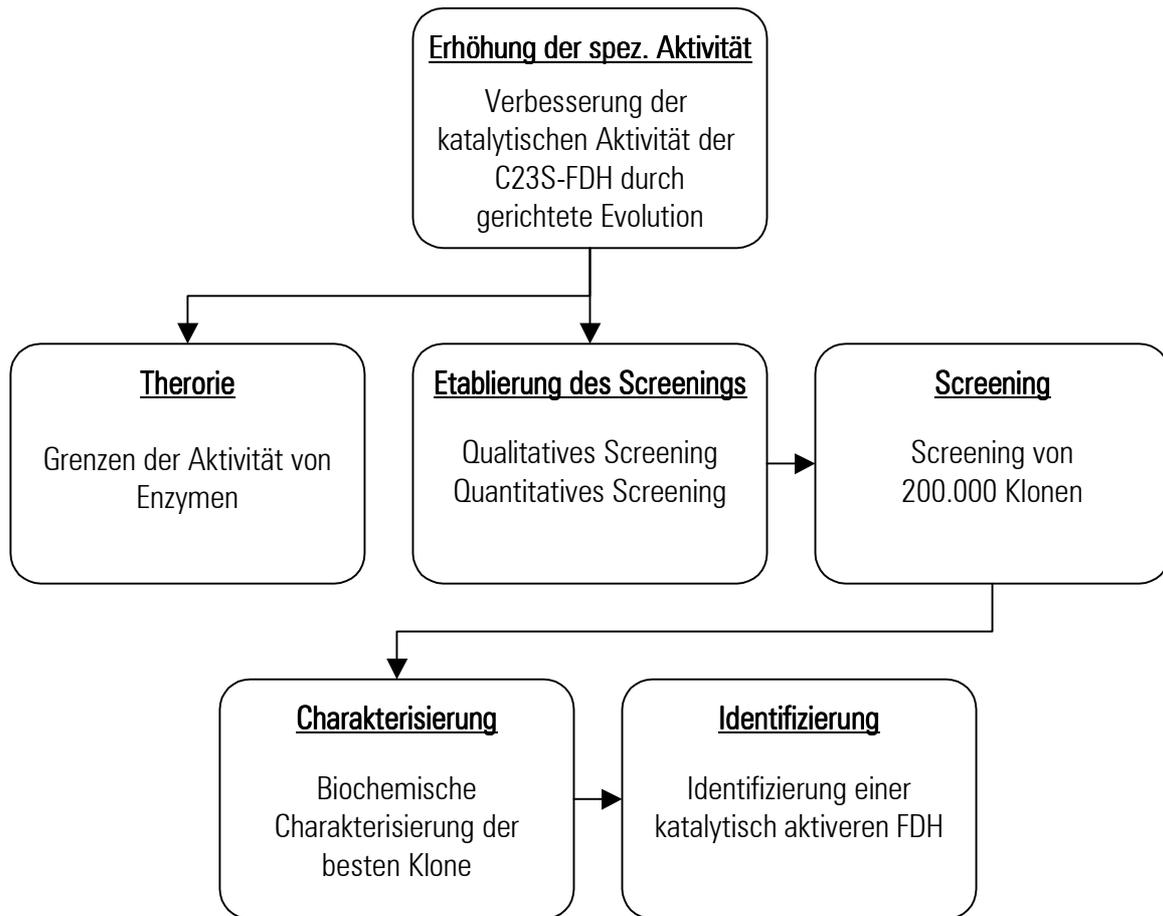


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Suche nach katalytisch aktiveren FDHs.

5.1.2 Aktivitäten der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenasen

Die FDH aus *Candida boidinii* besitzt, wie alle bisher bekannten NAD-abhängigen FDHs mit 6 U mg^{-1} eine relativ geringe katalytische Aktivität (Tabelle 30). Deshalb stellte sich die Frage, ob es theoretisch überhaupt möglich ist, die FDH so verändern zu können, daß sie eine höhere spezifische Aktivität aufweist. Für 1-Substrat-Reaktionen gibt es das k_{cat}/K_M -Kriterium, mit dessen Hilfe sich abschätzen läßt, ob ein Enzym unter physiologischen Bedingungen der Diffusionslimitierung unterliegt. Um diese Frage für die FDH klären zu können, war es zunächst nötig, ein Kriterium für 2-Substrat-Reaktionen zu erarbeiten.

Tabelle 30: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von NAD-abhängigen FDHs aus verschiedenen Organismen [Popov & Lamzin, 1994].

Reich	Organismus	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]
Bakterien	<i>Moraxella sp. C-1</i>	6,0 (25°C)
	<i>Pseudomonas sp. 101</i>	16,0 (37°C)
Hefen	<i>Hansenula polymorpha</i>	2,8 (37°C)
	<i>Candida boidinii</i>	6,3 (30°C)
	<i>Candida methanolica</i>	7,5 (30°C)
	<i>Candida methylica</i>	10,0 (37°C)
Pflanzen	<i>Glycine soja var. Beeson</i>	1,4 (25°C)
	<i>Pisum sativum</i>	3,7 (25°C)

5.1.3 Definition der Aktivität

Die maximale Aktivität eines Enzyms wird mit der Wechselzahl k_{cat} (bzw. *tof*, turnover frequency) [s⁻¹] ausgedrückt, sie ist der Quotient aus den gebildeten Molen Produkt pro Zeit n_P [mol s⁻¹] pro aktivem Zentrum n_Z [mol]:

$$k_{cat} = \frac{n_P}{n_Z} \quad (19)$$

Alternativ dazu kann die maximale Aktivität eines Enzyms mit Hilfe der spezifischen Aktivität V_{max} ausgedrückt werden. Die spezifische Aktivität V_{max} [μmol min⁻¹ mg⁻¹ oder U mg⁻¹] ist der Quotient aus den gebildeten Molen Produkt pro Zeit n_P [μmol min⁻¹] pro reinem Protein n_P [mg]:

$$V_{max} = \frac{n_P}{n_P} \quad (20)$$

Mit Hilfe des bekannten Molekulargewichtes M_r der FDH-Monomere von 40.370 g mol⁻¹ kann von der spezifischen Aktivität V_{max} [U mg⁻¹] auf die Wechselzahl k_{cat} [s⁻¹] umgerechnet werden:

$$k_{cat} = \frac{M_r}{6 \cdot 10^4} V_{max} \quad (21)$$

5.1.4 Ist die NAD-abhängige Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* optimal an ihre physiologische Aufgabe angepaßt?

5.1.4.1 Kinetisches Modell

Die FDH aus *Candida boidinii* katalysiert eine Reaktion mit zwei Substraten und zwei Produkten in Form einer Ordered Bi-Bi-Kinetik [Kato *et al.*, 1979; Blanchard & Cleland, 1980]. Die Substrate binden sequenziell, erst A, dann B. Die Produkte werden ebenso geordnet vom Enzym freigesetzt, erst P, dann Q (Abbildung 6). Dieser Mechanismus liegt bei den meisten NAD-abhängigen Dehydrogenasen vor [Mendes, 1993; Mendes, 1997; Mendes & Kell, 1998].

Aus diesem Reaktionsschema ergibt sich das dazugehörige kinetische Modell. Es besteht aus einer reversiblen Doppelsubstratkinetik, bei der das sequenzielle Binden und Freisetzen der Edukte bzw. Produkte berücksichtigt ist:

$$V = \frac{k_{cat}^h \left([A][B] - \frac{[P][Q]}{K_{eq}} \right)}{[A][B] + K_{MA}[B] + K_{MB}[A] + K_{iA}K_{MB} + \frac{k_{cat}^h}{k_{cat}^r K_{eq}} \left(K_{MQ}[P] \left(1 + \frac{[A]}{K_{iA}} \right) + [Q] \left(K_{MP} \left(1 + \frac{K_{MA}[B]}{K_{iA}K_{MB}} \right) + [P] \left(1 + \frac{[B]}{K_{iB}} \right) \right) \right)} [E] \quad (22)$$

Die Rück-Reaktion ist aus thermodynamischen Gründen ($\Delta G^\circ = -19,3 \text{ kJ mol}^{-1}$) sehr klein. Sie beträgt 1/5.000 der Hin-Reaktion [Schütte *et al.*, 1976]. Damit kann die Gleichung durch Entfernen des reversiblen Terms vereinfacht werden:

$$V = \frac{k_{cat}[A][B]}{[A][B] + K_{MA}[B] + K_{MB}[A] + K_{iA}K_{MB}} [E] \quad (23)$$

Unter der Bedingung, daß eine schnelle Gleichgewichtseinstellung der zu EAB führenden Reaktion erfolgt, d.h., $k_3 \ll k_2$ (Abbildung 6), kann K_{MA} mit K_{iA} gleichgesetzt werden und die Gleichung 23 geht in Gleichung 24 über. Es wurde gezeigt, daß diese Annahme zutreffend ist [Kato *et al.*, 1979].

$$V = \frac{k_{cat}[A][B]}{([A] + K_{M A})([B] + K_{M B})}[E] \quad (24)$$

5.1.4.2 Kriterium für Ordered Bi-Bi-Reaktionen

Unter physiologischen Bedingungen, mit $[S] \ll K_M$, liegt die enzymatische Geschwindigkeit weit unter k_{cat} , da die meisten aktiven Zentren unbesetzt sind. Die Kinetik für Ordered Bi-Bi-Reaktionen aus Gleichung 24 vereinfacht sich zu einer Reaktion 3. Ordnung:

$$V = \frac{k_{cat}}{K_{M A} K_{M B}}[A][B][E] \quad (25)$$

Die physikalische Grenze der Konstanten $k_{cat}/(K_{M A} \cdot K_{M B})$ ist damit nur durch die Assoziationsgeschwindigkeit des Enzyms mit dem Substrat limitiert.

5.1.4.3 Diffusionslimitierung

Die $k_{cat}/(K_{M A} \cdot K_{M B})$ -Konstante scheint eine Reaktionskonstante 3. Ordnung zu sein, tatsächlich erfolgt die Assoziation zum EAB-Komplex jedoch in zwei Einzelschritten. Zunächst bindet NAD (A) an das Enzym (E) und bildet den EA-Komplex, erst dann kann ein weiterer Zusammenstoß mit Formiat (B) zum EAB-Komplex führen. Da der gebildete EA-Komplex erneut mit einem Molekül zusammenstoßen muß, um den aktiven EAB-Komplex bilden zu können, ergibt sich als theoretische obere Grenze eine Halbierung der Diffusionslimitierungskonstante von 10^8 bis $10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ auf $5 \cdot 10^7$ bis $5 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Die Konstante $k_{cat}/(K_{M A} \cdot K_{M B})$ der FDH besitzt mit $k_{cat} = 4,3 \text{ s}^{-1}$, K_M Formiat = $5,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ und K_M NAD = $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ folgenden Wert:

$$\frac{k_{cat}}{K_{M A} K_{M B}} = 1,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ M}^{-1} \quad (26)$$

Die Katalysegeschwindigkeit der FDH liegt damit bereits nahe an der Grenze der Diffusionslimitierung von $5 \cdot 10^7$ bis $5 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ M}^{-1}$, d.h., sie ist im Laufe der Evolution optimal an ihre Aufgabe angepaßt worden. Da bei technischen Prozessen aber andere Anforderungen an Enzyme gestellt werden, stellte sich nun die Frage, ob die FDH theoretisch an diese technischen Bedingungen angepaßt werden kann.

5.1.5 Möglichkeiten der Erhöhung der Aktivität

In technischen Prozessen ist das entscheidende Kriterium k_{cat} und nicht $k_{cat}/(K_{M A} \cdot K_{M B})$, d.h., man möchte die volle Katalysatorleistung ausnutzen und deswegen werden Substratkonzentrationen gewählt, bei denen Substratsättigung vorliegt (Gleichung 18). Wenn man nur k_{cat} erhöhen wollte, würde man zwangsläufig die obere Grenze der Diffusionslimitierung überschreiten, da die FDH nahe an der Diffusionslimitierungsgrenze arbeitet. Dies ist nicht möglich. Falls aber neben k_{cat} auch gleichzeitig die K_M -Werte erhöht werden, würde diese Grenze nicht überschritten werden:

$$\frac{k_{cat}}{K_{M A} K_{M B}} = \frac{100 k_{cat}}{10 K_{M A} 10 K_{M B}} \leq 10^8 \quad (27)$$

Es sollte also theoretisch möglich sein, die Wechselzahl k_{cat} der FDH bei gleichzeitiger Erhöhung der Affinitätskonstanten K_M zu erhöhen.

5.2 Entwicklung des Screening-Verfahrens

5.2.1 Herstellung der High-Frequency-Random-Genbibliothek

Die zur Zeit wichtigste Methode zur asexuellen gerichteten Evolution ist die fehlerhafte Polymerasekettenreaktion (Error-Prone PCR). Durch Einstellung suboptimaler Reaktionsbedingungen kann die Fehlerhäufigkeit während der PCR, wie beispielsweise bei der *Thermus aquaticus*-Polymerase (*Taq*-Polymerase), von 0,001 – 0,02% unter Standardbedingungen auf über 1% gesteigert werden [Caldwell & Joyce, 1992; Caldwell & Joyce, 1994]. Diese *in vitro*-Methode ist einfach durchzuführen, ermöglicht eine relativ genaue Einstellung der Mutationsrate und kann auf die für das Zielprotein kodierende

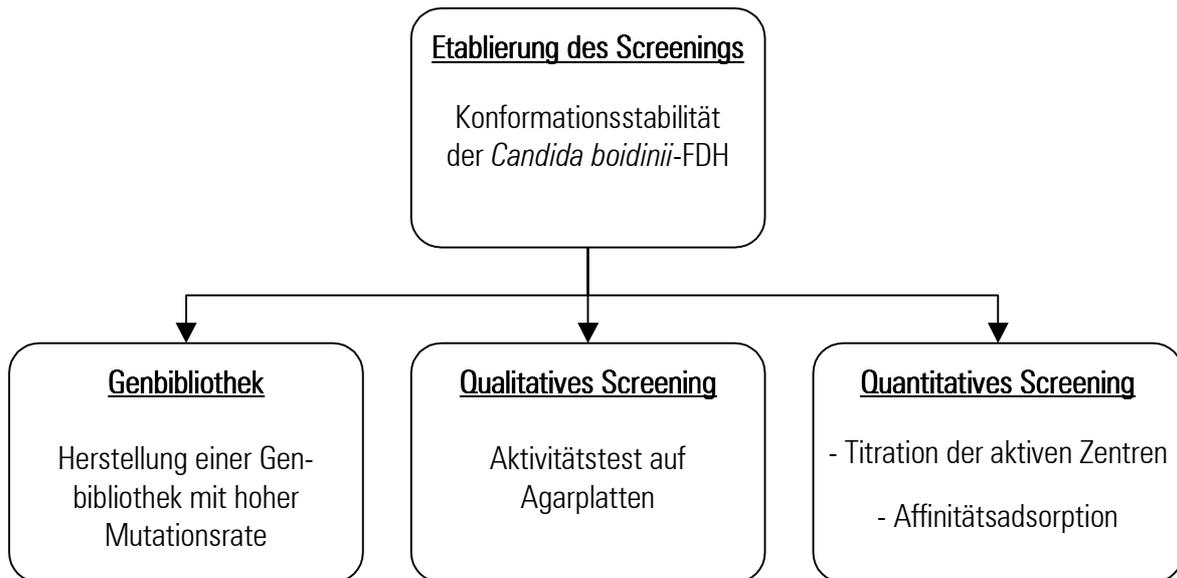


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Entwicklung des Screening-Verfahrens auf spezifische Aktivität der FDH-Muteine. Mit dem qualitativen Screening sollte in einer Ja/Nein-Selektion die große Zahl der inaktiven Klone aussortiert werden. Zur quantitativen Bestimmung der spezifischen Aktivität der FDH-Muteine wurden zwei Verfahren, die Titration der aktiven Zentren und die Affinitätsadsorption auf ihre Durchführbarkeit im Screening untersucht.

Nukleotidsequenz oder auch auf kleinere Sequenzbereiche beschränkt werden. Von Nachteil ist der nicht-statistische Austausch der Nukleotide und eine häufig erniedrigte Effizienz bei der Ligation der PCR-Produkte [Xu *et al.*, 1999].

Die Methode der Error-Prone PCR wurde zur Herstellung einer High-Frequency-Random-Genbibliothek verwendet (Abbildung 47).

Da die Mutationsrate für jedes Gen in der Error-Prone PCR unterschiedlich ist, muß sie zunächst für die gegebenen Bedingungen bestimmt werden (Abbildung 48). Bei einem Gen mit 1.000 Nukleotiden bewirkt eine Mutationsrate von ungefähr 0,1% pro Nukleotid einen Aminosäureaustausch pro Gen [Cadwell & Joyce, 1992; Cadwell & Joyce, 1994]. Bei Subtilisin E gilt die Beziehung, daß zwei Nukleotidaustausche pro Gen mit einer Mutationsrate von ca. 0,2% pro Nukleotid ungefähr 65% aktive Klone zur Folge haben. Unterschiedliche Enzyme besitzen unterschiedliche Aktivitätsprofile bei verschiedenen Mutationsraten, der Anteil an aktiven Klonen jedoch ist ein zuverlässiger Hinweis auf die Mutationsrate und kann als Schnelltest für die Entwicklung einer Zufallsmutagenese-Bibliothek herangezogen werden [Zhao *et al.*, 1999].

Eine Mn^{2+} -Konzentration von 0,5 mM ergab 70% inaktive Klone, das entspricht dem Austausch von ca. 4 Nukleotiden pro Gen und einer Mutationsrate von ca. 0,4% pro Nukleotid.

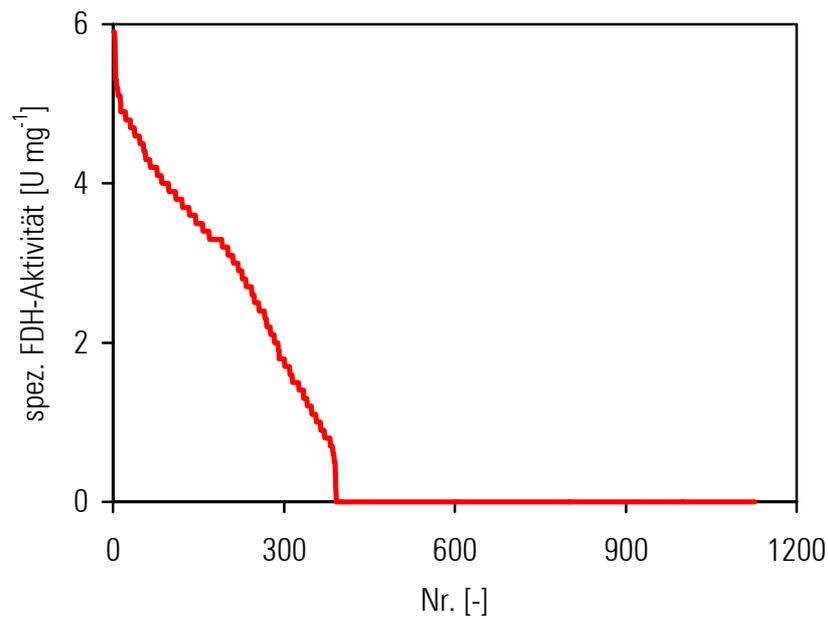


Abbildung 48: Testbibliothek zur Bestimmung der Mutationsrate mit 1.152 FDH-Klonen. Die Klonen sind entsprechend ihrer Aktivität absteigend sortiert dargestellt. Es wurde 0,5 mM Mn²⁺ eingesetzt.

Um den Sequenzraum bei kleinen Bibliotheksgrößen ($10^4 - 10^6$ Klone) möglichst gut abzudecken, sollte eine hohe Mutationsrate von 5 – 20 Nukleotidaustauschen pro Gen eingestellt werden [Daugherty *et al.*, 1999; Long-McGie *et al.*, 1999; Zaccolo & Gherardi, 1999; Knecht *et al.*, 2000]. Bei niedrigen Mutationsraten, bei denen nur ein bis zwei Aminosäureaustausche pro Gen eingestellt werden, befinden sich viele WT-Gene, d.h., Proteine, die keine Mutation aufweisen im Screening. Darüber hinaus können in Bibliotheken mit kleinen Mutationsraten Klone mit mehreren Mutationen, die als Mehrfachmutante eine signifikante Verbesserung aufweisen, deren Einzelmutationen aber nur unwesentlich verbessert sind, nicht gefunden werden [Zaccolo & Gherardi, 1999].

Stellt man hohe Mutationsraten ein, so erhält man nur wenige aktive Klone. Die Wahrscheinlichkeit, daß unter diesen hochaktive Klone sind, ist jedoch größer [Daugherty *et al.*, 1999; Knecht *et al.*, 2000]. Um die angestrebte hohe Mutationsrate von ca. 7 Nukleotidaustauschen pro Gen (1095 bp) zu erreichen, wurde der erste Error-Prone PCR-Ansatz nochmals mit der gleichen Mn²⁺-Konzentration von 0,5 mM in einer Error-Prone PCR randomisiert. Diese Bibliothek wurde gereinigt, geschnitten, ligiert und schließlich in *Escherichia coli* JM101 transformiert.

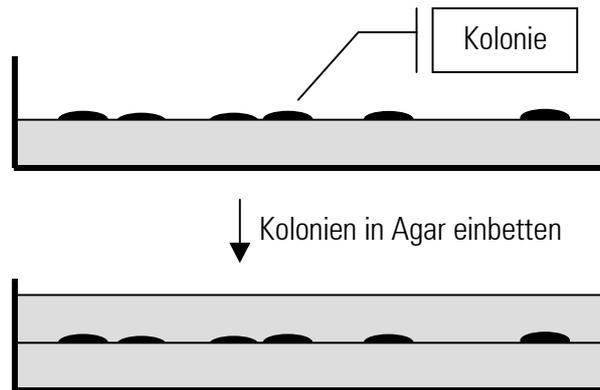


Abbildung 49: Schematische Darstellung des Fixierens der Zellkolonien in Agar. Die über Nacht auf einer Agarplatte gewachsenen Kolonien werden mit flüssigem Agar ca. 4 mm überschichtet. Nach Erstarren sind die Kolonien fixiert und können durch die nachfolgenden Waschschriffe nicht mehr fortgeschwemmt werden.

5.2.2 Qualitatives Screening

Um die große Zahl an inaktiven Klonen aussortieren zu können, mußte eine Methode entwickelt werden, mit der es möglich ist, die Klone einer Ja/Nein-Selektion, d.h., einem qualitativen Screening zu unterziehen (Abbildung 47). Dazu wurde ein Aktivitätstest entwickelt, der auf den Agarplatten durchgeführt wird. Die aktiven Klone, d.h., die Klone, die eine biologisch aktive FDH besitzen, bilden durch Substratumsetzung einen sichtbaren Hof und können so leicht identifiziert und isoliert werden.

5.2.2.1 Fixierung der Kolonien

Zunächst müssen die Kolonien, damit sie beim Aufbringen der Färbelösungen nicht fortschwimmen, fixiert werden. Die Fixierung auf Nitrocellulose ist in der Literatur beschrieben, allerdings kann mit dieser Methode nur eine kleine Genbibliothek durchmustert werden, da die anschließende Detektionsmethode relativ aufwendig ist [Allen & Holbrook, 2000].

Zur Fixierung der Kolonien mußte infolgedessen eine neue Methode entwickelt werden. Es stellte sich dabei heraus, daß die Einbettung der Kolonien in eine Agarschicht möglich ist. Dazu werden die über Nacht bis zu einer Größe von ca. 1 mm gewachsenen Kolonien mit flüssigem Agar überschichtet. Nach dem Einbetten sind die Zellen fixiert und die Agarplatten können der Detektionsprozedur unterzogen werden, ohne daß Kolonien weggeschwemmt werden (Abbildung 49). Da die Agarschicht gut flüssigkeitsdurchlässig ist, ist die Detektion mit den Färbelösungen ohne weiteres möglich.

Es wurde untersucht, ob beim Überschichten mit der Agarlösung einzelne Zellen weggeschwemmt werden. Dies würde bedeuten, daß die ganze Platte kontaminiert würde und so letztlich eine gezielte Isolation der Zellen nicht möglich ist. Dazu wurden die Kolonien einer Platte in Agar eingebettet und nach Erstarren des Agars mit Zahnstochern in Bereiche ohne Kolonien gepickt, um eventuell vorhandene, fortgetragene Zellen isolieren zu können. Die Zahnstocher wurden dann in LB-Medium transferiert. Bei 96 Versuchen war keiner positiv, d.h., das Medium nicht bewachsen. Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, daß beim Überschichten keine Zellen fortgetragen werden (Daten nicht gezeigt).

5.2.2.2 Zellaufschluß

Für die Nachweisreaktion mußten die Zellen lysiert werden, um die intrazelluläre FDH freizusetzen. Jedoch sollte die Lyse nur unvollständig durchgeführt werden, d.h., nicht alle Zellen sollten aufgeschlossen werden. Dies ist von Vorteil, denn Zellen aus den als aktiv erkannten Kolonien können durch Picken mit einem Zahnstocher isoliert werden. Damit ist keine Master-Platte mehr notwendig und man wird demzufolge in die Lage versetzt, auf nur einer Platte den Phänotyp der Koloniezellen erkennen und anschließend den Genotyp gezielt isolieren zu können. Falls dagegen der Zellaufschluß vollständig wäre, müßte man durch Überstempeln eine Master-Platte herstellen, um die auf der Testplatte erkannten positiven Klone auf der Master-Platte isolieren zu können.

Für die partielle Zellyse der Koloniezellen war einerseits im Überschichtungsagar EDTA und das Detergenz Triton-X 100 enthalten, andererseits wurden die Platten mit einer EDTA/Triton-X 100-Aufschlußlösung inkubiert. Nach diesem Lyseschritt wurden die Platten mehrmals gewaschen.

5.2.2.3 Nachweisreaktion

Die Platten wurden mit den Färbelösungen inkubiert und anschließend die Lösung durch Waschen entfernt. Die FDH reduziert das zugegebene NAD zu NADH, dessen Elektronen dann über den Elektronenüberträger Phenazinethosulfat (PES) auf Nitrotetrazoliumblau-Chlorid (NTB) übertragen werden (Abbildung 50).

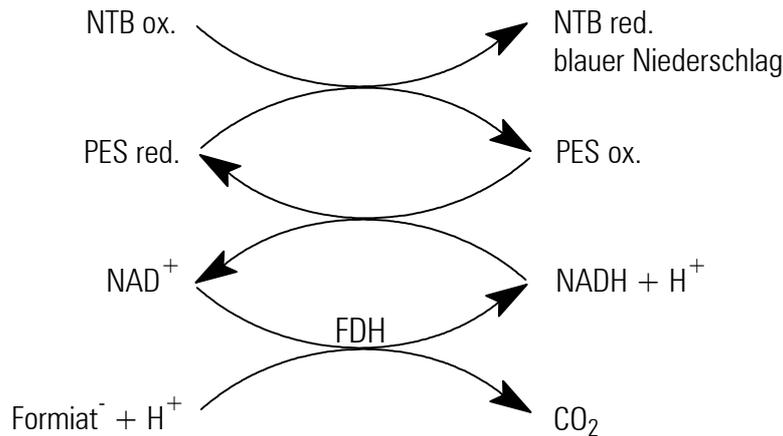


Abbildung 50: Reaktion zum Nachweis der aktiven FDH-Klone (FDH) mit Phenazinethosulfat (PES) und Nitrotetrazoliumblau-Chlorid (NTB). Durch die FDH werden die Elektronen des Formiats auf das NAD übertragen und es entsteht NADH. Das PES überträgt sie schließlich vom NADH auf das NTB, welches in reduzierter Form als blaues Präzipitat ausfällt.

Oxidiertes Nitrotetrazoliumblau ist in Wasser gut löslich und von gelblicher Farbe, reduziertes Nitrotetrazoliumblau dagegen fällt sofort als blaues Präzipitat aus [Gabriel, 1971]. Nach Zugabe der Färbelösungen bilden die aktiven Klone durch Umsetzung von NAD zu NADH mittels der FDH blaue Höfe. Kolonien, die keine biologisch aktive FDH besitzen, werden dagegen nur blau angefärbt, da das Phenazinethosulfat (PES) aufgrund seines Elektropotentials viele Moleküle oxidieren kann und anschließend seine Elektronen an das Nitrotetrazoliumblau-Chlorid (NTB) abgibt.

Da nicht alle Zellen einer Kolonie durch den Lyseschritt aufgeschlossen wurden, können intakte Zellen aus den Kolonien, die einen Hof gebildet haben, mit Hilfe eines Zahnstochers isoliert werden (Abbildung 51).

5.2.3 Quantitatives Screening

Zur Bestimmung der spezifische Aktivität der FDH-Klone mußte eine Methode zum quantitativen Screening entwickelt werden. Dazu standen zwei Methoden zur Auswahl, die Tritration der aktiven Zentren und die Aufreinigung der FDH bis zur Homogenität durch Affinitätsadsorption (Abbildung 47).

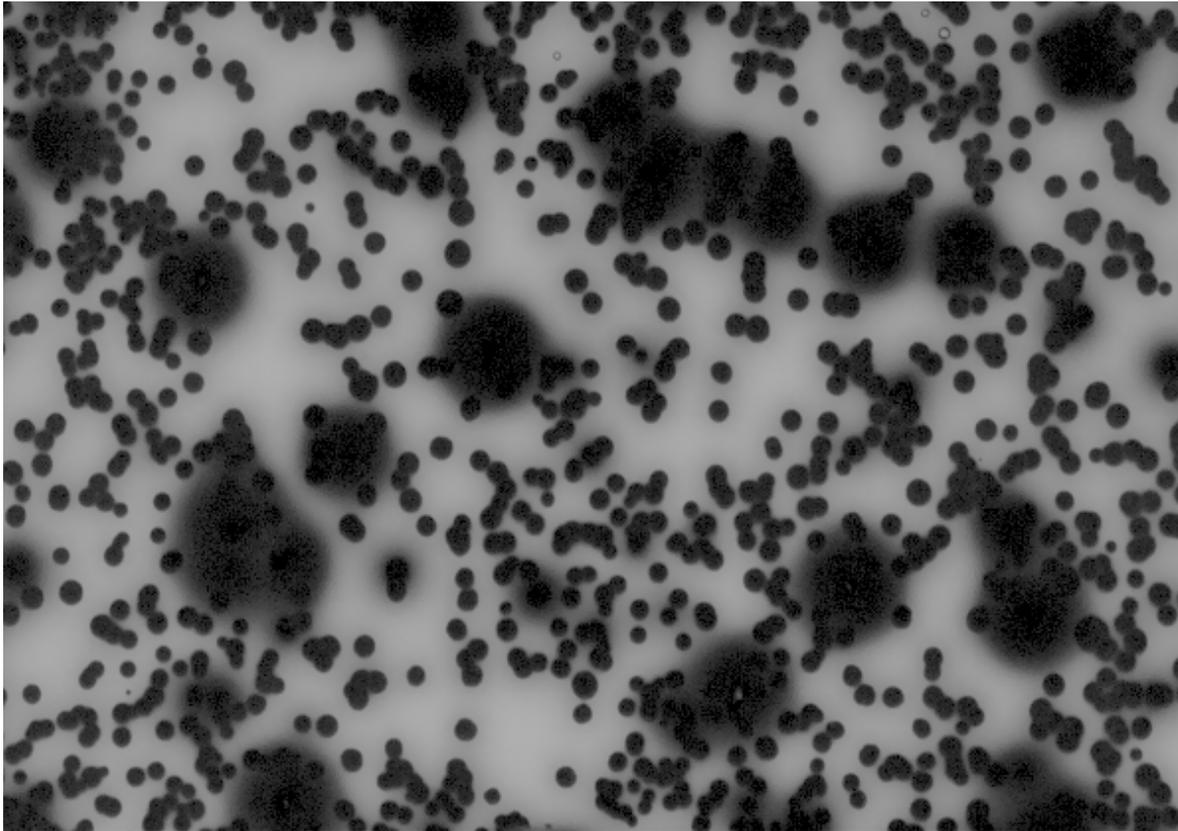


Abbildung 51: Darstellung der angefärbten aktiven FDH-Klone im qualitativen Screening. Die aktiven Klone bilden durch Substratumsetzung einen dunkelblauen Hof und können so identifiziert und isoliert werden. Die Isolierung erfolgt durch Picken mit einem Zahnstocher. Dabei wird genau in das Zentrum eines Hofes eingestochen.

Eine Voraussetzung für beide Methoden ist, daß die FDH-Konzentration weit größer als die Konzentration der restlichen Nukleotid-bindenden Proteine ist, da mit beiden Methoden viele Nukleotid-bindende Proteine, und hier vor allem die NAD(P)-bindenden, erfaßt werden. Die FDH wird zu 15% des löslichen Gesamtzellproteins exprimiert, d.h., die restlichen Nukleotid-bindenden Proteine liegen im Rohextrakt in einer sehr viel geringeren Konzentration als die überexprimierte FDH vor.

Zunächst wurde versucht, die Bestimmung der spezifischen Aktivität mittels Titration der aktiven Zentren zu etablieren, da sie von der Handhabung sehr einfach durchzuführen ist.

5.2.3.1 Titration der aktiven Zentren

5.2.3.1.1 Stöchiometrische Inhibition der aktiven Zentren

Bei der Titration der aktiven Zentren wird ein Hemmstoff eingesetzt, der stöchiometrisch irreversibel an ein aktives Zentrum bindet und es auf diese Weise inhibiert. Wenn man das Verhältnis von gebundenem Hemmstoff pro aktivem Zentrum kennt, kann man mit dieser Methode die Konzentration der aktiven Zentren bestimmen.

Das Dichlortriazin, Vilmafix Blue A-R, ist ein Pseudo-Analoges zu NAD und hemmt die FDH aus *Candida boidinii* irreversibel, es bindet ein Molekül Vilmafix Blue A-R pro aktivem Zentrum [Labrou & Clonis, 1995]. Da Vilmafix Blue A-R nicht verfügbar war, wurde als weiterer möglicher irreversibler Inhibitor Procion MX-R untersucht. Procion MX-R ist zu Vilmafix Blue A-R strukturverwandt und besitzt ebenfalls eine Dichlortriazin-Gruppe (Abbildung 52).

Ein reversibler Hemmstoff bewirkt die sehr rasche Verminderung der Enzymaktivität auf einen bestimmten Wert, der sich danach zeitabhängig nicht weiter verändert. Bei einer irreversiblen Hemmung dagegen nimmt die Enzymaktivität exponentiell zeitabhängig ab, da sie eine Reaktion 2. Ordnung ist. Das Enzymmolekül muß mit dem Hemmstoff zusammenstoßen, nicht jeder Zusammenstoß führt aber zur irreversiblen Bindung (Abbildung 53). Das freie Enzym (E) stößt mit dem irreversiblen Hemmstoff (I) zusammen und bildet den EI-Komplex. In einem zweiten Schritt wird der inaktive EI₁-Komplex gebildet.

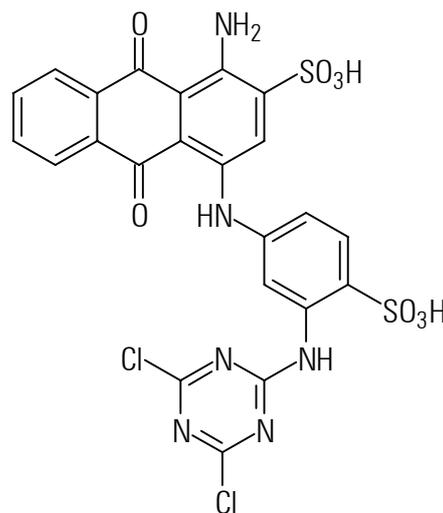


Abbildung 52: Strukturformel von Procion MX-R. Durch Abspaltung eines Chloratoms der Dichlortriazin-Gruppe des Moleküls kommt es zu einer kovalenten Bindung mit einer Aminosäure des Enzyms.

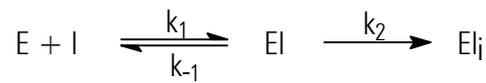


Abbildung 53: Allgemeines Reaktionsschema für die Bindung eines irreversiblen Inhibitors an ein Enzym.

Die Hemmung der FDH durch Procion MX-R zeigt einen deutlichen zeitabhängigen Verlauf (Abbildung 54). Die Inhibition konnte mit dem aus Abbildung 53 resultierenden kinetischen Modell angepaßt werden, d.h., Procion MX-R ist ein irreversibler Inhibitor der *Candida boidinii*-FDH.

5.2.3.1.2 Bestimmung des stöchiometrischen Verhältnisses

Aus der Abhängigkeit der Enzyminhibition von der Hemmstoffkonzentration kann die Stöchiometrie der Bindung bestimmt werden. Bei einer starken Bindung nimmt im Anfangsbereich die Enzymaktivität nahezu linear ab. Durch Extrapolation auf die Abszisse kann man den Anteil des pro eingesetztem aktiven Zentrum gebundenen Hemmstoffes bestimmen [Bisswanger, 2000] (Abbildung 55).

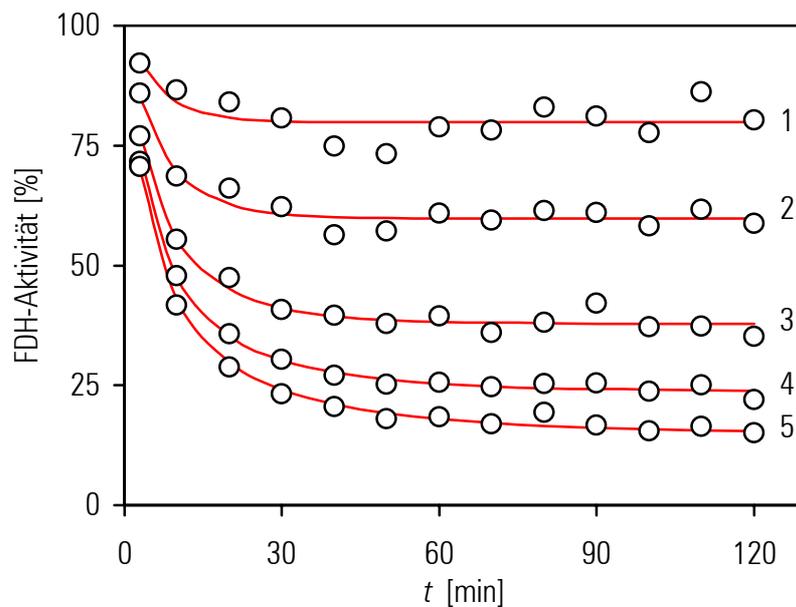


Abbildung 54: Darstellung der zeitabhängigen Inhibition der FDH durch Procion MX-R bei verschiedenen Konzentrationen. 0,1 µM (1), 0,25 µM (2), 0,5 µM (3), 0,75 µM (4), 1 µM Procion MX-R (5).

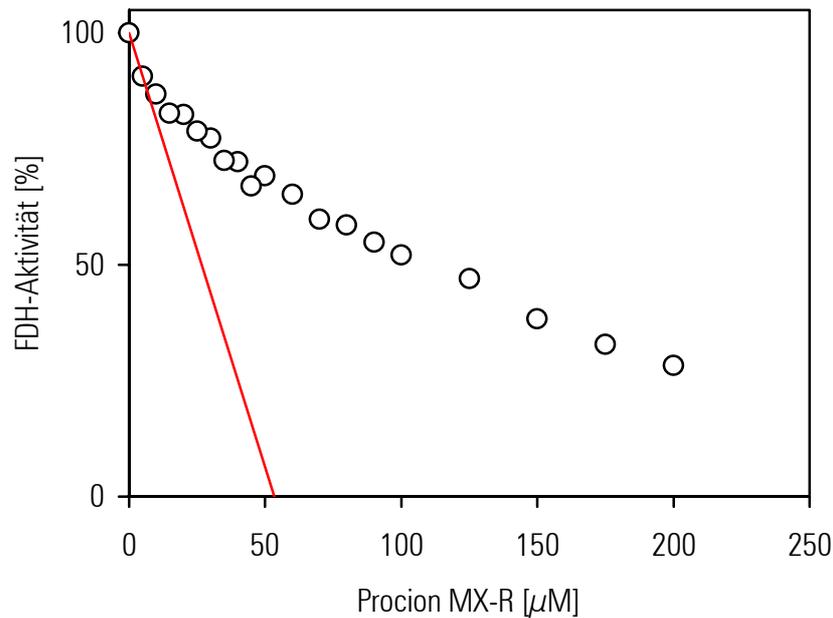


Abbildung 55: Bestimmung des stöchiometrischen Verhältnisses von aktivem Zentrum zu gebundenem irreversiblen Hemmstoff. Es befanden sich $55 \mu\text{M}$ aktive Zentren in Lösung. Die Assoziationsgeschwindigkeit des Hemmstoffs Procion MX-R mit dem aktiven Zentrum ist relativ niedrig (Inkubationszeit: 3 h, Temperatur: 30°C). Deshalb ergibt sich bei kleinen Hemmstoffkonzentrationen kein linearer Verlauf der FDH-Restaktivität. Infolgedessen muß die Steigung im Null-Punkt zur Berechnung verwendet werden.

Für diese Untersuchungen wurde $27,5 \mu\text{M}$ homogen gereinigte WT-FDH eingesetzt, d.h., es befanden sich $55 \mu\text{M}$ aktive Zentren in der Lösung und es wurden $54 \mu\text{M}$ aktive Zentren bestimmt (Abbildung 55), d.h., ein Molekül des Hemmstoffs Procion MX-R bindet pro aktivem Zentrum.

5.2.3.1.3 Messung während des Screenings

Die Bestimmung der aktiven Zentren sollte während des Screenings mit einer 2-Punkt-Bestimmung durchgeführt werden, d.h., es sollte die Volumenaktivität ohne Hemmstoff und die Volumenaktivität mit einer definierten Menge an Hemmstoff nach einer ausreichenden Inkubationszeit gemessen werden. Bei dem Verhältnis von einem Hemmstoffmolekül pro aktivem Zentrum kann dann die Konzentration der aktiven Zentren bestimmt werden (Abbildung 56). Anschließend kann daraus die Wechselzahl k_{cat} bzw. die spezifische Aktivität V_{max} berechnet werden.

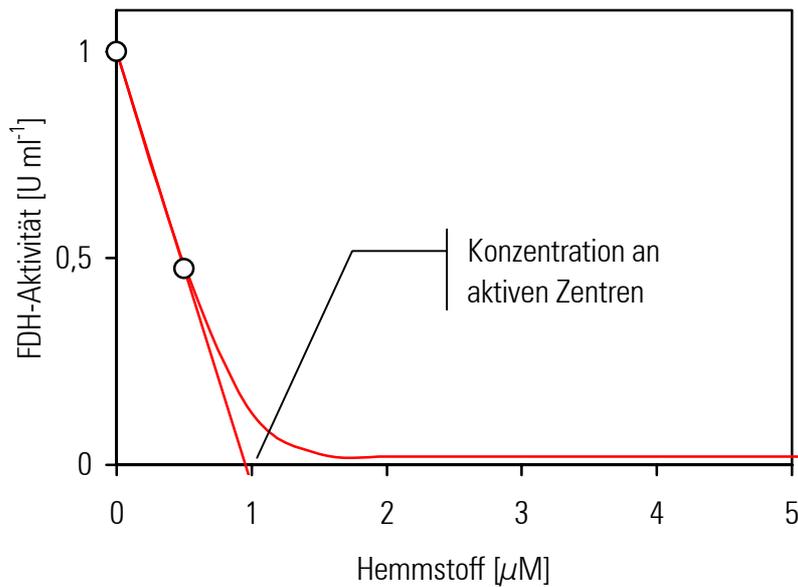


Abbildung 56: Prinzip der Bestimmung der Anzahl der aktiven Zentren mit zwei Meßwerten. Eine Messung der Volumenaktivität wird bei einer Hemmstoffkonzentration von 0, eine zweite bei einer Konzentration von ungefähr der Hälfte der Konzentration an aktiven Zentren nach ausreichender Inkubationszeit bestimmt. Die Anzahl der aktiven Zentren kann am Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse abgelesen werden.

Da aber die Assoziationsgeschwindigkeit von Procion MX-R mit dem aktiven Zentrum relativ niedrig ist (Abbildung 55), konnte diese Methode nicht angewendet werden. Die lange Inkubationszeit verhindert den Einsatz im Screening.

Infolgedessen mußte eine alternative Methode zur Bestimmung der spezifischen Aktivität etabliert werden: Die Affinitätsadsorption.

5.2.3.2 Affinitätsadsorption

Die im Screening schließlich angewendete Methode ist die Reinigung der FDH bis zur Homogenität mittels Affinitätsadsorption. Nach Zellaufschluß wird der Rohextrakt auf das Affinitätsadsorptionsmaterial rote Sepharose, an welches nur Nukleotid-bindende Proteine assoziieren können, gegeben [Kroner *et al.*, 1982 a; Kroner *et al.*, 1982 b, Reichert *et al.*, 2001]. Nach dem Binden der FDH wird die Matrix gewaschen und anschließend mit dem Cofaktor NAD eluiert. Um die spezifische Aktivität bestimmen zu können, wird einerseits die Volumenaktivität und andererseits die Proteinkonzentration gemessen.

0	0	0	4,6	3,3	0	0	0,6	4,9	4,7	0	0
0	0	0	0	0	0	0	2,3	0	4,8	0	0
4,7	0	4,2	0	4	5,1	0	0	4,2	0	0	0
0	1	2,1	3,4	0	3,7	4,1	4,9	0	0	0	0
1,5	0	4,6	0	3,3	0,9	0	0	0	3,2	3,3	5,9
0	0	0	3,1	0	4,6	0	2,3	0	1,4	0	0
0	0	0	0	2,8	3,5	0	3,2	0	0	0	4,9
0	0	0	0	4,2	3,4	3,2	3,8	0	0	0	0

Abbildung 57: Vergleich der Ergebnisse des qualitativen mit dem nachfolgenden quantitativen Screening. Die Ergebnisse des qualitativen Screenings sind durch die Dunkelfärbung der Kolonien zu erkennen. Die Zahlen geben für jede zugehörige Kolonie die in dem quantitativen Screening gemessene spezifische Aktivität in U mg^{-1} wieder.

Es wurden Vorversuche zur Bestimmung der Reinheit nach der Affinitätsadsorption durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, daß die FDH nach dem Reinigungsschritt zu mehr als 90% gereinigt vorliegt, es wurden spezifische Aktivitäten bei der C23S-FDH von 5,5 – 5,8 U mg^{-1} gemessen (Daten nicht gezeigt).

5.2.4 Zuverlässigkeit der Screening-Methoden

Um die Zuverlässigkeit der beiden Screening-Methoden zu überprüfen, wurden die Ergebnisse des qualitativen mit denen des nachfolgenden quantitativen Screenings einer Testbibliothek verglichen.

96 Klone der randomisierten Testbibliothek wurden zufällig ausgewählt und in einer 96-Well-Platte angezogen. Anschließend wurden die Zellen auf eine Agarplatte gestempelt, über Nacht inkubiert und schließlich mit dem für das qualitative Screening entwickelten Aktivitätstest angefärbt (Abbildung 57). Gleichzeitig wurde die spezifische Aktivität dieser Klone mit Hilfe der Methode des quantitativen Screenings bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Ergebnisse des qualitativen und des quantitativen Screenings gut übereinstimmen. Bei allen Kolonien ist zumindest eine leichte

Dunkelfärbung zu erkennen, obwohl in manchen Fällen keine Aktivität im quantitativen Screening nachweisbar war. Dies ist damit zu erklären, daß das Phenazinethosulfat (PES) aufgrund seines Elektropotentials viele Moleküle oxidieren kann und anschließend seine Elektronen an das Nitrotetrazoliumblau-Chlorid (NTB) abgibt (Abbildung 50). Mit dem qualitativen Screening wurde jedoch nur eine Ja/Nein-Selektion durchgeführt, so daß die Unterscheidung von aktiven und inaktiven Klonen gut durchführbar war (Abbildung 51).

5.3 Ergebnisse des Screenings

5.3.1 Qualitatives Screening

Als Templat wurde die C23S-FDH eingesetzt, da dieses Cystein-defiziente FDH-Mutein als das oxidationsstabilste identifiziert wurde (4.4 Chemische Stabilität, Seite 83). Es wurde eine Genbank mit ca. 200.000 Klonen erzeugt und dem qualitativen Screening unterzogen (Abbildung 58). Hier konnten ca. 2.000 aktive Klone identifiziert werden, dies entspricht einer sehr hohen Mutationsrate mit 99% inaktiven Klonen. Von den ca. 2.000 aktiven Klonen wurden ca. 1.500 isoliert und in dem quantitativen Screening weiter untersucht.

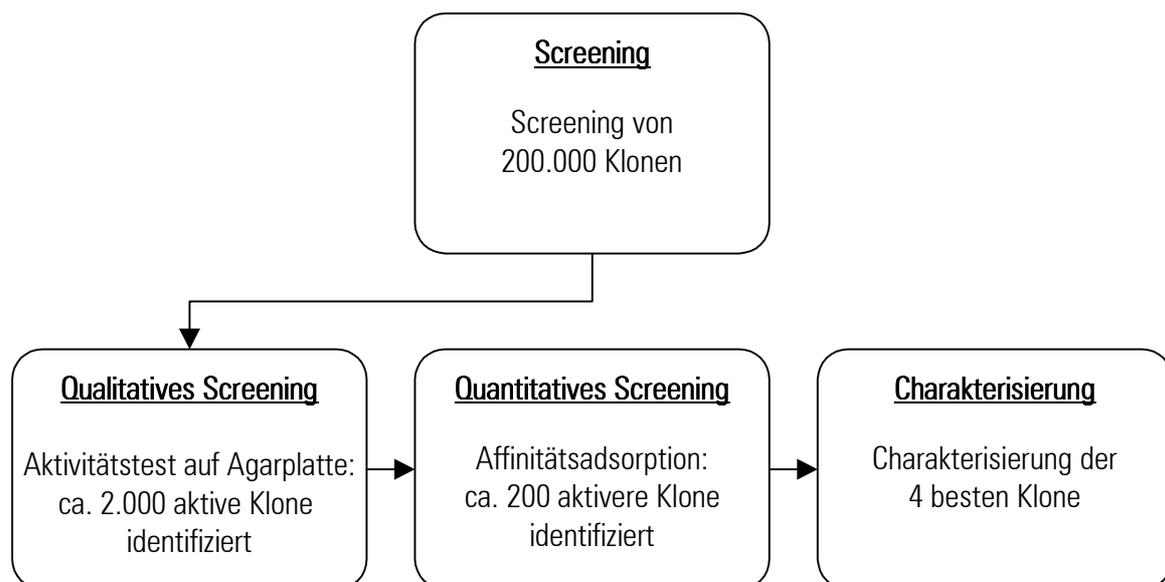


Abbildung 58: Schematische Darstellung des Screenings von ca. 200.000 FDH-Klonen.

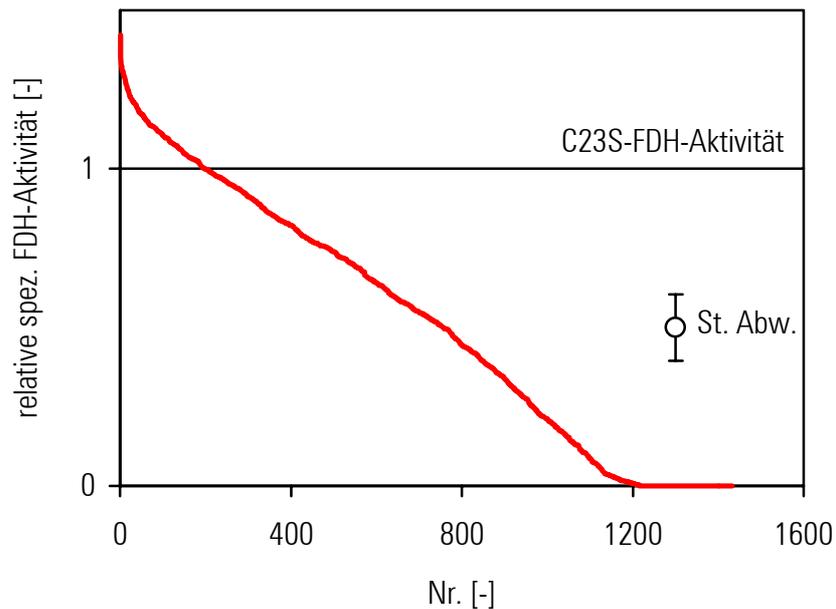


Abbildung 59: Darstellung des quantitativen Screenings von 1.500 Klonen. Die Klone sind entsprechend ihrer FDH-Aktivität in Relation zum Templat C23S-FDH ($5,5 \text{ U mg}^{-1}$) absteigend sortiert dargestellt. Zur Bestimmung der Standardabweichung wurde das Templat während der Messung als Kontrolle mitgemessen (Versuche $n = 48$).

5.3.2 Quantitatives Screening

Die isolierten 1.500 aktiven Klone wurden im quantitativen Screening auf ihre spezifische Aktivität hin untersucht. Es zeigte sich, daß ca. 200 Klone eine höhere spezifische Aktivität als das Templat C23S-FDH aufwiesen (Abbildung 59). Die vier aktivsten Klone wurden ausgewählt und charakterisiert.

5.3.3 Charakterisierung der C23S/F285S-Formiatdehydrogenase

5.3.3.1 Darstellung des Austausches

Die Sequenzierung der vier ausgewählten Muteine ergab, daß alle einen Aminosäureaustausch des Phenylalanins 285 zum Serin aufweisen (Tabelle 31). Darüber hinaus besitzen alle vier Klone 3 – 4 unterschiedliche stille Mutationen.

Tabelle 31: Basen- und Aminosäuresequenz des Templats C23S-FDH und der C23S/F285S-FDH. Alle vier sequenzierten Klone weisen einen F285S-Austausch auf (rot), jedoch besitzen sie unterschiedliche stille Mutationen. Die stillen Mutationen sind für nur einen Klon dargestellt (rot). Stille Mutationen (*), Primer-bedingter Austausch im Stop-Codon (Stop).

Formiatdehydrogenase	Basen-Austausche	AS-Austausche
C23S (Templat)	G68C	C23S
	C93T	A31*
	C156T	S52*
	G1053T	G351*
	G1095A	Stop*
C23S/F285S	G68C	C23S
	C93T	A31*
	C156T	S52*
	T213A	P71*
	T819G	S273*
	T864C	F285S
	T1050C	N350*
	G1053T	G351*
	G1095A	Stop*

Der F285S-Austausch liegt, wenn man die Aminosäuresequenz der bekannten NAD-abhängigen FDHs vergleicht, in einer hochkonservierten Region der Cofaktor-bindenden Domäne (Tabelle 32). Drei Aminosäureseitenketten aus diesem Bereich befinden sich im aktiven Zentrum und eine dieser Aminosäuren, Glutamin 282 (*Pseudomonas sp.* 101-Sequenz: Glutamin 313), ist an der Cofaktor-Bindung beteiligt. Die Cofaktor-bindende Domäne ist verantwortlich für die Erkennung und Bindung des Cofaktors und ihre Struktur ist, im Gegensatz zur katalytischen Domäne, innerhalb der Familie der NAD-abhängigen Dehydrogenasen konserviert [Lamzin *et al.*, 1992; Kutsenko *et al.*, 1994].

Da der berechneten 3D-Struktur der *Candida boidinii*-FDH sowohl am N-, als auch am C-Terminus einige Aminosäuren fehlen (Tabelle 23), konnte der Deckel über dem Substratkanal nicht abgebildet werden. Deshalb wird der F285S-Austausch in den folgenden Abbildungen anhand der Holo-Kristallstruktur der *Pseudomonas sp.* 101-FDH dargestellt.

Die Darstellung des Austausches zeigt, daß das Phenylalanin 285 am Eingang des Substratkanals liegt und mit dem Deckel, der das aktive Zentrum abschließt, interagieren kann (Abbildung 60). Das Serin 285 indessen kann mit dem Deckel nicht mehr in Verbindung treten. Möglicherweise gestattet dies einen schnelleren Substrateintritt in das bzw. schnelleren Produktaustritt aus dem aktiven Zentrum, da der Deckel nicht mehr richtig fixiert wird und somit schneller beim Wechsel von der Apo- zur Holo-Konformation aufspringen kann (Abbildung 5).

Tabelle 32: Darstellung der Aminosäuresequenz der bekannten NAD-abhängigen FDHs aus verschiedenen Organismen. Es ist zu erkennen, daß das Phenylalanin 285 in einem hochkonservierten Bereich liegt, die Numerierung entspricht der *Candida boidinii*-Sequenz. Gleiche Aminosäuren (rot), ähnliche Aminosäuren (grün), unterschiedliche Aminosäuren (schwarz), Aminosäuren im aktiven Zentrum (X).

Organismus	FDH-Sequenz
	285
<i>Candida boidinii</i>	GYGGDVWF PQPAPKDHPWRDM
<i>Hansenula polymorpha</i>	GYGGDVWF PQPAPKDHPWRSM
<i>Aspergillus nidulans</i>	GYGGDVWF PQPAPKEHPLRYA
<i>Neurospora crassa</i>	GYGGDVWF PQPAPQDHPRLRYA
<i>Solanum tuberosum</i>	GYSGDVW Y PQPAPKDHPWR YM
<i>Pseudomonas sp. 101</i>	GY A GDVWF PQPAPKDHPWRTM
<i>Morxella sp.</i>	GY A GDVWF PQPAPNDHPWRTM
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GYGGDVW DKQPAPKDHPWRTM
	 XX X

Da der F285S-Austausch allerdings in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums liegt, wäre es auch denkbar, daß allein Konformationsänderungen der katalysierenden Aminosäuren durch das Serin 285 hervorgerufen werden, die dann zu einem beschleunigten Ablauf der Reaktion führen.

5.3.3.2 Kinetische Parameter

Um die Auswirkungen des Aminosäureaustausches bestimmen zu können, wurden die kinetischen Parameter der C23S/F285S-FDH untersucht (Abbildung 61). Die spezifische Aktivität V_{max} der C23S/F285S-FDH ist im Vergleich zum Templat C23S-FDH um den Faktor 1,7 erhöht (Tabelle 33). Die K_M -Werte haben sich ungefähr um den Faktor 2 erhöht. Die Inhibitionskonstante K_i des NADHs ist in etwa gleich geblieben. Es ist eine Überschußinhibierung, sowohl beim Formiat, als auch beim NAD, bei sehr hohen Substratkonzentrationen zu erkennen.

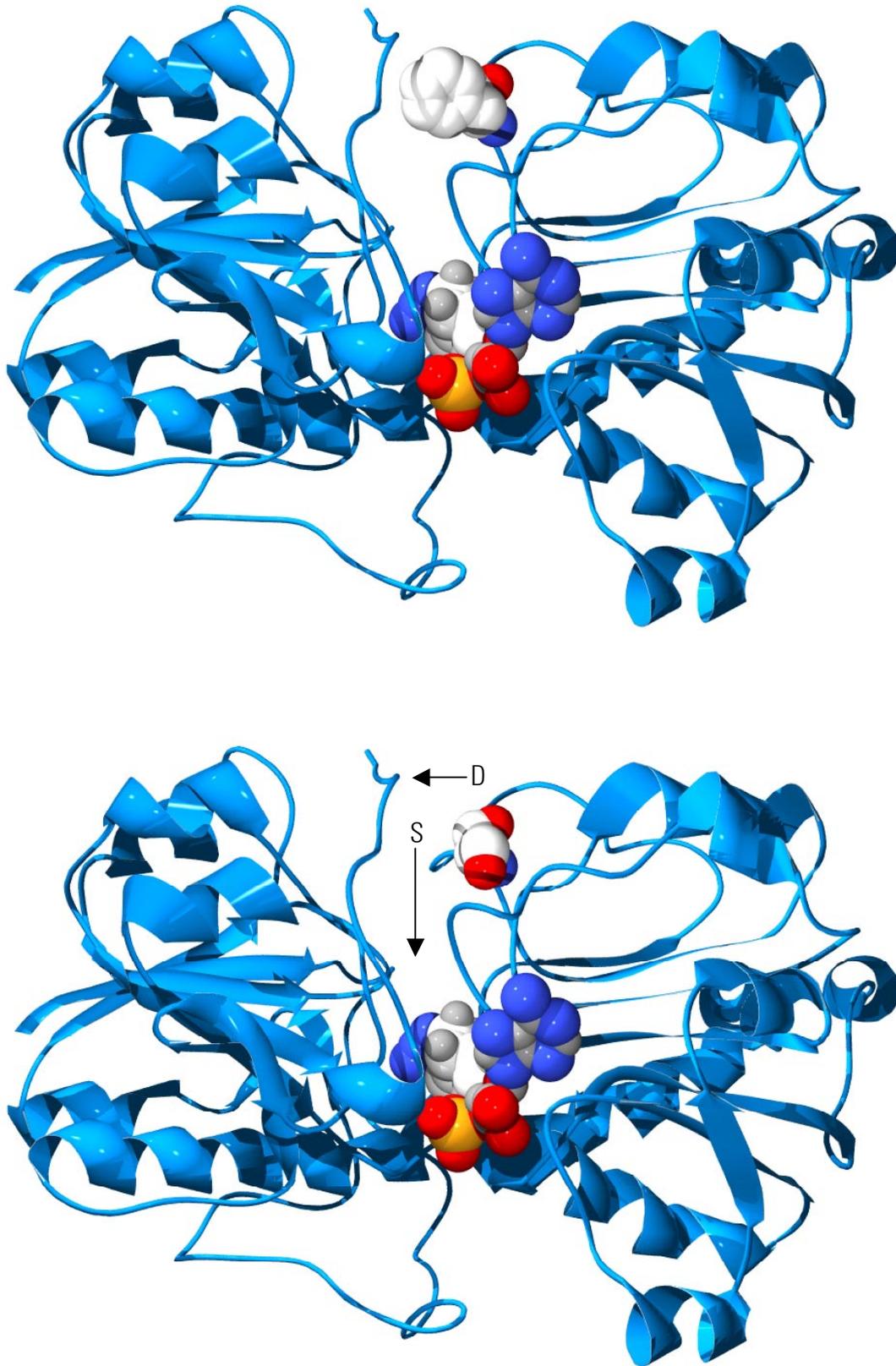
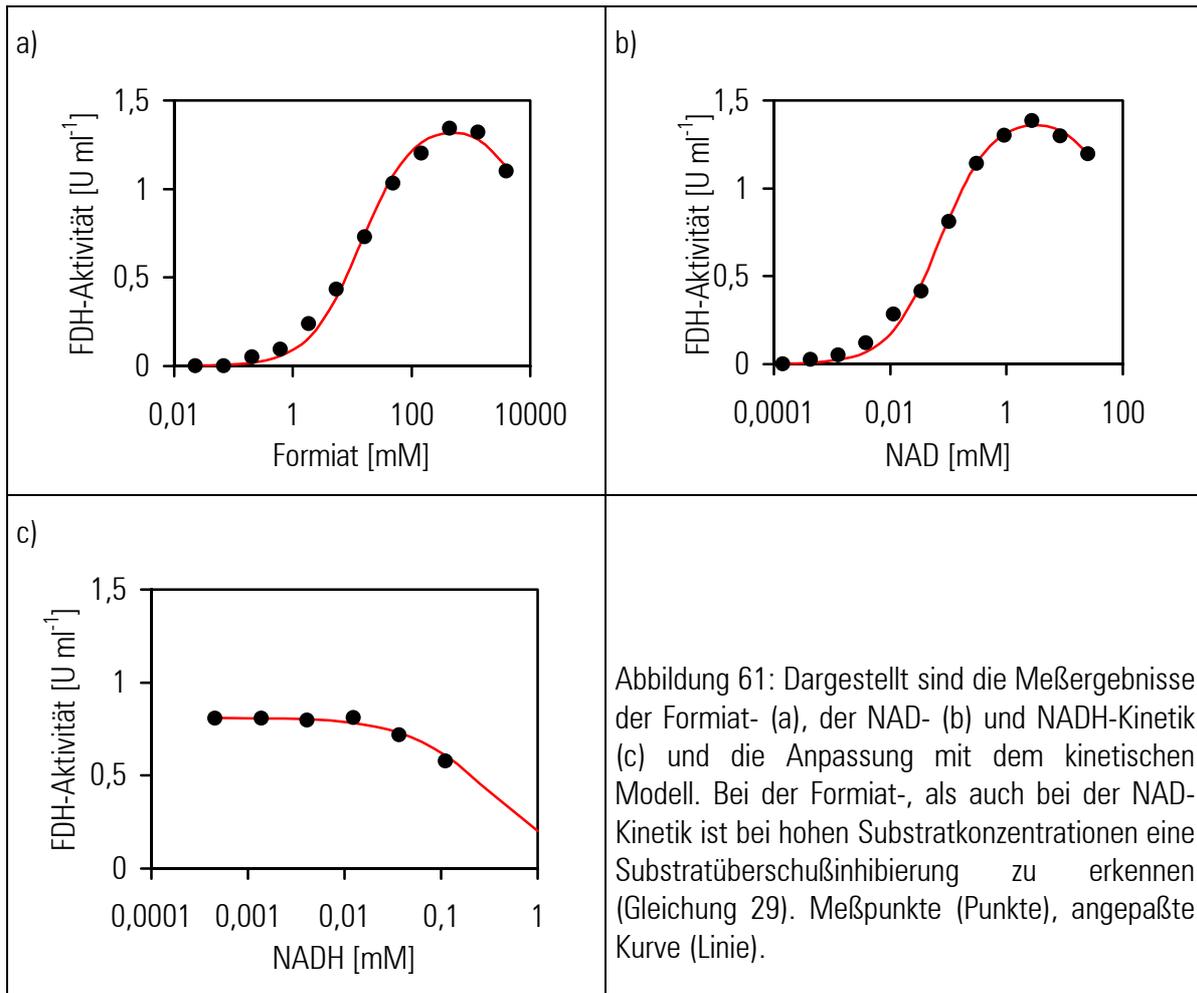


Abbildung 60: Darstellung des Aminosäureaustausches F285S in der *Pseudomonas sp.* 101-Struktur. Dargestellt ist eine Untereinheit mit gebundenem Cofaktor NAD und die Aminosäuren Phenylalanin 285 (oben) bzw. Serin 285 (unten). Der Substratkanal (S) liegt in der Mitte der Untereinheit und ist nach oben hin geöffnet. Zu erkennen ist, daß der Kanal von einem Deckel (D) abgeschlossen wird.



Damit ergibt sich für das $k_{cat}/(K_M \cdot K_M)$ -Kriterium der C23S/F285S-FDH der Wert von $6 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und er ist damit um den Faktor 2,3 kleiner als bei der C23S-FDH. D.h., die getroffenen Annahmen bezüglich der Erhöhung der Wechselzahl k_{cat} mit gleichzeitiger Erhöhung der Affinitätskonstanten K_M sind tatsächlich eingetreten.

5.3.3.3 Thermostabilität

Die Thermostabilität der C23S/F285S-FDH ist mit 51,6°C im Vergleich zum Templat C23S-FDH mit 51,7°C nicht verändert (Tabelle 34). Der Austausch des Phenylalanins zum Serin hat somit keinen Einfluß auf die Konformationsstabilität.

Tabelle 33: Vergleich der kinetischen Parameter der C23S-FDH und der C23S/F285S-FDH. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte bei 30°C. Von H. Slusarczyk bestimmt (*) [Slusarczyk, 1997]; nicht bestimmt (n.b.).

Parameter	C23S-FDH	C23S/F285S-FDH
V_{max}	5,5 U mg ⁻¹	9,1 U mg ⁻¹
k_{cat}	3,7 s ⁻¹	6,1 s ⁻¹
K_M Formiat	6 mM*	14 mM
K_M NAD	45 μM*	73 μM
K_i NADH	17 μM*	22 μM
K_i Formiat	n.b.	17 M
K_i NAD	n.b.	140 mM
$k_{cat}/(K_M \cdot K_M)$	$1,4 \cdot 10^7$ s ⁻¹ M ⁻¹ M ⁻¹	$6 \cdot 10^6$ s ⁻¹ M ⁻¹ M ⁻¹

5.3.4 Weitere Verbesserung der spezifischen Aktivität

Ausgehend von der C23S/F285S-FDH als Templat, wurde eine erneute Genbibliothek mit Hilfe der Error-Prone PCR, mit einer Mutationsrate von 1 – 2 Aminosäureaustauschen, durchgeführt und ca. 30.000 Klone im qualitativen Screening untersucht. Davon wurden ca. 300 aktive Klone, die eine deutliche Hofbildung aufwiesen, isoliert und im quantitativen Screening weiter untersucht. Die vier aktivsten Klone wurden isoliert und anschließend charakterisiert.

Keiner dieser vier Klone exprimiert mit 6,4 – 7,0 U mg⁻¹ ein FDH-Mutein mit einer höheren spezifischen Aktivität als das Templat C23S/F285S-FDH.

5.4 Diskussion

Soweit literaturbekannt, ist bisher noch nicht versucht worden, die spezifische Aktivität eines Enzyms während eines Screenings bei der gerichteten Evolution zu messen, um damit gezielt nach katalytisch aktiveren Muteinen suchen zu können. Bisher wurde beim Screening die Volumenaktivitäten bestimmt und die Proteinexpression des Zielproteins in allen Klonen als konstant angesehen. Mit dieser Vorgehensweise können jedoch nur signifikante Änderungen bezüglich der spezifischen Aktivität erkannt werden, wie sie bei der Suche nach aktiveren Klonen mit unnatürlichen Substraten oder in organischen

Tabelle 34: T_{50} -Werte der C23S/F285S-FDH und des Templats C23S-FDH.

Formiatdehydrogenase	T_{50} -Wert (20 min) [°C]
C23S	51,7
C23S/F285S	51,6

Lösungsmitteln zu erwarten sind, da hier die Ausgangsaktivitäten sehr gering sind und kleine Verbesserungen sich deshalb gleich in mehreren Größenordnungen bemerkbar machen [Kuchner & Arnold, 1997; Arnold, 2001].

Die FDH ist jedoch ein, auf seine zu katalysierende Reaktion hin optimiertes Enzym und große Verbesserungen durch wenige Aminosäureaustausche sind folglich nicht zu erwarten. Daher war es nötig, eine Screening-Methode zu entwickeln, bei der die zu erwartenden geringen Verbesserungen der spezifischen Aktivität der Klone zuverlässig während des Screenings bestimmt werden können.

Das entwickelte qualitativen Screening erlaubt es, auf einer Agarplatte den Phänotyp zu erkennen und gleichzeitig den Genotyp isolieren zu können. Mit diesem High-Throughput-Screening ist das Durchmustern von Mutantenbibliotheken mit bis zu 10^6 Klonen möglich, ganz im Gegensatz zu den beschriebenen Verfahren auf Nitrozellulose, bei denen nur relativ kleine Bibliotheken durchmustert werden können und eine Master-Platte notwendig ist [Allen & Holbrook, 2000].

Mit dem entwickelten quantitativen Screening kann die spezifische Aktivität der FDH-Muteine bestimmt werden. Dies erfolgt nach Affinitätsadsorption durch Bestimmung der Volumenaktivität und der Proteinkonzentration.

Obwohl eine durchschnittliche Mutationsrate von ca. 7 Aminosäureaustauschen pro Gen (1095 bp) eingestellt wurde, führte letztlich ein einziger Aminosäureaustausch (F285S), der bei allen vier sequenzierten Muteinen gefunden wurde, zu einer verbesserten Aktivität. Die gleiche Beobachtung wurde bei der TEM-1 β -Lactamase gemacht, obwohl hier noch höhere Mutationsraten (10 – 30 Austausch/1.000 Nukleotide) eingestellt wurden [Zaccolo & Gherardi, 1999]. Bei fast allen Muteinen fand ein G238S-Austausch statt. Erst in den nachfolgenden Selektionsrunden führten gleichzeitig mehrere Austausche zu einer Verbesserung. Bei beiden Enzymen scheint sich der erste, dominante Einfluß eines Austausches bemerkbar zu machen.

Bei der *Bacillus subtilis* *p*-Nitrobenzylesterase wurde die Thermostabilität signifikant mit einem Anstieg des T_m -Wertes um 14°C erhöht, ohne daß es zu einer Erniedrigung der

spezifischen Aktivität bei Raumtemperatur kommt. Bisher war man davon ausgegangen, daß eine erhöhte Thermostabilität eine gleichbleibende katalytische Aktivität bei niedrigen Temperaturen ausschließt [Giver *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2001]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß der Umkehrschluß auch nicht zutrifft. Die spezifische Aktivität der C23S-FDH wurde um den Faktor 1,7 erhöht, der T_{50} -Wert ist jedoch im Vergleich zum Templat mit 51,6°C nahezu unverändert. Beide Beispiele zeigen, daß die Aktivität und die Stabilität eines Enzyms dementsprechend nicht miteinander korreliert zu sein scheinen.

Die vier besten Klone, die aus dem quantitativen Screening hervorgingen, weisen unterschiedliche stille Mutationen auf. Gemeinsam ist ihnen aber, daß sie einen F285S-Austausch besitzen. Daß vier mal der gleiche Austausch – selbe Position, selbe Aminosäure – in verschiedenen Klonen gefunden wird ist ungewöhnlich und deutet auf eine für die Katalyse wichtige Position hin, wie auch der Umstand, daß das Phenylalanin 285 in einer hochkonservierten Region, die Aminosäuren im aktiven Zentrum aufweist, liegt (Tabelle 32). Um diese Position weiter zu untersuchen, könnte eine Sättigungsmutagenese durchgeführt werden.

Eine zweite Generation, mit der C23S/F285S-FDH als Templat, bei der 30.000 Klone gescreent wurden, brachte kein Mutein mit einer weiter verbesserten spezifischen Aktivität hervor. D.h., die Erhöhung der spezifischen Aktivität der FDH ist mit einzelnen Aminosäureaustauschen nur schwer durchzuführen. Möglicherweise könnten mit Hilfe des DNA-Family-Shufflings mit homologen Dehydrogenasen, welches die natürliche Rekombination durch die homologe *in vitro*-Rekombination von Genen imitiert, weitere Verbesserungen erzielt werden [Cramer *et al.*, 1998].

6 Zusammenfassung

6.1 Motivation und Zielsetzung

Die Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* wird zur *in situ*-Regenerierung des Cofaktors NAD in der industriellen Biokatalyse eingesetzt [Kula & Wandrey, 1987; Liese *et al.*, 2000]. In dieser Arbeit sollten weitere Möglichkeiten untersucht werden, die FDH für die Anwendung in der organischen Chemie zu optimieren, wie die vereinfachte Herstellung des Katalysators (*Produktion und Aufarbeitung*), die Erhöhung der Prozeßstabilität (*Stabilitätsuntersuchungen*) und die Verbesserung der katalytischen Aktivität (*Erhöhung der spezifischen Aktivität*).

6.2 Produktion und Aufarbeitung

6.2.1 Produktion

Für Anwendungen in größerem Maßstab sollte die FDH in ausreichenden Mengen verfügbar sein. Gegenwärtig wird die kommerziell erhältliche NAD-abhängige FDH hauptsächlich mit Hilfe der Hefe *Candida boidinii* gewonnen, mit ihr kann eine Raum-Zeit-Ausbeute an FDH von $150 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt werden [Weuster-Botz & Wandrey, 1995]. Zu diesem Verfahren existiert ein geeignetes Aufarbeitungsverfahren [Kroner *et al.*, 1982 a; Kroner *et al.*, 1982 b; Cordes & Kula, 1986].

Im Vergleich zu dem bisherigen FDH-Produktionsverfahren zeichnet sich die in dieser Arbeit entwickelte rekombinante Produktion der FDH in *Escherichia coli* mittels Hochzelldichtekultivierung durch eine hohe Produktivität von $1.600 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ aus (Tabelle 35). Die entwickelte Hochzelldichtekultivierung besitzt damit gegenüber dem bisher besten Verfahren eine um 1.100% gesteigerte Produktivität.

Tabelle 35: Raum-Zeit-Ausbeuten an FDH der Kultivierungsverfahren mit der Hefe *Candida boidinii* von Weuster-Botz [Weuster-Botz *et al.*, 1994; Weuster-Botz & Wandrey, 1995] und der in dieser Arbeit neuentwickelten rekombinanten Produktion in *Escherichia coli* mittels Hochzelldichtekultivierung im Vergleich.

Produktionsverfahren	FDH-Raum-Zeit-Ausbeute [U l ⁻¹ h ⁻¹]
Weuster-Botz <i>et al.</i> , 1994	100
Weuster-Botz & Wandrey, 1995	150
neuentwickeltes Verfahren	1.600

Die höchsten erzielten Konzentrationen an exprimiertem rekombinanten Protein in Hochzelldichtekultivierungen liegen in einem Bereich von 5 – 7 g l⁻¹ (Tabelle 36). Durch langjährige Optimierung ist es gelungen, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem 19 g l⁻¹ an rekombinatem Protein hergestellt werden können [Strandberg *et al.*, 1994]. Im Vergleich dazu zählt die in dieser Arbeit entwickelte rekombinante FDH-Produktion mittels Hochzelldichtekultivierung mit einer Konzentration von 6,0 g l⁻¹ an rekombinatem Protein zu den produktivsten der bisher beschriebenen Verfahren.

Tabelle 36: Produktivste beschriebene Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine in *Escherichia coli* im Vergleich [Lee, 1996 (1); Shin *et al.*, 1997 (2); Lim & Jung, 1998 (3); Schmidt *et al.*, 1999 (6); Choi *et al.*, 2000 (7)].

Protein	Proteinkonzentration [g l ⁻¹]	Ref.
ProteinA- β -Galactosidase	19,2	1
Interferon- γ	7,4	3
Humanes Mini-Proinsulin	7,0	2
<i>Bacillus thuringiensis</i> -Toxin	6,6	1
<i>Candida boidinii</i>-Formiatdehydrogenase	6,0	-
Humanes Proapo A-I	6,0	1
Humanes α -Konsensus-Interferon	5,6	1
Alkalische Phosphatase	5,2	7
Humanes Insulin	4,5	6

6.2.2 Aufarbeitung

Das Aufarbeitungsprotokoll für die FDH aus *Candida boidinii* [Kroner *et al.*, 1982 a; Kroner *et al.*, 1982 b; Weuster-Botz *et al.*, 1994] konnte an die rekombinante Hochzelllichtproduktion in *Escherichia coli* JM105 adaptiert und Vereinfachungen bzw. Verbesserungen verwirklicht werden. Zum einen konnte auf die Hitzedenaturierung verzichtet werden, zum anderen ein höherer Reinheitsgrad mit dem Chromatographieschritt erzielt werden. Statt einer Reinheit mit dem bisherigen Verfahren von 30 – 50% konnten mit dem adaptierten Verfahren nun 60 – 80% mit einer Ausbeute von 70% erreicht werden.

Darüber hinaus wurde ein neues Verfahren entwickelt, welches sich durch weitere Vereinfachungen in der Aufarbeitung auszeichnet. Sowohl die Zellseparation nach der Kultivierung, als auch der mechanische Zellaufschluß fallen hier weg. Statt dessen werden die Zellen direkt in der Kultivierungslösung mit PEG 400 aufgeschlossen. Somit werden die Geräte Separator bzw. Homogenisator nicht mehr benötigt (Tabelle 37). Dies führt einerseits zu einer wesentlich verkürzten Aufarbeitungsdauer und andererseits zu einem geringeren Geräteeinsatz.

Die Abtrennung der Zellbruchstücke in dem neuentwickelten Verfahren erfolgt durch Extraktion mit einem 2-Phasen-System. An Stelle des Chromatographieschrittes wurde eine einfache PEG-Fällung etabliert. Von Vorteil ist hier die verkürzte Aufarbeitungsdauer, da bisher vor bzw. nach dem Chromatographieschritt zeitaufwendige Ultrafiltrationsschritte nötig waren. Nach dieser Aufarbeitung lag die FDH zu 30 – 40% gereinigt vor und es konnten Ausbeuten von 62% erzielt werden.

Tabelle 37: Vergleich des *Candida boidinii*-, des adaptierten und des neuentwickelten Verfahrens.

Grundoperation	<i>Candida boidinii</i> - Verfahren	Adaptiertes Verfahren	Neues Verfahren
Zellaufschluß	Mechanisch mit Kugelmühle/ Homogenisator	Mechanisch mit Kugelmühle/ Homogenisator	PEG-Aufschluß
Proteinreinigung	Hitzedenaturierung	-	-
Zellabtrennung	2-Phasen-System	2-Phasen-System	2-Phasen-System
PEG-Abtrennung	2-Phasen-System	2-Phasen-System	-
PEG-Abtrennung	Ultrafiltration	Ultrafiltration	-
Proteinreinigung	Chromatographie	Chromatographie	PEG-Fällung
Volumenreduktion	Ultrafiltration	Ultrafiltration	-

6.3 Stabilitätsuntersuchungen

Für die Anwendung der Enzyme in technischen Verfahren ist es wichtig, daß sie u.a. eine hohe Stabilität unter Prozeßbedingungen, d.h. physiologisch unüblichen Bedingungen, wie hohe Temperaturen, extreme pH-Werte und Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln, Detergentien und Oxidantien, aufweisen.

Aufgrund der großen Sequenzhomologie zwischen der *Candida boidinii*-FDH und anderer, bereits kristallisierter Dehydrogenasen, wurde eine Homologiemodellierung der Struktur der *Candida boidinii*-FDH durchgeführt. Anhand dieses Modells konnte die Lage der Cysteine untersucht werden, welche in den Mutanten zum Teil oder vollständig durch andere Aminosäuren ersetzt sind. Das Cystein 262 liegt nach diesem Modell zwar an der Oberfläche des Enzyms, die Seitenkette mit dem Schwefelatom zeigt allerdings ins Proteininnere und ist somit der Oxidation nicht zugänglich, solange das Protein gefaltet vorliegt. Dagegen liegt das Cystein 23 nach dem Homologiemodell tatsächlich an der Oberfläche des Enzyms und kann deswegen leicht oxidiert werden.

Es wurde die Konformationsstabilität, d.h. die physikalische Stabilität in Form der Thermoinaktivierung gemessen und die Halbwertszeiten der Cystein-defizienten FDH-Muteine bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß die WT-FDH das thermostabilste Enzym, gefolgt von der C23S-FDH ist (Tabelle 38).

Mit Hilfe von Wasserstoffperoxid wurde die Anfälligkeit der FDH-Muteine gegenüber der Oxidation zur Sulfin- bzw. Sulfonsäure untersucht. Es zeigte sich, daß die WT- und die C262V-FDH weniger stabil als die C23S-, C23S/C262V- und C23S/C262A-FDH sind (Tabelle 38). Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Vorhersagen des Homologiemodells überein. Die WT- und die C262S-FDH besitzen an ihrer Oberfläche das leicht zugängliche Cystein 23 und können so schnell oxidiert und damit inaktiviert werden. Bei den übrigen

Tabelle 38: Vergleich der physikalischen und der chemischen Stabilität der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine sowie ihrer katalytischen Aktivität.

Formiatdehydrogenase	$t_{1/2}$ [min]			k_{cat} [s^{-1}]
	50°C	H ₂ O ₂	Cu ²⁺	
WT	281	3,3	38	4,2
C23S	42	7,3	657	3,7
C262V	13	2,4	20	3,8
C23S/C262V	3	6,9	68	3,3
C23S/C262A	8	7,8	155	3,4

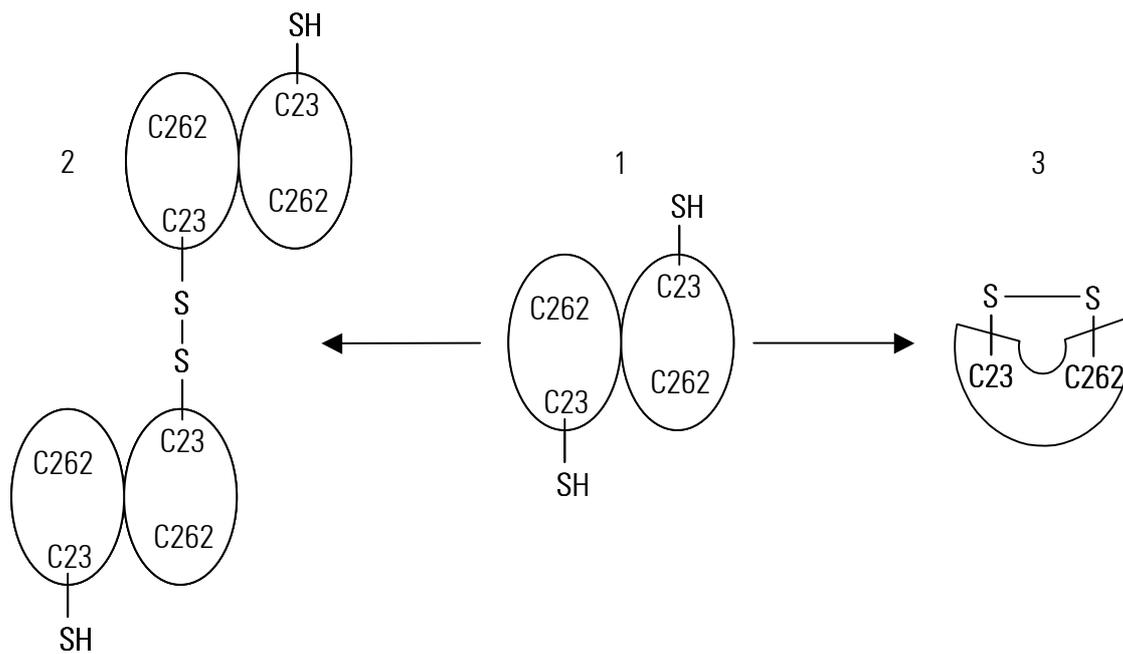


Abbildung 62: Inaktivierungsprozesse bei der FDH. Das native Homodimer der FDH (1) kann über die Cysteine 23 durch intermolekulare Disulfidbrücken kovalent verbunden werden (2). Andererseits kann ein entfaltetes Monomer der FDH durch intramolekulare Disulfidbrücken verbunden werden (3).

Muteinen ist das Cystein 23 durch ein Serin ersetzt und das im Proteininneren liegende Cystein 262 ist bei der C23S-FDH vor Oxidation geschützt oder bei den Doppelmutanten nicht mehr vorhanden. Auch die PAGE-Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse. Die Oxidation der WT- und der C262V-FDH konnte durch eine Bandenverschiebung im Gel nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, daß das an der Oberfläche des nativen Enzyms vermutete Cystein 23 der Oxidation zugänglich ist, nicht aber das im inneren liegende Cystein 262.

Die Einfachmutante C23S-FDH weist eine wesentlich höhere Stabilität gegenüber Kupfer(II)-Ionen als die WT-FDH auf, die Oxidation des Cystein 23 wird durch Kupfer(II)-Ionen katalysiert (Tabelle 38). Die Einfachmutante C262V-FDH dagegen besitzt eine ähnliche Stabilität gegenüber Kupfer(II)-Ionen wie die WT-FDH. Darüber hinaus können bei der WT- und C262V-FDH in der nativen PAGE kovalent gebundene Homodimere beobachtet werden, nicht aber bei den Muteinen mit C23S-Austausch (Abbildung 62). Auch diese Untersuchungen deuten darauf hin, daß das Cystein 23 an der Oberfläche des nativen Enzyms liegt und der Oxidation zugänglich ist, nicht aber das im inneren liegende Cystein 262.

Um den Inaktivierungsmechanismus der FDH unter Standardbedingungen zu untersuchen, wurde eine über ein Jahr gelagerte Enzymcharge verwendet. Hier konnte gezeigt werden, daß die in nativer Form als Homodimer vorliegende FDH zum Teil durch intramolekulare Disulfidbrückenbindung zu einem Homotetramer, welches über C23-C23-Disulfidbrücken kovalent verbunden ist, modifiziert wurde. Ein anderer Teil der FDH lag als Monomer in entfalteter Form, wahrscheinlich durch eine intermolekulare C23-C262-Disulfidbrücke verbunden, vor (Abbildung 62).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Einzelmutante C23S-FDH bezüglich der Oxidationsstabilität das Mutein mit den günstigsten Eigenschaften ist.

6.4 Erhöhung der spezifischen Aktivität

Die FDH aus *Candida boidinii* besitzt, wie alle bisher bekannten NAD-abhängigen FDHs mit 6 U mg^{-1} eine relativ geringe katalytische Aktivität. Dagegen sind NAD-abhängige Dehydrogenasen mit wesentlich höheren Wechselzahlen bekannt, wie z.B. die Leucindehydrogenase aus *Bacillus cereus* mit 340 U mg^{-1} [Ansorge & Kula, 2000 a].

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine FDH mit höherer katalytischer Aktivität mittels der Methode der gerichteten Evolution zu finden. Hinzu wurde ein High-Throughput-Screening entwickelt, mit dem aktive Klone mit Hilfe eines qualitativen Screenings (Ja/Nein-Selektion) detektiert werden können. Mit diesem Verfahren ist es möglich, den Phänotyp, d.h., aktive von nicht aktiven Klonen unterscheiden zu können und gleichzeitig den Genotyp von der Screening-Platte isolieren zu können. Damit kann die große Zahl inaktiver Klone, die durch die High-Frequency-Zufallsmutagenese bedingt ist, aussortiert werden, um nur die aktiven Klone dem quantitativen Screening zu unterziehen.

Im quantitativen Screening wurde die spezifische Aktivität der Muteine bestimmt. Dazu wird die FDH mit Hilfe der Affinitätsadsorption, bei der nur Nukleotid-bindende Proteine binden können, nahezu homogen gereinigt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wird die Volumenaktivität und die Proteinkonzentration der gereinigten FDH bestimmt.

Mit Hilfe dieser beiden Screening-Verfahren wurden ca. 200.000 Klone untersucht. Durch das qualitative Screening konnten ca. 1.500 aktive Klone isoliert werden, die dann im quantitativen Screening weiter untersucht wurden. Aus diesem quantitativen Screening ging eine aktivere Mutante hervor, die einen Austausch des Phenylalanins 285 zum Serin besitzt. Dieses Mutein besitzt eine 1,7-fach höhere Aktivität als das Templat C23S-FDH. Gleichzeitig sind die K_M - und K_I -Werte nahezu verdoppelt (Tabelle 39).

Tabelle 39: Kinetische Parameter des Templats C23S-FDH und der C23S/F285S-FDH. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte bei 30°C. Von H. Slusarczyk bestimmt (*) [Slusarczyk, 1997].

Parameter	C23S-FDH	C23S/F285S-FDH
V_{max}	5,5 U mg ⁻¹	9,1 U mg ⁻¹
k_{cat}	3,7 s ⁻¹	6,1 s ⁻¹
K_M Formiat	6 mM*	14 mM
K_M NAD	45 μM*	73 μM
K_i NADH	17 μM*	22 μM

Bisher war man davon ausgegangen, daß eine erhöhte Thermostabilität eine gleichbleibende katalytische Aktivität bei niedrigen Temperaturen ausschließt. Bei der *Bacillus subtilis* *p*-Nitrobenzylesterase jedoch wurde die Thermostabilität signifikant mit einem Anstieg des T_m -Wertes um 14°C erhöht, ohne daß es zu einer Erniedrigung der spezifischen Aktivität bei Raumtemperatur kommt [Giver *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2001]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß der Umkehrschluß auch nicht zutreffend ist. Die spezifische Aktivität der C23S-FDH wurde um den Faktor 1,7 erhöht, der T_{50} -Wert ist jedoch im Vergleich zum Templat mit 51,6°C nahezu unverändert. Beide Beispiele zeigen, daß die Aktivität und die Stabilität eines Enzyms nicht miteinander korreliert zu sein scheinen.

Eine zweite Generation, mit der C23S/F285S-FDH als Templat, bei der 30.000 Klone gescreent wurden, brachte kein Mutein mit einer weiter verbesserten spezifischen Aktivität hervor.

7 Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Geräte

Tabelle 40: Verwendete Geräte.

Verwendungszweck	Gerät
Bildverarbeitung	Eagle Eye II Videosystem, Stratagene (Amsterdam, NL)
Chromatographie	FPLC, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Elektrophorese	Protein-Elektrophoresekammer, Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D) DNA-Elektrophorese GNA 100, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Elektroporation	<i>E. coli</i> Pulser, Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Gefriertrocknung	Lyophile LyoVac GT3, Leybold Heraeus GmbH (Köln, D) Speed-Vac-Konzentrator Univapo 150H, UniEquip (München, D)
PCR	Primus 96 plus, MWG-Biotech AG (Ebersberg, D)
Spektroskopie	UV/VIS-Spektralphotometer 16 A, Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, D) UV/VIS-Spektralphotometer DU 650, Beckman Instruments GmbH (München, D) SpectraMax plus, Molecular Devices GmbH (München, D)
Thermostabilität	Robocycler, Stratagene (Amsterdam, NL)
3D-Visualisierung	Graphikkarte Gloria II und 3D-Brille Revelator, Elsa AG (Aachen, D)
Zellaufschluß	Desintegrator S, Bernd Euler Biotechnologie (Frankfurt a.M., D) Ultraschallstab Sonopuls HD60, Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, D) Schwingmühle, Retsch GmbH & Co. KG (Haan, D) Kugelmühle LME 0,5, Netsch GmbH (Selb, D)
Zellkultivierung	30 l-Bioreaktor, Infors AG (Bottmingen/Basel, CH)
Zentrifugation	Centrifuge 5415 C, Eppendorf AG (Hamburg, D) Centrifuge 5415 D, Eppendorf AG (Hamburg, D) Mikro 22 R, Hettich AG (Bäch, CH) Rotina 35 R, Hettich AG (Bäch, CH) Sorvall RC5B, Kendro Laboratory Products GmbH (Düsseldorf, D)

7.1.2 Chemikalien

Tabelle 41: Verwendete Chemikalien.

Art	Chemikalien
Chemikalien	die Chemikalien waren mindestens von p.a.-Qualität und stammen i.d.R. von: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, D) Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe, D) Merck Eurolab GmbH (Bochum, D) die Affinitätsadsorptionsmatrix rote Sepharose wurde von U. Reichert, Inst. f. Enzymtechnologie, zur Verfügung gestellt [Reichert <i>et al.</i> , 2001]
Kits	Alkalische Shrimps Phosphatase, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D) DNA-Marker (1 kb-Leiter), GibcoBRL Life Technologies GmbH (Karlsruhe, D) dNTPs, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D) Plasmid Präparation, Qiagen GmbH (Hilden, D) Restriktionsenzyme Eco RI und Pst I, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D) T4-DNA-Ligase, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D) <i>Taq</i> -DNA-Polymerase, GibcoBRL Life Technologies GmbH (Karlsruhe, D)
Mikroorganismen	<i>Escherichia coli</i> JM101, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D) <i>Escherichia coli</i> JM105, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Primer	pBTacF1 (5'-TGC CTG GCA GTT CCC TAC TC-3'), MWG-Biotech AG (Ebersberg, D) pBTacR1 (5'-GGT ATG GCT GTG CAG GTC GT-3'), MWG-Biotech AG (Ebersberg, D)
Vektor	pBTac2, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
Plasmide	pBTac2-FDH-Konstrukte WT-, C23S-, C262V-, C23S/C262V- und C23S/C262A-FDH wurden von H. Slusarczyk, Inst. f. Enzymtechnologie, zur Verfügung gestellt [Slusarczyk, 1997]

7.2 Methoden

7.2.1 Mikrobiologische Methoden

7.2.1.1 Stammhaltung

Zur Anzucht werden LB-Medium (1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl; mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt) und LB-Agarplatten (1,6% Agar, 1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl; mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt) verwendet. Zur Selektion wird dem LB-Medium, als auch den LB-Agarplatten Ampicillin (100 mg l⁻¹) nach dem Abkühlen auf unter 60°C zugegeben.

Zur Lagerung werden die *Escherichia coli* JM101- und *Escherichia coli* JM105-Zellen mit einem sterilen Zahnstocher von LB-Agarplatten abgenommen und über Nacht bei 37°C in einer 5 ml-Kultur mit LB-Medium angezogen. Die so gewonnene Bakterienkultur kann lagerungsfähig gemacht werden, indem zu 200 µl der Kultur 200 µl 87%iges (v/v)

Glycerin gegeben wird und das Aliquot anschließend bei -80°C eingefroren wird. Zur Weiterverwendung werden die Zellen nach dem Auftauen in LB-Medium im Schüttelkolben angezogen, anschließend auf LB-Agarplatten vereinzelt und bei 37°C über Nacht wachsen gelassen. Die bewachsenen LB-Agarplatten können bei 4°C mehrere Wochen gelagert werden.

7.2.1.2 Expression im Schüttelkolben

7.2.1.2.1 Herstellung

Die rekombinanten FDH-Gene werden im 0,2 l-Maßstab in *Escherichia coli* JM105, pBTac2 exprimiert. Dem verwendeten LB-Medium wurden zum Screening 100 mg l^{-1} Ampicillin zugesetzt (LB^{amp}-Medium) und mit 2 % (v/v) einer Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen werden dann im Schüttelkolben mit Schikanen bei 37°C und 120 rpm auf einem Reziproschüttler kultiviert und bei einer OD_{600} von 0,6 – 0,8 mit 1 mM IPTG induziert. Die Expressionsdauer beträgt ca. 15 h. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation (4.400 g, 15 min, 4°C) geerntet und bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

7.2.1.2.2 Zellaufschluß

Es wird zunächst eine 40%ige (w/w) Zellsuspension mit 100 mM KPi -Puffer hergestellt. Der Zellaufschluß kann mechanisch mittels Glasperlen ($\text{Ø } 0,3\text{ mm}$) durchgeführt werden. Dazu wird der Zellsuspension die doppelte Menge an Glasperlen zugegeben, der Aufschluß erfolgt dann je nach Volumen mit einer Schwingmühle, Retsch (1 – 2 ml) [Hummel *et al.*, 1989 b], durch Vortexen in einem Zentrifugenröhrchen (5 – 10 ml), im Desintegrator, B. Euler Biotechnologie (10 – 50 ml) oder mit der Kugelmühle LME 0,5, Netsch (bis 15 l). Bei kleinen Aufschlußvolumina ($< 1\text{ ml}$) können die Zellen auch mit einem Ultraschallstab, Bandelin, aufgeschlossen werden.

Nach dem Zellaufschluß wird die Zellsuspension bei 4°C zentrifugiert und der Überstand weiter verwendet.

7.2.2 Biochemische Methoden

7.2.2.1 Aktivitätsbestimmung

Die FDH katalysiert die Umsetzung von Formiat und NAD zu CO_2 und NADH. Die NADH-Bildung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden.

Die Zunahme der Extinktion wird bei 30°C über eine Minute verfolgt und die Aktivität mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes aus der Steigung berechnet (Gleichung 28). Wenn ein μmol NAD pro Minute zu NADH reduziert wird, entspricht dies der Aktivität von einem Unit (U).

$$A_v = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} \cdot f \quad (28)$$

Die Na-Formiat-Konzentration im Testansatz betrug 200 mM, die NAD-Konzentration 2 mM und die Kaliumphosphat-Konzentration 100 mM pH 7,5. Die Volumenaktivität der FDH kann in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 40 mU ml⁻¹ linear vermessen werden.

Bei der Aktivitätsbestimmung in der Küvette beträgt das Volumen des Assays 1 ml und das der Probe 33 μl , bei der Aktivitätsbestimmung in der Mikrotiterplatte werden zu 100 μl Assay-Volumen 100 μl Probe zugegeben.

7.2.2.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt photometrisch in 1 ml-Einmalküvetten nach Bradford [Bradford, 1976]. Anhand einer Eichgeraden mit BSA, Fraktion V, als Standard wird die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

7.2.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine

7.2.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgt im diskontinuierlichen System nach Laemmli [Laemmli, 1970] in einer vertikalen Gelelektrophorese-Kammer, teilweise unter denaturierenden (bei 95°C für 2 min) und/oder reduzierenden (DTT) Bedingungen durch die Natriumdodecylsulfat- (SDS-) Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).

Es wurden ausschließlich lineare Trenngele mit 6 – 12% (v/v) Acrylamid verwendet. Den Proben wird 2x Laemmli-Probenpuffer zugegeben und es werden 20 – 40 μl der Proben mit ca. 2 g Protein l⁻¹ aufgetragen. Die leeren Probetaschen werden mit entsprechendem Volumen an 2x Laemmli-Probenpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgt ca. 80 min bei

40 mA und 15°C. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine werden sie im Gel gefärbt.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts im Gel wird der Premixed Standard, Roche Diagnostics, verwendet.

7.2.2.3.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die native PAGE wird entsprechend der SDS-PAGE durchgeführt, jedoch ohne Zugabe von SDS.

7.2.2.3.3 Proteinfärbung im Gel

Zur Färbung werden die Gele in Coomassie Brillant Blue R-250-Lösung gelegt und für 30 min geschüttelt. Anschließend wird die Färbelösung abgegossen und die Entfärbelösung zugegeben. Die Gele werden mehrere Stunden entfärbt [Lämmli, 1970].

7.2.2.3.4 Aktivitätsfärbung im Gel

Die Aktivitätsfärbung im Gel wird modifiziert nach Gabriel [Gabriel, 1971] durchgeführt. Das Gel wird für 10 min in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5 gelegt und anschließend im Dunkeln gefärbt (100 mM KP_i -Puffer pH 7,5, 100 mM Na-Formiat, 0,8 mM NAD, 30 mg l^{-1} Phenazinthosulfat, 0,4 g l^{-1} Nitrotetrazoliumblau-Chlorid). Danach wird zur Entfernung überschüssiger Färbelösung das Gel 5 min mit Wasser gespült und die Proteinbanden anschließend durch Inkubation in 7,5%iger Essigsäure 15 min im Gel fixiert.

7.2.2.4 Proteinreinigung

7.2.2.4.1 Hitzedenaturierung

Zum zellfreien Rohextrakt wird 10% Na-Formiat gegeben und die Suspension für 5 min bei 50°C erwärmt, anschließend wird der Ansatz schnell auf 4°C abgekühlt. Danach werden die gefällten Proteine abzentrifugiert (5.000 g, 15 min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Die Probe wird anschließend mittels Gelpermeationschromatographie oder Ultrafiltration entsalzt.

7.2.2.4.2 Ionenaustauschchromatographie

Im analytischen Maßstab wird die FDH mittels Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF, Amersham Pharmacia Biotech, gereinigt. Nach Elution des Durchlaufs mit Puffer (10 mM KP_i -Puffer pH 7,5) wird der NaCl-Gradient (50 – 150 mM, 10 mM KP_i -Puffer pH 7,5) gestartet, die FDH eluiert dann bei ca. 120 mM. Die kontinuierliche Proteindetektion erfolgt bei 280 nm in einer Durchflußküvette. Die Säule wird mit 1 M NaCl und 1 M NaOH regeneriert, mit Puffer (100 mM KP_i -Puffer pH 7,5) gewaschen und in 20% (v/v) Ethanol gelagert.

Im präparativen Maßstab wird die FDH ebenfalls mittels Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF, Amersham Pharmacia Biotech, gereinigt. Hier allerdings wird nach dem Waschschrift (10 mM KP_i -Puffer pH 7,5) ein Stufengradient angewendet. Nach dem Durchlauf werden zunächst mit geringer NaCl-Konzentration (60 mM, 10 mM KP_i -Puffer pH 7,5) Fremdproteine abgetrennt und anschließend mit hoher NaCl-Konzentration (150 mM, 10 mM KP_i -Puffer pH 7,5) die FDH eluiert. Die kontinuierliche Proteindetektion erfolgt bei 280 nm in einer Durchflußküvette. Die Säule wird mit 1 M NaCl und 1 M NaOH, mit Puffer (100 mM KP_i -Puffer pH 7,5) gewaschen und in 20% (v/v) Ethanol gelagert.

7.2.2.4.3 Gelpermeationschromatographie

Zur schnellen Entsalzung von Probenvolumina bis 2,5 ml wird die Gelpermeationschromatographie verwendet. Dazu werden die käuflichen PD10-Säulen, Amersham Pharmacia Biotech, nach Vorschrift eingesetzt.

7.2.2.4.4 Farbstoff-Affinitätschromatographie

Die Farbstoff-Affinitätschromatographie wird mit der roten Sepharose (Procion Red HE-3B, Sigma-Aldrich Chemie, gebunden an Streamline AC, Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt [Kroner *et al.*, 1982 a; Kroner *et al.*, 1982 b; Reichert *et al.*, 2001]. Nach Binden der FDH (in 10 mM KP_i -Puffer pH 7,5) an den Farbstoff wird mit zehn Säulenvolumen Puffer (10 mM KP_i -Puffer pH 7,5) gewaschen und anschließend die FDH mit 10 mM NAD in einem Stufengradienten eluiert. Die Säule wird mit 1 M NaCl in 25% (v/v) Ethanol und anschließend mit 4 M Harnstoff in 0,5 M NaOH regeneriert, mit Puffer (100 mM KP_i -Puffer pH 7,5) gewaschen und in 20% (v/v) Ethanol gelagert.

7.2.2.4.5 Konzentrierung und Lagerung der Proteine

Die Enzymlösungen werden mittels Ultrafiltration bis maximal 20 g l^{-1} konzentriert, hierzu werden entweder das Schneckenmodul S1Y10, Amicon, oder das Zentrifugationsröhrchen Centricon, Amicon, beide mit einer Ausschlußgrenze von 10 kDa, verwendet. Die konzentrierten Enzymlösungen werden in 50% Glycerin bei -20°C gelagert.

7.2.2.5 Bestimmung der kinetischen Konstanten

7.2.2.5.1 Bestimmung der K_M -Werte

Für die Bestimmung der kinetischen Konstanten werden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Substrat- bzw. Cofaktor-Konzentration gemessen. Für die Bestimmung der K_M - und K_i -Werte wurde teilgereinigte FDH verwendet. Die Messungen erfolgen bei 30°C in 100 mM KPi -Puffer pH 7,5. Es wurden die Formiat-Kinetik (0 – 4 M Na-Formiat, 10 mM NAD), die NAD-Kinetik (0,5 M Na-Formiat, 0 – 25 mM NAD) und die NADH-Kinetik (20 mM Na-Formiat, 1 mM NAD, 0 – 0,1 mM NADH) gemessen.

Die FDH katalysiert eine Reaktion mit zwei Substraten und zwei Produkten in Form einer Ordered Bi-Bi-Kinetik (Gleichung 29). Die Substrate binden sequenziell, erst NAD (A), dann Formiat (B). Die Produkte werden ebenso geordnet vom Enzym freigesetzt, erst CO_2 (P), dann NADH (Q). Es liegt sowohl eine kompetitive Inhibition durch das NADH (Q), als auch Substratüberschußinhibitionen der beiden Substrate vor.

$$V = \frac{[A][B]}{\left([A] \left(1 + \frac{[A]}{K_{iS A}} \right) + K_{M A} \left(1 + \frac{[Q]}{K_{iK Q}} \right) \right) \left([B] \left(1 + \frac{[B]}{K_{iS B}} \right) + K_{M B} \right)} k_{cat} [E] \quad (29)$$

Mit den Substratüberschußinhibitionskonstanten $K_{iS A}$ für NAD, $K_{iS B}$ für Formiat und der kompetitiven Inhibitionskonstante $K_{iK Q}$ für das NADH kann die Parameteranpassung in Microsoft Excel unter Verwendung der Fehlerquadratsumme als Optimierungskriterium durchgeführt werden.

7.2.2.5.2 Bestimmung der maximalen Wechselzahl k_{cat}

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität V_{max} bzw. der maximalen Wechselzahl k_{cat} muß die FDH homogen gereinigt und die Reinigung im SDS-Gel anhand der

Proteinfärbung mit Coomassie Brillant Blue R-250 kontrolliert werden. Die Volumenaktivität wird bei 250 mM Na-Formiat und 2 mM NAD in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5 ermittelt, die Proteinkonzentration wird nach Bradford bestimmt. Durch Division der Volumenaktivität mit der Proteinkonzentration kann die spezifische Aktivität V_{max} [U mg^{-1}] berechnet werden. Die spezifische Aktivität V_{max} kann mit Hilfe des bekannten Molekulargewichtes eines FDH-Monomers von $40.370 \text{ g mol}^{-1}$ auf die Wechselzahl k_{cat} [s^{-1}] umgerechnet werden (Gleichung 21).

7.2.2.5.3 Bestimmung der maximalen Wechselzahl k_{cat} durch Titration der aktiven Zentren

Alternativ dazu kann der V_{max} -Wert auch durch Titration der aktiven Zentren ermittelt werden. Dazu wird die FDH (in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5) in einer Konzentration ca. 3 – 10 μM aktiven Zentren mit dem irreversiblen Inhibitor Procion MX-R, Sigma-Aldrich Chemie, inkubiert (3 h, 30°C) und anschließend die Volumenaktivität bestimmt. Die FDH muß bei dieser Methode nicht homogen rein vorliegen.

7.2.2.6 Bestimmung der Thermostabilität

7.2.2.6.1 Bestimmung des T_{50} -Wertes

Zur Bestimmung des T_{50} -Wertes wird die FDH-Lösung (in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5) auf eine Volumenaktivität von 1 U ml^{-1} in einem Volumen von 200 μl verdünnt, um gleiche Oberflächen-Volumen-Verhältnisse zu gewährleisten. Die Proben werden zwischen 42°C und 70°C für 20 min inkubiert, 15 min auf Eis gekühlt und anschließend die Volumenaktivität bei 30°C gemessen.

Als Optimierungsfunktion wird die integrierte Gauß'sche Normalverteilung verwendet. Die Parameteranpassung konnte in Microsoft Excel unter Verwendung der Fehlerquadratsumme als Optimierungskriterium durchgeführt werden. Der T_{50} -Wert entspricht dabei dem Mittelwert der Gauß'schen Normalverteilungsfunktion.

Zur Bestimmung des Inaktivierungsverhaltens in der PAGE wird die FDH-Lösung (in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5) auf eine Volumenaktivität von 1 U ml^{-1} in einem Volumen von 200 μl verdünnt, um gleiche Oberflächen-Volumen-Verhältnisse zu gewährleisten. Die Proben werden, wenn nicht anders angegeben, bei 50°C für 20 min inkubiert, 15 min auf Eis gekühlt, anschließend die Proben mit Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Bei den Untersuchungen unter reduzierenden Bedingungen wird 2% DTT zum Probenpuffer gegeben, die Probe für 30 sec bei 94°C erhitzt, auf Eis 5 min gekühlt und anschließend die Probe auf das Gel aufgetragen.

7.2.2.6.2 Bestimmung der Halbwertszeit

Zur Bestimmung der Halbwertszeit wird die FDH-Lösung (in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5) auf eine Volumenaktivität von 1 U ml^{-1} in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ verdünnt, um gleiche Oberflächen-Volumen-Verhältnisse zu gewährleisten. Die Proben werden bei der entsprechenden Temperatur inkubiert, dann alle 5 min Proben gezogen und sofort die Volumenaktivität bestimmt.

Bei logarithmischer Auftragung der Volumenaktivität kann durch lineare Regression die Steigung k bestimmt werden, mit der die Halbwertszeit $t_{1/2}$ berechnet werden kann (Gleichung 30).

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 2}{k} \quad (30)$$

7.2.2.7 Bestimmung der Oxidationsstabilität

7.2.2.7.1 Oxidationsstabilität gegenüber Kupfer(II)

Zur Bestimmung der Halbwertszeit bei Anwesenheit von Kupfer(II)-Ionen wird die FDH-Lösung (in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5) auf eine Volumenaktivität von 1 U ml^{-1} in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ verdünnt, um gleiche Oberflächen-Volumen-Verhältnisse zu gewährleisten. Den Proben wird $50 \mu\text{M CuCl}_2$ zugegeben, dann alle 5 min Proben gezogen und sofort die Volumenaktivität bestimmt. Die Berechnung der Halbwertszeit erfolgte mit Gleichung 30.

Zur Bestimmung des Inaktivierungsverhaltens in der PAGE wird die FDH-Lösung (in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5) auf eine Volumenaktivität von 1 U ml^{-1} in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ verdünnt, um gleiche Oberflächen-Volumen-Verhältnisse zu gewährleisten. Die Proben werden bei $50 \mu\text{M CuSO}_4$ für 20 min inkubiert, anschließend die Proben mit Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Bei den Untersuchungen unter reduzierenden Bedingungen wird 2% DTT zum Probenpuffer gegeben, die Probe für 30 sec bei 94°C erhitzt, auf Eis 5 min gekühlt und anschließend die Probe auf das Gel aufgetragen.

7.2.2.7.2 Oxidationsstabilität gegenüber H_2O_2

Zur Bestimmung der Halbwertszeit bei Anwesenheit von H_2O_2 wird die FDH-Lösung (in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5) auf eine Volumenaktivität von 1 U ml^{-1} in einem Volumen

von 200 μl verdünnt, um gleiche Oberflächen-Volumen-Verhältnisse zu gewährleisten. Den Proben wird 150 mM H_2O_2 zugegeben, dann alle 5 min Proben gezogen und sofort die Volumenaktivität bestimmt. Die Berechnung der Halbwertszeit erfolgte mit Gleichung 30.

Zur Bestimmung des Inaktivierungsverhaltens in der PAGE wird die FDH-Lösung (in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5) auf eine Volumenaktivität von 1 U ml^{-1} in einem Volumen von 200 μl verdünnt, um gleiche Oberflächen-Volumen-Verhältnisse zu gewährleisten. Die Proben werden bei 150 mM H_2O_2 für 20 min inkubiert, anschließend die Proben mit Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Bei den Untersuchungen unter reduzierenden Bedingungen wird 2% DTT zum Probenpuffer gegeben, die Probe für 30 sec bei 94°C erhitzt, auf Eis 5 min gekühlt und anschließend die Probe auf das Gel aufgetragen.

7.2.3 Methoden zur Produktion und Aufarbeitung

7.2.3.1 Produktion der Formiatdehydrogenase

7.2.3.1.1 Lösungen

7.2.3.1.1.1 Inokulum

Zur Kultivierung wird der rekombinante Mikroorganismus *Escherichia coli*, Stamm JM105, mit dem Vektor pBTac2-FDH, verwendet.

Die Zellen werden zunächst in 5 ml LB^{amp} -Medium über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler angezogen. Von dieser Kultur wird 1 ml abgenommen, zu 200 ml LB^{amp} -Medium gegeben und bis zu einer OD_{600} von 0,6 – 0,8 bei 37° C auf einem Schüttler wachsen gelassen. Diese Zellsuspension dient als Inokulum für die Hochzelldichtekultivierung.

7.2.3.1.1.2 Batch-Medium

Das Batch-Medium ist semi-definiert, d.h., es setzt sich aus einem definierten Anteil zusammen, mit einer Zugabe an nicht-definiertem Hefeextrakt (Tabelle 42).

7.2.3.1.1.3 Feed-Lösung

Auch die Feed-Lösung ist semi-definiert (Tabelle 43). Um zu verhindern, daß die Salze ausfallen, muß die Feed-Lösung auf 4°C gekühlt werden.

Tabelle 42: Zusammensetzung des Batch-Mediums. *) 6 g l⁻¹ Glucose für normalen Fed-Batch, 2 g l⁻¹ Glucose für neuentwickelten Fed-Batch. ¹⁾ im Fermenter autoklavieren, ²⁾ autoklavieren, ³⁾ sterilfiltrieren, ⁴⁾ ist autosteril.

Lösung	Zusammensetzung	Konzentration [g l ⁻¹]
HZD-Basis ¹⁾ pH 6,9	NH ₄ Cl	0,2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2
	KH ₂ PO ₄	13
	K ₂ HPO ₄	10
	NaH ₂ PO ₄ · 1 H ₂ O	6
Glucose ²⁾	Glucose · 1 H ₂ O	*)
MgSO₄ ²⁾	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1
Hefeextrakt ²⁾	Hefeextrakt	3
Na₂-EDTA ³⁾	Na ₂ -EDTA · 2 H ₂ O (Titriplex III)	0,0093
Vitamin 428 (DSM) ³⁾	Riboflavin (Vit. B ₂)	0,0005
	Thiamin-HCl (Vit. B ₁)	0,05
	Nicotinsäure	0,0025
	Pyridoxin-HCl (Vit. B ₆)	0,0025
	Ca-Panhotenat	0,0025
	Biotin	0,000005
	Folsäure	0,00001
Cyanocobalamin (Vit. B ₁₂)	0,00005	
Spurenelemente ⁴⁾ in 5 M HCl	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,04
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,002
	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,001
	MnSO ₄ · 1 H ₂ O	0,01
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,007
	H ₃ BO ₃	0,0005
	AlCl ₃ · 6 H ₂ O	0,01
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,002
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,04
	Thiamin ³⁾	Thiamin-HCl (Vit. B ₁)
Ampicillin ³⁾	Ampicillin	0,1
Antischaum ¹⁾	Antifoam 289, Sigma-Aldrich Chemie	0,3 ml l ⁻¹

7.2.3.1.1.4 Induktionslösung

Es wird mit einer Konzentration von 1 mM IPTG induziert, d.h., die Induktionslösung muß für das aktuelle Volumen berechnet werden, da zum Induktionszeitpunkt neben den 10 l Batch-Medium schon ca. 1 l an Korrekturmitteln und Feed-Lösung zugepumpt wurde. Das IPTG kann in einem Volumen von ca. 30 ml gelöst werden und wird sterilfiltriert.

Tabelle 43: Zusammensetzung der Feed-Lösung. ²⁾ autoklavieren, ³⁾ sterilfiltrieren, ⁴⁾ ist autosteril.

Lösung	Zusammensetzung	Konzentration [g l ⁻¹]
HZD-Basis ²⁾	NH ₄ Cl	0,2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2
	KH ₂ PO ₄	13
	K ₂ HPO ₄	10
	NaH ₂ PO ₄ · 1 H ₂ O	6
Glucose ²⁾	Glucose · 1 H ₂ O	600
MgSO ₄ ²⁾	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	12
Hefeextrakt ²⁾	Hefeextrakt	18
Vitamin 428 (DSM) ³⁾	Riboflavin (Vit. B ₂)	0,0005
	Thiamin-HCl (Vit. B ₁)	1,05
	Nicotinsäure	0,0025
	Pyridoxin-HCl (Vit. B ₆)	0,0025
	Ca-Panthenat	0,0025
	Biotin	0,000005
	Folsäure	0,00001
Spurenelemente ⁴⁾	Cyanocobalamin (Vit. B ₁₂)	0,00005
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,04
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,002
	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,001
	MnSO ₄ · 1 H ₂ O	0,01
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,007
	H ₃ BO ₃	0,0005
	AlCl ₃ · 6 H ₂ O	0,01
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,002
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,04

7.2.3.1.2 Kultivierung

7.2.3.1.2.1 Fermenterausstattung

Die Hochzelldichtekultivierung der *Escherichia coli* JM105-Zellen mit dem Plasmid pBTac2-FDH zur Produktion der FDH wird in einem 30 l-Fermenter, Infors, durchgeführt. Der Batch wird in einem Volumen von 10 l durchgeführt und anschließend werden ca. 4 – 7 l Feed-Lösung in der Fed-Batch-Phase zugepumpt.

7.2.3.1.2.2 Temperatur-Regulation

Die Temperatur wird auf 30°C während der gesamten Kultivierung geregelt.

7.2.3.1.2.3 Druck-Regulation

Zur Messung des Druckes wird eine Drucksonde verwendet. Der Fermenter wird mit maximal 1,2 bar Überdruck betrieben.

7.2.3.1.2.4 pH-Wert-Regulation

Der pH-Wert wird auf 6,9 während der gesamten Kultivierung geregelt. Anhand der Messung des pH-Wertes mittels pH-Meter erfolgt die Regulation des pH-Wertes durch Zupumpen der Korrekturmittel. Als Säure wird 3 M Phosphorsäure (autoklaviert) und als Lauge wird 25% Ammoniaklösung (autosteril) verwendet. Die Ammoniaklösung muß während der Kultivierung gekühlt werden, da ansonsten der Ammoniak im Zuleitungsschlauch ausgast. Der Schlauch kann dann nicht richtig am Pumpenkopf durch die Walzen gequetscht werden und bei angelegtem Überdruck wird Luft aus dem Fermenter zurück in die Ammoniakflasche gedrückt.

7.2.3.1.2.5 pO₂-Wert-Regulation

Die Sauerstoffsättigung wird während der gesamten Kultivierung auf 30% geregelt. Stellgrößen sind die Rührerdrehzahl, Belüftungsrate und Überdruck (Tabelle 13). Die Eichung der pO₂-Sonde erfolgt beim 100%-Wert durch Einstellen der maximalen Rührerdrehzahl und Belüftungsrate. Beim 0%-Wert erfolgt sie durch Begasung mit Stickstoff, bis der Meßwert stabil bleibt.

7.2.3.1.3 Zufütterungsstrategie

7.2.3.1.3.1 Fed-Batch

Zunächst wird der Fermenter mit dem Batch-Medium gefüllt, angeimpft und nach Verbrauch der Glucose, der Nachweis erfolgt mit Glucose-Teststreifen, die exponentielle Zufütterung gestartet. Die allgemeine Massenbilanz lautet:

$$m_S(t) = F(t) S_F(t) \quad (31)$$

Wenn davon ausgegangen wird, daß die Substratkonzentration in der Feed-Lösung konstant ist, kann die exponentielle Zufütterung wie folgt berechnet werden:

$$F(t) = \frac{1}{S_F} \left(\frac{\mu}{y_{X/S}} + m \right) X(t_0) V(t_0) \exp[\mu (t - t_0)] \quad (32)$$

Da der Erhaltungsstoffwechselkoeffizient m bei *Escherichia coli* mit Glucose als Substrat mit $0,025 \text{ g Glucose g}^{-1} \text{ Biomasse h}^{-1}$ sehr klein ist [Korz *et al.*, 1995], kann dieser Term vernachlässigt werden:

$$F(t) = \frac{\mu}{S_F y_{X/S}} X(t_0) V(t_0) \exp[\mu (t - t_0)] \quad (33)$$

Um die Bestimmung der Trockenbiomassekonzentration beim Start der Zufütterung zu vermeiden, kann die aktuelle Biomassekonzentration aus der zum Batch-Medium zugegebenen Glucose-Menge mit dem Ausbeutekoeffizienten berechnet werden:

$$X(t_0) = S_0 y_{X/S} \quad (34)$$

Damit ergibt sich folgender Term, der die Zufütterung beschreibt:

$$F(t) = \frac{S_0}{S_F} \mu V(t_0) \exp[\mu (t - t_0)] \quad (35)$$

7.2.3.1.3.2 Neuentwickelte Methode: Simulated Fed-Batch

Hier wird die Zufütterung schon mit Beginn der Inokulation gestartet. Die Zufütterungsstrategie ist jedoch identisch mit der des normalen Fed-Batches (Gleichung 35). Da bei dieser Methode die Zufütterung mit Beginn der Kultivierung gestartet wird, entfällt die Bestimmung der Glucose-Konzentration am Ende der Batch-Phase.

7.2.3.1.3.3 Induktionszeitpunkt

Es wird bei einer OD_{600} zwischen 60 und 70 mit IPTG induziert.

Tabelle 44: Zusammensetzung der Zellaufschlußlösung. In Klammern sind die Anteile, bezogen auf das 2-Phasen-System, angegeben. Die Zellsuspension stammt aus der Hochzelldichtekultivierung.

Zusammensetzung	Anteil [%] (w/w)
Zellsuspension (50 %ige Zellsuspension)	70 (43)
PEG 400	30 (18)

7.2.3.2 Aufarbeitung der Formiatdehydrogenase

7.2.3.2.1 Adaptierung des bestehenden Verfahrens

Die mittels Hochzelldichte-Kultivierung gewonnene rekombinante FDH kann im technischen Maßstab gereinigt werden. Das Aufarbeitungsprotokoll ist an das bestehende Protokoll angelehnt [Weuster-Botz *et al.*, 1994; Gieren]. Um den Aufarbeitungsprozeß jedoch zu vereinfachen und die Reinigung zu verbessern, wurde das Aufarbeitungsprotokoll folgendermaßen abgeändert:

Die 10%ige Formiat-Zugabe mit anschließender Hitzedenaturierung wird weggelassen, da hier keine Aufreinigung festgestellt werden konnte.

Die Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF, Amersham Pharmacia Biotech, wird dahingehend verändert, daß zunächst mit 60 mM NaCl (in 10 mM KP_i pH 7,5) Verunreinigungen von der Säule gewaschen werden und anschließend mit 120 mM NaCl (in 10 mM KP_i pH 7,5), anstatt mit 150 mM NaCl, die FDH eluiert wird.

7.2.3.2.2 Neues Verfahren

7.2.3.2.2.1 Zellaufschluß

Der Zellsuspension aus der Hochzelldichtekultivierung wird PEG 400 zugegeben, gut durchmischt und für 2 h bei 37°C inkubiert (Tabelle 44). Die Aufschlußlösung wird alle halbe Stunde einmal etwas durchmischt.

7.2.3.2.2.2 2-Phasen-System

Nach dem Zellaufschluß wird die Aufschlußlösung auf 20°C abgekühlt und Wasser und K_2HPO_4 zugegeben (Tabelle 45). Das Salz sollte sich ganz gelöst haben und die Lösung wieder auf 20°C abgekühlt sein. Anschließend wird PEG 1550 zugeben und die Lösung

Tabelle 45: Zusammensetzung des 2-Phasen-Systems. pH-Wert des Phasen-Systems: 8,5. Anteile aus dem PEG-Aufschluß (*). Die Zellsuspension stammt aus der Hochzelldichtekultivierung.

Zusammensetzung	Anteil [%] (w/w)
Zellsuspension (50 %ige Zellsuspension)	43*
PEG 400	18*
H ₂ O	21
K ₂ HPO ₄	5
PEG 1550	7
NaCl	6

solange stehen gelassen, bis die Temperatur wieder 20°C beträgt. Danach wird NaCl zugeben und eine halbe Stunde bei 20°C gerührt. Nach ca. 2 Stunden hat sich das Phasen-System vollständig getrennt.

7.2.3.2.2.3 PEG-Fällung

Das PEG 6000 wird in Wasser durch Erwärmen gelöst (Tabelle 46). Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die PEG 6000-Lösung zur Oberphase des Phasen-Systems gegeben und kurz durchmischt. Nach 2 bis 3 Stunden kann das sedimentierte Protein abzentrifugiert oder abfiltriert werden.

7.2.3.2.2.4 Gefriertrocknung und Lagerung

Das gefällte Protein kann im gefällten Zustand ohne Aktivitätsverluste bei -20°C eingefroren werden.

Vor der Gefriertrocknung der FDH wird auf 1 Teil gefälltes Protein 1 Teil (v/v) Wasser gegeben und durchmischt. Durch das Lyophilisieren treten ca. 10% Aktivitätsverlust auf.

Tabelle 46: Zusammensetzung des Fällungssystems.

Zusammensetzung	Anteil [%] (w/w)
Oberphase des 2-Phasen-Systems	70
H ₂ O	10
PEG 6000	20

Tabelle 47: Zusammensetzung des Error-Prone PCR-Ansatzes.

Anteil	Zusammensetzung
10 μ l	10x Mutagenese-Puffer (70 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl, 0,1% (w/v) Gelatine, 100 mM Tris-HCl pH 8,3 bei 25°C)
10 μ l	10x Mutagenese-dNTP-Mix (2 mM dGTP und dATP, 10 mM dTTP und dCTP)
10 μ l	10x MnCl ₂ (5 mM MnCl ₂)
2 fmol	Templat-DNA (ca. 7,5 ng des 5,7 kb-Plasmids)
40 pmol	Downstream-Primer (pBTacF1)
40 pmol	Upstream-Primer (pBTacR1)
1 μ l	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U μ l ⁻¹)
ad 100 μ l	bidest. Wasser

7.2.4 Molekularbiologische Methoden

7.2.4.1 Herstellung der Genbibliothek

7.2.4.1.1 Berechnung der Schmelztemperatur der Primer

Die Schmelztemperatur eines Primers mit weniger als 25 Basenpaaren kann wie folgt abgeschätzt werden [Thein & Wallace, 1988]:

$$T_m = 2 n_{AT} + 3 n_{GC} \quad (36)$$

Für Primer-Längen von mehr als 13 Basen kann die Schmelztemperatur folgendermaßen bestimmt werden [Oligonukleotid-Protokoll, MWG Biotech]:

$$T_m = 0,41 c_{GC} + 69,3 - \frac{650}{l_p} \quad (37)$$

7.2.4.1.2 Bedingungen der Error-Prone PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur Herstellung der Error-Prone PCR-Bibliotheken verwendet. Als Templat diente in der ersten Runde das Plasmid C23S-FDH-pBTac2, in der zweiten das Plasmid C23S/F285S-FDH-pBTac2, mit den Primern pBTacF1 und pBTacR1 (Tabelle 47). Die PCR wird mit Hilfe des Thermo-Cyclers Primus 96 plus, MWG-Biotech, nach einem Programm mit insgesamt 27 Zyklen durchgeführt (1 x (5 min, 94°C),

25 x (1 min, 94°C, 1 min, 50°C, 1 min, 72°C), 1 x (5 min, 94°C)). Um eine hohe Mutationsrate zu erzielen, wird nach der ersten PCR 1 µl PCR-Produkt entnommen und in einer zweiten PCR anstatt des Templats eingesetzt, um weiter mutagenisiert zu werden. Die Reinigung des PCR-Produktes erfolgt mit dem QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, oder mit Hilfe eines präparativen Agarosegels.

7.2.4.2 Screening der Klone mit erhöhter Aktivität

7.2.4.2.1 Qualitatives Screening

7.2.4.2.1.1 Anzucht der Zellen

Die transformierten Zellen werden auf LB^{amp}-Agarplatten (Plattengöße: 24,5 x 24,5 cm, Merck Eurolab) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert, so daß die Kolonien einen Durchmesser von ca. 1 mm haben.

7.2.4.2.1.2 Fixierung der Kolonien und Zellaufschluß

Anschließend werden die Kolonien mit ca. 4 mm Agar (1,6% Agar, 100 mM KP_i pH 7,5, 0,2% Triton X-100, 10 mM EDTA) überschichtet. Die Agarlösung muß vor dem Überschichten auf eine Temperatur von unter 65°C abgekühlt sein. Nach dem Erstarren des Agars wird fünfmal mit Aufschlußlösung (100 mM KP_i pH 7,5, 0,2% Triton X-100, 10 mM EDTA) und fünfmal mit Waschlösung (100 mM KP_i pH 7,5) gewaschen (5 mm Flüssigkeitshöhe in den Platten).

7.2.4.2.1.3 Aktivitätsfärbung

Zur Färbung werden die Platten 2 mm hoch mit Färbelösung 1 (1,25 M Formiat, 0,2 g l⁻¹ Phenazinethosulfat, 2 g l⁻¹ Nitrotetrazoliumblau-Chlorid, 100 mM KP_i pH 7,5) überschichtet und 10 min im Dunkeln geschüttelt. Anschließend wird die Färbelösung 2 (50 mM NAD) in einem Verhältnis von 1 ml Färbelösung 2 pro 100 ml Färbelösung 1 zugegeben und im Dunkeln ca. 15 min geschüttelt, bis die Höfe deutlich zu erkennen sind.

Anschließend wird die Lösung abgeschüttelt, die Platten zweimal kurz mit Wasser gewaschen und zum Trocknen offen aufgestellt. Nachdem die Platten an der Oberfläche getrocknet sind, können die Klone mit sterilen Zahnstochern in 96-Well-Platten, die mit 200 µl LB^{amp}-Medium gefüllt sind, überführt werden. Die Anzucht dieser Zellen erfolgt über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler. Diese Platten dienen als Master-Platten für das folgende quantitative Screening.

7.2.4.2.2 Quantitatives Screening

7.2.4.2.2.1 Anzucht der Zellen

Zur Anzucht werden sterile 96 Deep-Well-Platten verwendet. Sie werden mit 1,2 ml LB^{amp}-Medium gefüllt und mit 50 µl Zellsuspension der Master-Platten angeimpft. Nach Inkubation von 4 h bei 37°C werden die Zellen mit 100 µl einer IPTG-Lösung (10 mM IPTG in LB^{amp}-Medium, sterilfiltriert) induziert und bei 30°C über Nacht geschüttelt.

7.2.4.2.2.2 Zellaufschluß

Die 96 Deep-Well-Platten werden anschließend zentrifugiert (1.600 g, 15 min, 20°C), der Überstand abgossen, 100 µl Aufschlußlösung (0,2% Triton X-100, 10 mM KP_i pH 7,5, 10 mM EDTA) zugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach werden 500 µl Pufferlösung (10 mM KP_i pH 7,5) zugegeben und die Platten erneut zentrifugiert (1.600 g, 15 min, 20°C). 200 µl des Überstandes werden danach abgenommen und auf das Affinitätsadsorptionsmaterial gegeben.

7.2.4.2.2.3 Reinigung mittels Affinitätsadsorption

Die rote Sepharose (Procion Red HE-3B, Sigma-Aldrich Chemie, gebunden an Streamline AC, Amersham Pharmacia Biotech) [Kroner *et al.*, 1982 a; Kroner *et al.*, 1982 b; Reichert *et al.*, 2001] wird vor Gebrauch regeneriert. Dazu wird sie mit Regenerationslösung 1 (1 M NaCl, 25% Ethanol) und anschließend mit Regenerationslösung 2 (4 M Harnstoff, 0,5 M NaOH) gewaschen. Danach wird die Matrix zehnmal mit Puffer (10 mM KP_i pH 7,5) gewaschen.

200 µl des Überstands des Zellaufschlusses werden in eine 96-Well-PCR-Platte gegeben, in der sich 10 µl regenerierte rote Sepharose befinden. Die PCR-Platte wird dann verschlossen und für 1 h bei 20°C langsam auf einem Überkopfschüttler geschüttelt. Danach wird die Platte kurz zentrifugiert (1.600 g, 1 min, 20°C) und der Überstand abgesaugt. Die rote Sepharose wird anschließend zehnmal mit der Waschlösung 1 (40 mM NaCl, 40 mM NaSO₄, 100 mM KP_i pH 7,5) und zweimal mit der Waschlösung 2 (100 mM KP_i pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgt mit der Elutionslösung (15 mM NAD, 100 mM KP_i pH 7,5). Dazu wird 200 µl der Elutionslösung zugegeben, die PCR-Platte verschlossen und für 1 h bei 20°C langsam auf einem Überkopfschüttler geschüttelt. Danach wird die Platte kurz zentrifugiert (1.600 g, 1 min, 20°C) und der Überstand für die Bestimmung der Volumenaktivität und der Proteinkonzentration verwendet.

7.2.4.2.2.4 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Die Volumenaktivität wird in 96-Well-Mikrotiterplatten mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Photometers Thermomax plus, Molecular Devices, in einem Brutraum bei 30°C, um die Temperaturkonstanz zu gewährleisten, bestimmt. Dazu wird 75 µl Puffer (100 mM KP_i pH 7,5) zu 25 µl der eluierten FDH-Lösung gegeben und die Mikrotiterplatten 30 min bei 30°C inkubiert. Kurz vor der Messung werden 100 µl Aktivitäts-Assay (0,5 M Na-Formiat, 4 mM NAD, 100 mM KP_i pH 7,5, 30°C) pro Well zugegeben und die Volumenaktivität bestimmt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt ebenfalls in 96-Well-Mikrotiterplatten mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Photometers Thermomax plus, Molecular Devices. Zur Eichung wird eine Eichkurve mit BSA, Faktion V, herangezogen. Zu 50 µl der eluierten FDH-Lösung werden 150 µl 1,2x Bradfordlösung zugegeben, die Platte 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität V_{max} [$U\ mg^{-1}$] erfolgt durch Division der Volumenaktivität [$U\ ml^{-1}$] mit der Proteinkonzentration [$mg\ ml^{-1}$]. Die spezifische Aktivität V_{max} kann mit Hilfe des bekannten Molekulargewichtes eines FDH-Monomers von $40.370\ g\ mol^{-1}$ auf die Wechselzahl k_{cat} [s^{-1}] umgerechnet werden (Gleichung 21).

7.2.4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren

Die mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA wird zur Identifizierung, Quantifizierung und Isolierung elektrophoretisch in Agarosegelen entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Identifizierung erfolgt durch den Vergleich der Laufhöhe der DNA-Probe mit den Banden des DNA-Markers. Die Quantifizierung, d.h., die Massenbestimmung, gelingt über den Vergleich der Intensität der Ethidiumbromidfluoreszenz der DNA-Probe mit dem DNA-Marker.

Die Durchführung der Elektrophorese erfolgt gemäß Sambrook [Sambrook *et al.*, 1989]. Verwendet werden 0,6 – 1,2%ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,3, 1 mM EDTA), denen 0,005% (v/v) Ethidiumbromidlösung zugesetzt wird. Die DNA-Proben werden vor dem Auftragen mit 6x Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerin) versetzt. Die Elektrophorese erfolgt in TAE-Puffer bei 5 – 7 Volt cm^{-1} Gellänge.

Die Agarosegele werden anschließend mit dem Videosystem Eagele Eye II, Stratagene, dokumentiert. Dazu wird die Ethidiumbromidfluoreszenz mit UV-Licht bei 312 nm angeregt. Die Agarosegelelektrophorese eignet sich auch zur präparativen Isolierung der aufgetrennten DNA-Fragmente.

7.2.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgt mit den QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, entsprechend den Herstellerangaben.

7.2.4.5 Präparation der Plasmid-DNA

Die Plasmidpräparation erfolgt mit dem HiSpeed Plasmid Midi Kit, Qiagen, entsprechend den Herstellerangaben. Anschließend wird die eluierte DNA in der Speed-Vac aufkonzentriert.

7.2.4.6 DNA-Restriktion

Zu analytischen Zwecken werden 0,1 bis 0,5 µg DNA mit 1 – 2 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 10 – 20 µl für 1 bis 2 Stunden bei 37°C verdaut. Beim präparativen Ansatz wird 5 – 10 µg DNA eingesetzt und mit 2 bis 10 U bei einem Gesamtvolumen von 40 µl über Nacht verdaut.

7.2.4.7 Dephosphorylierung des linearisierten Vektors

Zur Dephosphorylierung des linearisierten Vektors im präparativen Maßstab wird 1 U Alkalische Phosphatase und Puffer zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird der Vektor im präparativen Agarosegel gereinigt.

7.2.4.8 Ligation überstehender Enden

Dem Ligationsansatz wird 5 U T4-DNA-Ligase und 10x Ligationspuffer in einem Gesamtvolumen von 10 – 20 µl zugegeben. Das Insert wird in einem molaren Verhältnis zum Vektor von 3 : 1 eingesetzt und der Ligationsansatz über Nacht bei 16°C inkubiert.

7.2.4.9 Transformation kompetenter Zellen

7.2.4.9.1 Transformation mittels Hitzeschock

Die Herstellung hitzeschockkompetenter *Escherichia coli* JM101-Zellen erfolgt nach der Methode von Hanahan [Hanahan, 1983]. Die Zellen werden aliquotiert (100 µl) und bei –80°C gelagert.

Die Transformation mittels Hitzeschock ist an das Protokoll von Hanahan [Hanahan, 1983] angelehnt. Dazu wird ein 100 µl-Aliquot auf Eis aufgetaut und 20 – 100 ng Vektor-DNA zugegeben. Die Plasmid-Zellsuspension wird für 20 min auf Eis gestellt und anschließend für 90 sec bei 42°C inkubiert. Nach 5 min erneuter Inkubation auf Eis erfolgt die Zugabe von 400 µl LB-Medium und zur Regeneration werden die Zellen für 1 h bei 37°C geschüttelt, auf LB^{amp}-Selektionsplatten ausgestrichen und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert.

7.2.4.9.2 Transformation mittels Elektroporation

Zur Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli* JM101-Zellen werden die Zellen in 400 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 angezogen, anschließend abzentrifugiert und drei mal mit 200 ml eiskaltem bidest. Wasser gewaschen. Danach wird einmal mit eiskalter 10%iger Glycerin-Lösung gewaschen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Anschließend wird 1,5 ml eiskalte 10%ige Glycerin-Lösung zugegeben, die Zellen resuspendiert, aliquotiert (40 µl) und bei – 80°C gelagert [Gene Pulser Elektroprotokoll, Bio-Rad Laboratories].

Zur Transformation mittels Elektroporation wird ein 40 µl-Aliquot auf Eis aufgetaut und 1 – 2 µg Vektor zugegeben. Die Plasmid-Zellsuspension wird für 1 min auf Eis gestellt, danach bei 12,5 kV cm⁻¹ mit dem *E. coli* Pulser, Bio-Rad Laboratories, transformiert (0,2 cm-Küvette, 2,5 kV, 4,9 msec) und anschließend sofort 1 ml SOC-Medium (2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, pH 7,5) zur Regeneration der Zellen zugegeben. Danach werden die Zellen für 1 h bei 37°C geschüttelt, auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert [*E. coli* Pulser Elektroprotokoll, Bio-Rad Laboratories].

7.2.4.10 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgt durch die Firma SequiServe, Vaterstetten, die Auswertung der Daten wird mit dem Programm DNAsis, Hitachi Software, vorgenommen.

8 Verzeichnisse

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 48: Abkürzungsverzeichnis.

Abkürzung	Erklärung
ADH	Alkoholdehydrogenase
amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DCW	Trockenzellmasse (dry cell weight)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenin-dinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FMN	Flavinadeninmononukleotid
IPTG	β -D-Isopropylthiogalaktosid
KP _i -Puffer	Kalium-Phosphat-Puffer
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LeuDH	L-Leucindehydrogenase
NAD/NADH	Nicotinamidadenin-dinukleotid, oxidiert/reduziert
NADP/NADPH	Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat, oxidiert/reduziert

Abkürzung	Erklärung
NTB	Nitrotetrazoliumblau-Chlorid
N-Terminus	Amino-Terminus
OD_n	Optische Dichte, bei einer Wellenlänge von n nm
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PES	Phenazethosulfat
PQQ	Pyrroloquinolinquinon
rek	rekombinant
rpm	Umdrehungen pro minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SH-Gruppe	Sulfhydryl-Gruppe
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMP	Trimethylpyruvat
tof	Wechselzahl (turnover frequency)
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
ttn	Maximale Zykluszahl (total turnover number)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w/v	Masse pro Volumen (weight per volume)
w/w	Masse pro Masse (weight per weight)
WCW	Biofeuchtmasse (wet cell weight)
WT	Wildtyp

8.2 Symbolverzeichnis

Tabelle 49: Symbolverzeichnis.

Abkürzung	Erklärung
ΔE	Extinktionsänderung pro Zeiteinheit bei 340 nm [min^{-1}]
ϵ	Extinktionskoeffizient für NADH [$6.220 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
μ	Wachstumsrate [h^{-1}]
μ_{crit}	kritische Wachstumsrate [h^{-1}]

Abkürzung	Erklärung
μ_{set}	vorgegebene Wachstumsrate [h^{-1}]
A_V	Volumenaktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$]
c_{GC}	GC-Gehalt [%]
d	Schichtdicke [cm]
E	Menge an aktiven Zentren [mol l^{-1}] bzw. Enzymmenge [mg l^{-1}]
F	Feed [h^{-1}]
f	Verdünnungsfaktor [-]
k_{cat}	Wechselzahl [s^{-1}]
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante [-]
k_{cat}^h	maximale Wechselzahl der Hinreaktion [$\text{mol Produkt s}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{Enzym}$]
K_i	Inhibitionskonstante für die Hinreaktion [mol l^{-1}]
K_{iA}	Inhibitionskonstante von A für die Rückreaktion [mol l^{-1}]
K_{iB}	Inhibitionskonstante von B für die Rückreaktion [mol l^{-1}]
K_{iKQ}	Kompetitive Inhibitionskonstante von Q für die Hinreaktion [mol l^{-1}]
K_{iSA}	Substratüberschußinhibitionskonstante von A für die Hinreaktion [mol l^{-1}]
K_{iSB}	Substratüberschußinhibitionskonstante von B für die Hinreaktion [mol l^{-1}]
K_M	Michaelis-Menten-Konstante für die Hinreaktion [mol l^{-1}]
K_{MA}	Michaelis-Menten-Konstante für A für die Hinreaktion [mol l^{-1}]
K_{MB}	Michaelis-Menten-Konstante für B für die Hinreaktion [mol l^{-1}]
K_{MP}	Michaelis-Menten-Konstante für P für die Rückreaktion [mol l^{-1}]
K_{MQ}	Michaelis-Menten-Konstante für Q für die Rückreaktion [mol l^{-1}]
k_{cat}^r	maximale Wechselzahl der Rückreaktion [$\text{mol Produkt s}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{Enzym}$]
l_P	Anzahl der Basen des Primers [-]
m	Erhaltungsstoffwechselkonstante [$\text{g Substrat g}^{-1} \text{Biomasse h}^{-1}$]
M_r	Molekulargewicht [g mol^{-1}]
m_s	Zugefüttertes Substrat [g]
n_{AT}	Anzahl der AT-Basen des Primers [-]
n_{CG}	Anzahl der GT-Basen des Primers [-]
S_0	Substratkonzentration bei Inokulation [g Substrat l^{-1}]
S_F	Substratkonzentration im Feed [g Substrat l^{-1}]
t	Zeit [h]
t_0	Zeit bei Beginn der Zufütterung [h]
$t_{1/2}$	Halbwertszeit [min]
T_{50}	Inaktivierungstemperatur [$^{\circ}\text{C}$]
T_m	Schmelztemperatur [$^{\circ}\text{C}$]

Abkürzung	Erklärung
V	Flüssigphasenvolumen [l]
V	Reaktionsgeschwindigkeit [$\text{mol s}^{-1} \text{l}^{-1}$] bzw. [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein l}^{-1}$]
V_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$]
X	Biomassekonzentration [g Biomasse l^{-1}]
Y_{XS}	Ausbeutekoeffizient [g Biomasse g^{-1} Substrat]

8.3 Einheitenverzeichnis

Tabelle 50: Einheitenverzeichnis.

Einheit	Erklärung
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
A	Ampere
Da	Dalton [g mol^{-1}]
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung [$9,81 \text{ m s}^{-2}$]
h	Stunde
l	Liter
M	Molarität [mol l^{-1}]
m	Meter
min	Minute
mol	$6,02 \cdot 10^{23}$ Teilchen
s	Sekunde
U	Unit [$\mu\text{mol min}^{-1}$]
V	Volt

8.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verfahren zur enzymatischen Regenerierung von NADH bzw. NADPH.	6
Abbildung 2: Enzymatische Synthese von L-tert-Leucin durch reduktive Aminierung im Enzym-gekoppelten Prozeß.	8
Abbildung 3: Methanoldissimilation bei der Hefe <i>Candida boidinii</i>	9
Abbildung 4: Kristallstruktur der FDH aus <i>Pseudomonas sp.</i> 101.	11
Abbildung 5: Oberflächenansicht der Kristallstruktur der FDH aus <i>Pseudomonas sp.</i> 101.	12
Abbildung 6: Reaktionsschema der Ordered Bi-Bi-Kinetik der <i>Candida boidinii</i> -FDH.	13
Abbildung 7: Räumliche Darstellung des aktiven Zentrums der <i>Pseudomonas sp.</i> 101-FDH.	14
Abbildung 8: Denaturierung von Proteinen vom nativen zum entfalteten Zustand.	25
Abbildung 9: Irreversible Denaturierung von Proteinen vom nativen über den entfalteten Zustand.	25
Abbildung 10: Modell der Denaturierung bei Interferon- γ vom nativen über den teilweise entfalteten und entfalteten zum aggregierten inaktiven Zustand.	26
Abbildung 11: Mechanismen der Oxidation von Methionin in Proteinen.	28
Abbildung 12: Mechanismus des Thiol-Disulfid-Austausches im neutralen und basischen Medium.	30
Abbildung 13: Mechanismus des Thiol-Disulfid-Austausches im sauren Medium.	30
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Zielsetzungen dieser Dissertation.	42
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Kultivierungsverfahrens zur rekombinanten Produktion der FDH in <i>Escherichia coli</i>	46
Abbildung 16: Vergleich des klassischen Fed-Batchs mit dem Simulated Fed-Batch.	50
Abbildung 17: Regelung der Sauerstoffsättigung auf 30% über die gesamte Prozeßzeit.	51
Abbildung 18: Zunahme der FDH-Aktivität nach Induktion.	52
Abbildung 19: FDH-Bildungsrate in Abhängigkeit von der IPTG-Konzentration.	53
Abbildung 20: Erniedrigung der Wachstumsrate nach Induktion.	54
Abbildung 21: Zunahme der FDH-Bildung.	55
Abbildung 22: Zunahme der spezifischen FDH-Aktivität während der Kultivierung.	55
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Verfahrens zur Aufarbeitung der rekombinanten FDH, gewonnen mittels Hochzelldichtekultivierung.	57
Abbildung 24: Vergleich der Aufschlußgeschwindigkeit der <i>Escherichia coli</i> JM105-Zellen durch PEG 400 in Abhängigkeit des Biofeuchtmass-Anteils beim PEG-Aufschluß bei 37°C.	60
Abbildung 25: PEG 400- und Ultraschallaufschluß von <i>Escherichia coli</i> JM105-Zellen im Vergleich.	61
Abbildung 26: Dargestellt ist der letzte Schritt der Optimierung des neuen Phasen-Systems.	62
Abbildung 27: Optimierung der Fällung der FDH aus der Oberphase des 2-Phasen-Systems mit PEG 6000.	63
Abbildung 28: Schematische Darstellung der Untersuchungen der molekularen Inaktivierungsprozesse bei der <i>Candida boidinii</i> -FDH.	68
Abbildung 29: Ramachandran-Plot der berechneten Struktur der <i>Candida boidinii</i> -FDH.	70
Abbildung 30: Aufbau einer Untereinheit der berechneten Struktur der <i>Candida boidinii</i> -FDH.	71
Abbildung 31: Oberflächenansicht des Homologiemodells der <i>Candida boidinii</i> -FDH.	72
Abbildung 32: Kalottenmodellansicht des Homologiemodells der <i>Candida boidinii</i> -FDH.	73

Abbildung 33: Darstellung der Lage der Methionine 129 in beiden Untereinheiten.....	74
Abbildung 34: Reinigung der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine bis zur Homogenität.....	76
Abbildung 35: Darstellung der thermoinaktivierten FDHs in der nativen PAGE.....	78
Abbildung 36: Änderung der Aktivität der WT-FDH in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur und der Glycerin-Konzentration bei 20 min Inkubationsdauer.....	79
Abbildung 37: Änderung der T_{50} -Werte der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration bei 20 min Inkubationsdauer.....	80
Abbildung 38: Änderung der Proteinkonzentrationen der WT-FDH in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur und der Glycerin-Konzentration bei 20 min Inkubationsdauer.....	80
Abbildung 39: Bestimmung der Halbwertszeiten zwischen 42°C und 60°C in 100 mM KP _i -Puffer, pH 7,5 bei 20 min Inkubationsdauer.....	81
Abbildung 40: Untersuchungen der Auswirkungen der Oxidation mit Wasserstoffperoxid in der nativen PAGE.....	84
Abbildung 41: Untersuchungen der Auswirkungen der Oxidation mit Wasserstoffperoxid in der SDS-PAGE.....	85
Abbildung 42: Untersuchungen der Auswirkungen der Oxidation mit Kupfer(II)-Ionen in der nativen PAGE.....	87
Abbildung 43: Untersuchungen der Auswirkungen der Oxidation mit Kupfer(II)-Ionen in der SDS-PAGE.....	88
Abbildung 44: Untersuchung der über 1 Jahr bei -20°C in 50% Glycerin gelagerten <i>Candida boidinii</i> -FDH in der SDS-PAGE.....	90
Abbildung 45: Inaktivierungsprozesse bei der FDH.....	91
Abbildung 46: Schematische Darstellung der Suche nach katalytisch aktiveren FDHs.....	94
Abbildung 47: Schematische Darstellung der Entwicklung des Screening-Verfahrens auf spezifische Aktivität der FDH-Muteine.....	99
Abbildung 48: Testbibliothek zur Bestimmung der Mutationsrate mit 1.152 FDH-Klonen.....	100
Abbildung 49: Schematische Darstellung des Fixierens der Zellkolonien in Agar.....	101
Abbildung 50: Reaktion zum Nachweis der aktiven FDH-Klone mit Phenazinethosulfat und Nitrotetrazoliumblau-Chlorid.....	103
Abbildung 51: Darstellung der angefärbten aktiven FDH-Klone im qualitativen Screening.....	104
Abbildung 52: Strukturformel von Procion MX-R.....	105
Abbildung 53: Allgemeines Reaktionsschema für die Bindung eines irreversiblen Inhibitors an ein Enzym.....	106
Abbildung 54: Darstellung der zeitabhängigen Inhibition der FDH durch Procion MX-R bei verschiedenen Konzentrationen.....	106
Abbildung 55: Bestimmung des stöchiometrischen Verhältnisses von aktivem Zentrum zu gebundenem irreversiblen Hemmstoff.....	107
Abbildung 56: Prinzip der Bestimmung der Anzahl der aktiven Zentren mit zwei Meßwerten.....	108
Abbildung 57: Vergleich der Ergebnisse des qualitativen mit dem nachfolgenden quantitativen Screening.....	109
Abbildung 58: Schematische Darstellung des Screenings von ca. 200.000 FDH-Klonen.....	110
Abbildung 59: Darstellung des quantitativen Screenings von 1.500 Klonen.....	111
Abbildung 60: Darstellung des Aminosäureaustausches F285S in der <i>Pseudomonas sp.</i> 101-Struktur.....	114
Abbildung 61: Dargestellt sind die Meßergebnisse der Formiat-, der NAD- und NADH-Kinetik und die Anpassung mit dem kinetischen Modell.....	115
Abbildung 62: Inaktivierungsprozesse bei der FDH.....	123

8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung der Enzyme.....	3
Tabelle 2: Preise der Cofaktoren.....	5
Tabelle 3: Aminosäure-Sequenzvergleich der <i>Candida boidinii</i> -FDH mit der <i>Pseudomonas sp.</i> 101-FDH.....	10
Tabelle 4: Vergleich der Preise von chemischen Katalysatoren und Enzymen.....	15
Tabelle 5: Vergleich der verschiedenen Zufütterungsstrategien bei Fed-Batch-Kultivierungen.....	17
Tabelle 6: Produktion rekombinanter Proteine in <i>Escherichia coli</i> im Vergleich.....	18
Tabelle 7: Halbwertszeiten immobilisierter Enzyme unter Produktionsbedingungen.....	23
Tabelle 8: Überblick über die Desaktivierungsprozesse bei Proteinen in technischen Anwendungen.....	24
Tabelle 9: Auflistung der wahrscheinlichsten Modifikationen von Aminosäureseitenketten durch Oxidation mit Hydroxyl-Radikalen.....	27
Tabelle 10: Rekombinante Cystein-defiziente FDH-Muteine.....	34
Tabelle 11: Assoziations- und Dissoziationsraten bei Enzym-Substrat-Interaktionen.....	38
Tabelle 12: Enzyme mit k_{cat}/K_M -Werten nahe an der diffusionslimitierten Assoziationsrate.....	39
Tabelle 13: Entwickelte Regelungssequenz.....	50
Tabelle 14: Ergebnisse der sechs Hochzelldichtekultivierungen.....	56
Tabelle 15: Schematische Darstellung des <i>Candida boidinii</i> -Verfahrens im Vergleich zum adaptierten Verfahren zur Aufreinigung der rekombinanten FDH aus <i>Escherichia coli</i>	58
Tabelle 16: Aufreinigungstabelle des <i>Candida boidinii</i> -Verfahrens und des adaptieren Verfahrens.....	58
Tabelle 17: Schematischer Vergleich des <i>Candida boidinii</i> -, des adaptierten und des neuentwickelten Verfahrens zur Aufarbeitung der rekombinanten FDH aus <i>Escherichia coli</i>	59
Tabelle 18: Zusammensetzung der PEG-Aufschlußlösung.....	61
Tabelle 19: Vergleich der Zusammensetzung des bei der Extraktion der FDH aus <i>Candida boidinii</i> eingesetzten 2-Phasen-Systems und des neuentwickelten 2-Phasen-Systems.....	63
Tabelle 20: Zusammensetzung des PEG-Fällungssystems.....	64
Tabelle 21: Aufreinigungstabelle des neuentwickelten Aufarbeitungsverfahrens.....	64
Tabelle 22: Sequenzhomologien der strukturcharakterisierten Template gegenüber der <i>Candida boidinii</i> -FDH-Sequenz.....	69
Tabelle 23: Übersicht über die globalen Homologien der aus 364 Aminosäuren bestehenden Zielsequenz <i>Candida boidinii</i> -FDH mit den homologen strukturcharakterisierten Templaten.....	69
Tabelle 24: K_M - und K_T -Werte der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine.....	75
Tabelle 25: Spezifische Aktivitäten V_{max} und Wechselzahlen k_{cat} der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine.....	76
Tabelle 26: T_{50} -Werte und Halbwertszeiten der <i>Candida boidinii</i> -FDH, der rekombinanten WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine.....	77
Tabelle 27: Bestimmung der Halbwertszeiten bei 30°C der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine anhand der Regressionsgeraden und der tatsächlich gemessenen Werte in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5.....	82
Tabelle 28: Vergleich der Halbwertszeiten der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine bei Oxidation mit 150 mM Wasserstoffperoxid in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5.....	83
Tabelle 29: Vergleich der Halbwertszeiten der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine bei Oxidation mit 50 μ M $CuSO_4$ in 100 mM KP_i -Puffer pH 7,5.....	86

Tabelle 30: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von NAD-abhängigen FDHs aus verschiedenen Organismen.....	95
Tabelle 31: Basen- und Aminosäuresequenz des Templats C23S-FDH und der C23S/F285S-FDH.	112
Tabelle 32: Darstellung der Aminosäuresequenz der bekannten NAD-abhängigen FDHs aus verschiedenen Organismen. .	113
Tabelle 33: Vergleich der kinetische Parameter der C23S-FDH und der C23S/F285S-FDH.	116
Tabelle 34: T_{50} -Werte der C23S/F285S-FDH und des Templats C23S-FDH.	117
Tabelle 35: Raum-Zeit-Ausbeuten an FDH der Kultivierungsverfahren mit der Hefe <i>Candida boidinii</i> von Weuster-Botz und der in dieser Arbeit neuentwickelten rekombinanten Produktion in <i>Escherichia coli</i> mittels Hochzeldichtekultivierung im Vergleich.....	120
Tabelle 36: Produktivste beschriebene Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine in <i>Escherichia coli</i> im Vergleich.	120
Tabelle 37: Vergleich des <i>Candida boidinii</i> -, des adaptierten und des neuentwickelten Verfahrens.	121
Tabelle 38: Vergleich der physikalischen und der chemischen Stabilität der WT-FDH und der Cystein-defizienten FDH-Muteine sowie ihrer katalytischen Aktivität.	122
Tabelle 39: Kinetische Parameter des Templats C23S-FDH und der C23S/F285S-FDH.	125
Tabelle 40: Verwendete Geräte.	127
Tabelle 41: Verwendete Chemikalien.	128
Tabelle 42: Zusammensetzung des Batch-Mediums.	137
Tabelle 43: Zusammensetzung der Feed-Lösung.	138
Tabelle 44: Zusammensetzung der Zellaufschlußlösung.	141
Tabelle 45: Zusammensetzung des 2-Phasen-Systems.	142
Tabelle 46: Zusammensetzung des Fällungssystems.	142
Tabelle 47: Zusammensetzung des Error-Prone PCR-Ansatzes.	143
Tabelle 48: Abkürzungsverzeichnis.....	149
Tabelle 49: Symbolverzeichnis.	150
Tabelle 50: Einheitenverzeichnis.	152

8.6 Literaturverzeichnis

- [1] Ahern, T.J., Klivanov, A.M. (1985) The mechanisms of irreversible enzyme inactivation at 100°C. *Science* **228**, 1280-1284
- [2] Allais, J.J., Louktibi, A., Baratti, J. (1983) Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of the formate dehydrogenase. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2547-2554
- [3] Allen, S.J., Holbrook, J.J. (1995) Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding NAD-dependent formate dehydrogenase from the methylotrophic yeast *Candida methylolica*. *Gene* **162**, 99-104
- [4] Allen, S.J., Holbrook, J.J. (2000) Production of an activated form of *Bacillus stearothermophilus* L-2-hydroxyacid dehydrogenase by directed evolution. *Prot. Engin.* **13**, 5-7
- [5] Altamirano, M.M., Blackburn, J.M., Aguayo, C., Fersht, A. (2000) Directed evolution of new catalytic activity using the α/β -barrel scaffold. *Nature* **403**, 617-622
- [6] Andersson, M.M., Breccia, J., Hatti-Kaul, R. (2000) Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **32**, 145-153
- [7] Ansorge, M.B., Kula, M.-R. (2000 a) Production of recombinant L-leucine dehydrogenase from *Bacillus cereus* in pilot scale using the runaway replication system *E. coli* [pLET98]. *Biotech. Bioengin.* **68**, 557-562
- [8] Ansorge, M.B., Kula, M.-R. (2000 b) Investigating expression systems for the stable large-scale production of recombinant L-leucin dehydrogenase from *Bacillus cereus* in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 668-673
- [9] Anthony, C. (1975) The biochemistry of methylotrophic micro-organisms. *Sci. Prog. (Oxford)* **62**, 167-206
- [10] Arakawa, T., Hsu, Y.R., Yphantis, D.A. (1987) Acid unfolding and self-association of recombinant *Escherichia coli* derived human interferon gamma. *Biochemistry* **26**, 5428-5432
- [11] Arnold, F.H., Moore, J.C. (1997) Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv. Biochem. Eng.* **58**, 1-14
- [12] Arnold, F.H., Volkov, A.A. (1999) Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 54-59
- [13] Arnold, F.H. (2001) Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* **409**, 253-257
- [14] Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K., Gershenson, A. (2001) How enzymes adapt: Lessons from directed evolution. *TIBS* **26**, 100-106
- [15] Avilova, T.V., Egorova, O.A., Ioanesyan, L.S., Egorov, A.M. (1985) Biosynthesis, isolation and properties of NAD-dependent formate dehydrogenase from the yeast *Candidia methylolica*. *Eur. J. Biochem.* **152**, 657-662
- [16] Backmann, J., Schäfer, G., Wyns, L., Bönisch, H. (1998) Thermodynamics and kinetics of unfolding of the thermostable trimeric adenylate kinase from the archaon *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Mol. Biol.* **284**, 817-833
- [17] Baland, A., Courtney, M., Jallat, S., Tessier, L.H., Sondermeyer, P., de la Salle, H., Harvey, R., Degryse, E., Tolstoshev, P. (1985) Use of synthetic oligonucleotides in gene isolation and manipulation. *Biochimie* **67**, 725-736
- [18] Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 20313-20316
- [19] Bernard, N., Johnsen, K., Holbrook, J., Delcour, J. (1995) D175 discriminates between NADH and NADPH in the coenzyme binding site of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* D-lactate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 895-900
- [20] Bisswanger, H. (2000) *Enzymkinetik. Theorie und Methoden*. Wiley-VCH Verlag, 3. Auflage
- [21] Blanchard, J.S., Cleland, W.W. (1980) Kinetic and chemical mechanism of yeast formate dehydrogenase. *Biochem.* **19**, 3543-3550
- [22] Bohnert, J.L., Horbett, T.A., Ratner, B.D., Royce, F.H. (1988) Adsorption of proteins from artificial tear solutions to contact lens materials. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **29**, 362-373

- [23] Bommarius, A.S., Drauz, K., Groeger, U., Wandrey, C. (1992) Membrane bioreactors for the production of enantiomerically pure α -amino acids. In: Chirality in industry (Collins, A.N., Sheldrake, G.N. and Crosby, J., eds.), John Wiley & Sons Ltd, New York, pp. 371-397
- [24] Bommarius, A.S., Schwarm, M., Stingl, K., Kottenhahn, M., Huthmacher, K., Drauz, K. (1995) Synthesis and use of enantiomerically pure *tert*-leucine. *Tetrahedron: Asymmetry* **6**, 2851-2888
- [25] Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J., Meyer, H.H. (1998) Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones. *Biotech. Bioengineering* **58**, 554-559
- [26] Bornscheuer, U., Pohl, M. (2001) Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 137-143
- [27] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-binding dye. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- [28] Brot, N., Weissbach, H. (1991) Biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. *Biofactors*. **3**, 91-96
- [29] Bryan, P.N. (2000) Protein engineering of subtilisin. *Biochim. Biophys. Acta* **1543**, 203-222
- [30] Caldwell, P., Luk, D.C., Weissbach, H., Brot, N. (1978) Oxidation of the methionine residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L12 decreases the protein's biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5349-5352
- [31] Caldwell, R.C., Joyce, G.F. (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* **2**, 28-33
- [32] Caldwell, R.C., Joyce, G.F. (1994) Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl.* **3**, 136-3140
- [33] Cavallini, D., De Marco, C., Dupre, S. (1968) Luminol chemiluminescence studies of the oxidation of cysteine and other thiols to disulfides. *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 18-26
- [34] Choi, J.H., Jeong, K.J., Kim, S.C., Lee, S.Y. (2000) Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus sp.* endoxylanase signal sequence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 640-645
- [35] Chotani, G., Dodge, T., Hsu, A., Kumar, M., LaDuca, R., Trimbur, D., Weyler, W., Sanford, K. (2000) The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim. Biophys. Acta* **1543**, 434-455
- [36] Chothia, C., Lesik, A.M. (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* **5**, 823-826
- [37] Chothia, C., Finkelstein, A.V. (1990) The classification and origin of protein folding patterns. In: *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 1007-1039
- [38] Clark, E., D. (2001) Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 202-207
- [39] Cordes, A., Kula, M.-R. (1986) Process design for large-scale purification of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by affinity partition. *J. Chromat.* **376**, 375-384
- [40] Cordes, A., Kula, M.-R. (1994) Large-scale purification of formate dehydrogenase by affinity partition in aqueous two-phase systems. *Meth. Enzymol.* **228**, 600-608
- [41] Crameri, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., Stemmer, W.P.C. (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* **391**, 288-291
- [42] Creighton, T.E. (1983) *Proteins*. W.H. Freeman, New York, 1983
- [43] Daugherty, P.S., Chen, G., Iverson, B.L., Georgiou, G. (1999) Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *PNAS* **97**, 2029-2034
- [44] Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **324**, 1-18
- [45] Delaunay, A., Isnard, A.D., Toledano, M.B. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* **19**, 5157-5166
- [46] Desrosiers, R., Tanguay, R.M. (1988) Methylation of *Drosophila* histones at proline, lysine, and arginine residues during heat shock. *J. Biol. Chem.* **263**, 4686-4692

- [47] Devaux-Basseguy, R., Bergel, A., Comtat, M. (1997) Potential applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases in synthesis: A survey. *Enz. Microbial. Technol.* **20**, 248-258
- [48] Dijken van, J.P., Oostra-Demkes, G.J., Otto, R., Harder, W. (1976) S-Formylglutathione: The substrate for formate dehydrogenase in methanol-utilizing yeasts. *Arch. Microbiol.* **111**, 77-83
- [49] Düring, K., Porsch, P., Mahn, A., Brinkmann, O., Gieffers, W. (1999) The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Letters* **449**, 93-100
- [50] Egorov, A.M., Avilova, T.V., Dikov, M.M., Popov, V.O., Rodionov, Y.V., Berezin, I.V. (1979) NAD-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium, strain 1. *Eur. J. Biochem.* **99**, 569-576
- [51] Egorov, A.M., Tishkov, V.I., Avilova, T.V., Popov, V.O. (1982) S-Formylglutathione a substrate of a bacterial formate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 1-5
- [52] Eigen, M., Hammes, G.G. (1963) Elementary steps in enzyme reactions. *Adv. Enzymol.* **25**, 1
- [53] Faber, K. (1997) *Biotransformations in organic chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 3. Auflage
- [54] Fang, J.M., Lin, C.H., Bradshaw, C.W., Wong, C.H. (1995) Enzymes in organic synthesis: Oxidoreductions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 967-978
- [55] Fersht, A.R. (1999) *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding*. W.H. Freeman, New York
- [56] Fry, A.J., Sobolov, S.B., Leonida, M.D., Voivodov, K.I. (1994) Electroenzymatic synthesis (regeneration of NADH coenzyme): Use of nafion ion exchange films for immobilization of enzyme and redox mediator. *Tetrahedron Lett.* **35**, 5607-5610
- [57] Gabriel, O., (1971) Locating enzymes on gels. *Methods Enzymol.* **22**, 578-604
- [58] Gais, J.H., Hemmerle, H. (1990) Asymmetrische Synthese mit Enzymen. *Chemie in unserer Zeit* **28**, 239-248
- [59] Galat, A., Creighton, T.E., Lord, R.C., Blout, E.R. (1981) Circular dichroism, Raman spectroscopy, and gel filtration of trapped folding intermediates of ribonuclease. *Biochemistry* **20**, 594-601
- [60] Galkin, A., Kulakova, L., Tishkov, V., Esaki, N., Soda, K. (1995) Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 479-483
- [61] Gao, Y., Mehta, K. (2001) Interchain disulfide bonds promote protein cross-linking during protein folding. *J. Biochem.* **129**, 179-183
- [62] Garvey, E.P., Matthews, C.R. (1990) Site-directed mutagenesis and its application to protein folding. *Biotechnol.* **14**, 37-63
- [63] Gekko, K., Timasheff, S.N. (1981) Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* **20**, 4667-4676
- [64] Gieren, H. Mitarbeiter am Institut für Enzymtechnologie, Universität Düsseldorf: Persönliche Mitteilung.
- [65] Giver, L., Gershenson, A., Freskagard, P.O., Arnold, F.H. (1998) Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12809-12813
- [66] Greenspan, R.J. (2001) The flexible genome. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 383-387
- [67] Griffiths, H.R. (2000) Antioxidants and protein oxidation. *Free Radic. Res.* **33**, 47-58
- [68] Guex, N., Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the SWISS-PDB Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723
- [69] Guex, N., Diemand, A., Peitsch, M.C. (1999) Protein modelling for all. *TiBS* **24**, 364-367
- [70] Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557
- [71] Hanes, J., Plückthun, A. (1999) *In vitro* selection methods for screening of peptide and protein libraries. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **243**, 107-122
- [72] Harris, J.L., Craik, C.S. (1998) Engineering enzyme specificity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 127-132

- [73] Havel, H.A., Kauffmann, E.W., Plaisted, S.M., Brems, D.N. (1986) Reversible self-association of bovine growth hormone during equilibrium unfolding. *Biochemistry* **25**, 6533-6538
- [74] Holeysovsky, V., Lazdunski, M. (1968) The structural properties of trypsinogen and trypsin. Alkylation and oxidation of methionines. *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 457-467
- [75] Hsu, Y.R., Arakawa, T. (1985) Structural studies on acid unfolding and refolding of recombinant human interferon gamma. *Biochemistry* **24**, 7959-7963
- [76] Hummel, W., Schütte, H., Schmidt, E., Wandrey, C., Kula, M.-R. (1987) Isolation of L-phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus sp.* M4 and its application for production of L-phenylalanine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 409-416
- [77] Hummel, W., Kula, M.-R. (1989 a) Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur. J. Biochem.* **184**, 1-13
- [78] Hummel, W., Kula, M.-R. (1989 b) Simple method for small scale disruption of bacteria and yeasts. *J. Microbiol. Meth.* **9**, 210-209
- [79] Hummel, W. (1997) New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **58**, 145-184
- [80] Izumi, Y., Kanzaki, H., Morita, S., Futazuka, H., Yamada, H. (1989) Characterization of crystalline formate dehydrogenase from *Candida methanolica*. *Eur. J. Biochem.* **182**, 333-341
- [81] Jocelyn, P.C. (1972) *Biochemistry of the SH Groups: The occurrence, chemical properties, metabolism, and biological function of thiols and disulfides.* Academic Press, New York, 1972
- [82] Joo, H., Lin, Z., Arnold, F.H. (1999) Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature* **399**, 670-673
- [83] Jori, G., Galiazzo, G., Marzotto, A., Scoffone (1968 a) Dye-sensitized selective photooxidation of methionine. *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 1-9
- [84] Jori, G., Galiazzo, G., Marzotto, A., Scoffone (1968 b) Selective and reversible photo-oxidation of the methionyl residues in lysozyme. *J. Biol. Chem.* **243**, 4272-4278
- [85] Kato, N., Sahn, H., Wagner, F. (1979) Steady-state kinetics of formate dehydrogenase and formate dehydrogenase from a methanol-utilizing yeast, *Candida boidinii*. *Biochim. Biophys. Acta* **566**, 12-20
- [86] Ke, S.H., Madison, E.L. (1997) Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube "megaprimer" PCR. *Methodol. Nucleic Acids Res.* **25**, 3371-3372
- [87] Kelly, S.T., Zydney, A.L. (1994) Effects of intermolecular thiol-disulfide interchange reactions on BSA fouling during microfiltration. *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 972-982
- [88] Kleman, G.L., Strohl, W.R. (1994) Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 180-186
- [89] Knecht, W., Munch-Peterson, B., Piskur, J. (2000) Identification of residues involved in the specificity and regulation of the highly efficient multisubstrate deoxyribonucleoside kinase from *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* **301**, 827-837
- [90] Knubovets, T., Osterhout, J.J., Connolly, P.J., Klivanov, A. (1999) Structure, thermostability, and conformational flexibility of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1262-1267
- [91] Kolkman, J.A., Stemmer, W.P. (2001) Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nat. Biotechnol.* **19**, 423-428
- [92] Korz, D.J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E.A., Deckwer, W.D. (1995) Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **39**, 59-65
- [93] Kragl, U., Vasic-Racki, D., Wandrey, C. (1992) Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen. *Chem. Ing. Tech.* **64**, 499-509
- [94] Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W., Wandrey, C. (1996) Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example. *Biotechnol. Bioeng.* **52**, 309-319

- [95] Kroner, K.H., Cordes, A., Schelper, A., Morr, M. Bückmann, A.F., Kula, M.-R. (1982 a) Affinity partition studies with glucose-6-phosphate dehydrogenase in aqueous two-phase systems in response to triazin dyes. *Affinity Chromatography and related techniques* (Eds. T.C.J. Gribnau, J. Visser, R.J.V. Nivard), Elsevier, Amsterdam, pp 491-501
- [96] Kroner, K.H., Schütte, H., Stach, W., Kula, M.-R. (1982 b) Scale-up of formate dehydrogenase by partition. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **32**, 130-137
- [97] Kruse, W., Hummel, W., Kragl, U. (1996) Alcohol dehydrogenase catalyzed production of chiral, hydrophobic alcohols: A new approach leading to a nearly wasteless process. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **115**, 239-243
- [98] Kuchner, O., Arnold, F.H. (1997) Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol.* **15**, 2-14
- [99] Kula, M.-R., Wandrey, C. (1987) Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NADH regeneration. *Methods Enzymol.* **136**, 9-21
- [100] Kula, M.-R. (1990) Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation* **1**, 181-189
- [101] Kula, M.-R. (1994) In: *Proceedings of the Chiral Europe 1994 Symposium*. Stockport: Spring Innovations Ltd, pp 27-33
- [102] Kutsenko, A.S., Korolev, S.V., Lamzin, V.S., Popov, V.O. (1994) Internal symmetry of the tertiary structure of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. 101. *Mol. Biol.* **28**, 415-419
- [103] Labrou, N.E., Clonis, Y.D. (1995) The interaction of *Candida boidinii* formate dehydrogenase with a new family of chimeric biomimetic dye-ligands. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 169-178
- [104] Labrou, N.E. (2000) Improved purification of *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *Bioseparation* **9**, 99-104
- [105] Labrou, N.E., Rigden, D.J. (2001) Active-site characterization of *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *Biochem. J.* **354**, 455-463
- [106] Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- [107] Lamzin, V.S., Aleshin, A.E., Strokopytov, B.V., Yukhnovich, M.G., Popov, V.O., Harutyunyan, E.H., Wilson, K.S. (1992) Crystal structure of NAD-dependent formate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **206**, 441-452
- [108] Lamzin, V.S., Dauter, Z., Popov, V.O., Harutyunyan, E.H., Wilson, K.S. (1994) High resolution structures of holo and apo formate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **236**, 759-785
- [109] Lee, S.Y., Chang, H.N., Chang, Y.K. (1994) Production of poly(beta-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **721**, 43-53
- [110] Lee, S.Y. (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **14**, 98-105
- [111] Li, S., Schöneich, C., Borchart, R. (1995) Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. *Biotechnol. Bioeng.* **48**, 490-500
- [112] Li, M., Chen, C., Pu, Q., Chen, S. (1998) Production of human recombinant bone morphogenetic protein-2A by high density culture of *Escherichia coli* with stationary dissolved oxygen fed-batch condition. *Chin. J. Biotechnol.* **14**, 157-163
- [113] Li, M. (2000) Applications of display technology in protein analysis. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1251-1256
- [114] Lim, H.K., Jung, K.H. (1998) Improvement of heterologous protein productivity by controlling postinduction specific growth rate in recombinant *Escherichia coli* under control of the PL promoter. *Biotechnol. Prog.* **14**, 548-553
- [115] Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (2000) *Industrial biotransformations*. Wiley-VCH, Weinheim
- [116] Little, C., O'Brien, P.J. (1967) Products of oxidation of a protein thiol group after reaction with various oxidizing agents. *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 406-410
- [117] Long-McGie, J., Liu, A.D., Schellenberger, V. (1999) Rapid *in vivo* evolution of a β -lactamase using phagemids. *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 121-125
- [118] Lougheed, W.D., Albisser, A.M., Martindale, H.M., Chow, J.C., Clement, J.R. (1983) Physical stability of insulin formulations. *Diabetes* **32**, 424-432

- [119] Low, N.M., Holliger, P.H., Winter, G. (1996) Mimicking somatic hypermutation: Affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* **260**, 359-368
- [120] Loyola, C., Saavedra, C., Gomez, I., Vasquez, C. (1999) The amino acid substitution of cysteine 167 by serine (C¹⁶⁷S) in *Bst*VI restriction endonuclease of *Bacillus stearothermophilus* V affects its conformation and thermostability. *Biochimie* **81**, 261-266
- [121] Lumper, V.L., Zahn, H. (1965) Chemistry and biochemistry of disulfide exchanges. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **27**, 199-237
- [122] Manning M.C., Patel, K., Borchardt, T. (1989) Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm. Res.* **6**, 903-918
- [123] Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B.W., Veltman, O.R., Van den Burg, B. Venema, G., Ulbrich-Hoffmann, R., Eijssink, V.G.H. (1997) Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond. *J. Biol. Chem.* **272**, 11152-11156
- [124] Markl, H., Zenneck, C., Dubach, A., Ogbonna, J.C. (1993) Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 48-52
- [125] Mata, L., Gripon, J.C., Mistou, M.Y. (1999) Deletion of the four C-terminal residues of PepC converts an aminopeptidase into an oligopeptidase. *Protein Eng.* **12**, 681-686
- [126] Matsumara, M., Signor, G., Matthews, B.W. (1989) Substantial increase of protein stability by multiple disulfide bonds. *Nature* **342**, 291-293
- [127] Matthews, B.W., Nicholson, H., Becktel, W.J. (1987) Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6663-6667
- [128] Matthews, B.W. (1995) Studies on protein stability with T4 lysozyme. *Adv. Protein Chem.* **46**, 249-278
- [129] Matthews, B.W. (1996) Structural and genetic analysis of the folding and function of T4 lysozyme. *FASEB J.* **10**, 35-41
- [130] May, O., Nguyen, T., Anold, F.H. (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat. Biotechnol.* **18**, 317-320
- [131] Means, G.E., Feeney, R.E. (1971) In: *Chemical modifications of proteins*. Holden-Day, New York, pp. 162-165
- [132] Mendes, P. (1993) GEPASI: A software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput. Appl. Biosci.* **9**, 563-571
- [133] Mendes, P. (1997) Biochemistry by numbers: Simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 361-363
- [134] Mendes, P., Kell, D. B. (1998) Non-linear optimization of biochemical pathways: Applications to metabolic engineering and parameter estimation. *Bioinformatics* **14**, 869-883
- [135] Meury, J. (1994) Immediate and transient inhibition of the respiration of *Escherichia coli* under hyperosmotic shock. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**, 281-286
- [136] Montfort, B.A. van., Schuurman-Wolters, G.K., Duurkens, R.H., Mensen, R., Poolman, B., Robillard, G. (2001) Cysteine cross-linking defines part of the dimer and B/C domain interface of the *Escherichia coli* mannitol permease. *J. Biol. Chem.* **276**, 12756-12763
- [137] Morita, Y., Furui, H., Morita, Y., Furui, H., Yoshii, H., Matsuno, R., Kometani, T. (1994) NAD(P)H regeneration using ethanol as an energy-source in bakers yeast mediated bioreduction. *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 13-16
- [138] MWG Biotech AG, Oligonukleotid-Protokoll. Ebersberg, Deutschland
- [139] Nakamura, K., Aizawa, M., Miyawaki, O. (1988) *Electroenzymology coenzyme regeneration*. Springer Verlag
- [140] Neben, I., Sahm, H., Kula, M.-R. (1980) Studies on an enzyme, S-Formylglutathione hydrolase, of the dissimilatory pathway of methanol in *Candida boidinii*. *Biochim. Biophys. Acta* **614**, 81-91
- [141] Nicholson, H., Becktel, W.J., Matthews, B.W. (1988) Enhanced protein thermostability from designed mutations that interact with a α -helix dipoles. *Nature* **336**, 651-656

- [142] Novotny, J., Rashin, A.A., Brucoleri, R.E. (1988) Criteria that discriminate between native proteins and incorrectly folded models. *Proteins* **4**, 19-30
- [143] Oliveberg, M. (2001) Characterization of the transition states for protein folding: Towards a new level of mechanistic detail in protein engineering analysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 94-100
- [144] Oxender, D.L., Fox, C.F. (1987) *Protein Engineering*. A.R. Liss Inc., New York 1987
- [145] Panda, A.K., Khan, R.H., Rao, K.B., Totey, S.M. (1999) Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of *Escherichia coli* expressing ovine growth hormone. *J. Biotechnol.* **75**, 161-172
- [146] Patel, R.N., Hou, C.H.T., Derelanko, P. (1983) Microbial oxidation of methanol: Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase from *Pichia sp.* NRRL-Y-11328. *Arch. Biochem. Biophys.* **221**, 135-142
- [147] Patrie, K.M., Botelho, M.J., Franklin, K., Chiu, I.M. (1999) Site-directed mutagenesis and molecular modeling identify a crucial amino acid in specifying the heparin affinity of FGF-1. *Biochemistry* **38**, 9264-9272
- [148] Petrounia, I.P., Arnold, F.H. (2000) Designed evolution of enzymatic properties. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 325-330
- [149] Plückthun, A., Schaffitzel, C., Hanes, J., Jermutus, L. (2000) *In vitro* selection and evolution of proteins. *Adv. Protein Chem.* **55**, 367-403
- [150] Popov, V.O., Lamzin, V.S. (1994) NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Biochem. J.* **130**, 625-643
- [151] Qaw, F.S., Brewer, J.M. (1986) Arginyl residues and thermal stability in proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **71**, 121-127
- [152] Reichert, U., Knieps, E., Slusarczyk, H., Kula, M.-R., Thömmes, J. (2001) Isolation of a recombinant formate dehydrogenase by pseudo affinity expanded bed adsorption. In press
- [153] Reidhaar-Olson, J., Bowie, J., Breyer, R.M., Hu, J.C., Knight, K.L., Lim, W.A., Mossing, M.C., Prasell, D.A., Shoemaker, K.R., Sauer, R.T. (1991) Random mutagenesis of protein sequences using oligonucleotide cassettes. *Methods Enzymol.* **208**, 564-586
- [154] Riesenberg, D., Guthke, R. (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 422-430
- [155] Rietsch, A., Beckwith, J. (1998) The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 163-184
- [156] Rodionov, Y.V., Zakharova, E.V. (1980) Two pathways of formate oxidation in methylotrophic bacteria. *Biokh.* **45**, 854-862
- [157] Roggenkamp, R., Sahm, H., Hinkelmann, W., Wagner, F. (1975) Alcohol oxidase and catalase in peroxisomes of methanol-grown *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.* **59**, 231-236
- [158] Rojkova, A.M., Galkin, A.G., Kulakova, L.B., Serov, A.E., Savitsky, P.A., Fedorchuk, V.V., Tishkov, V.I. (1999) Bacterial formate dehydrogenase. Increasing the enzyme thermal stability by hydrophobization of alpha-helices. *FEBS Lett.* **445**, 183-188
- [159] Rozzell, J.D. (1999) Commercial scale biocatalysis: Myths and realities. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2253-2261
- [160] Ruppert, R., Herrmann, S., Steckhan, E. (1988) Very efficient reduction of NAD(P) with formate catalyzed by cationic rhodium complexes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1150-1151
- [161] Russell, A.J., Fersht, A.R. (1987) Rational modification of enzyme catalysis by engineering surface charge. *Nature* **328**, 496-500
- [162] Ryu, D.D.Y., Nam, D.H. (2000) Recent progress in biomolecular engineering. *Biotechnol. Prog.* **16**, 2-16
- [163] Sahm, H. (1977) Metabolism of methanol by yeasts. *Adv. Biochem. Eng.* **6**, 77-103
- [164] Sahm, H., Eggeling, L., de Graaf, A.A. (2000) Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biol. Chem.* **38**, 899-910
- [165] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [166] Schmidt, M., Babu, K.R., Khanna, N., Marten, S., Rinas, U. (1999) Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **68**, 71-83

- [167] Schmidt-Dannert, C., Umeno, D., Arnold, F.H. (2000) Molecular breeding of carotenoid pathways. *Nat. Biotechnol.* **18**, 750-753
- [168] Schugerl, K. (2001) Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years. *J. Biotechnol.* **85**, 149-173
- [169] Schütte, H., Flossdorf, J., Sahm, H., Kula, M.-R. (1976) Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.* **62**, 151-160
- [170] Schwede, T., Diemand, A., Guex, N., Peitsch, M.C. (2000) Protein structure computing in the genomic era. *Res. Microbiol.* **151**, 107-112
- [171] Schwarz, K., Walther, M., Anton, M., Gerth, C., Feussner, I., Kuhn, H. (2001) Structural basis for lipoxygenase specificity. Conversion of the human leukocyte 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenating enzyme species by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 773-779
- [172] Seelbach, K., Riebel, B., Hummel, W., Kula, M.-R., Tishkov, V.I., Egorov, A.M., Wandrey, C., Kragl, U. (1996) A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Lett.* **37**, 1377-1380
- [173] Seres, D.S. (1990) Insulin adsorption to parenteral infusion systems: Case report and review of the literature. *Nutr. Clin. Pract.* **5**, 111-117
- [174] Shin, C.S., Hong, M.S., Bae, C.S., Lee, J. (1997) Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3) [pET-3aT2M2]. *Biotechnol. Prog.* **13**, 249-257
- [175] Shoemaker, K.R., Kim, P.S., Brems, D.N., Marqusee, S., York, E.J., Chaiken, I.M., Stewart, J.M., Baldwin, R.L. (1985) Nature of the charged-group effect on the stability of the C-peptide helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 2349-2353
- [176] Slusarczyk, H. (1997) Stabilisierung der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* mittels gerichteter Mutagenese. Dissertation
- [177] Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M.-R., Pohl, M. (2000) Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1280-1289
- [178] Stadtman, E.R., Berlett B.S. (1998) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab. Rev.* **30**, 225-243
- [179] Stemmer, W.P.C. (1994 a) Rapid evolution of protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* **370**, 389-391
- [180] Stemmer, W.P.C. (1994 b) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10747-10751
- [181] Stephanopoulos, G. (1999) Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab Eng.* **1**, 1-11
- [182] Strandberg, L., Andersson, L., Enfors, S.O. (1994) The use of fed batch cultivation for achieving high cell densities in the production of a recombinant protein in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**, 53-56
- [183] Stryer, L. (1996) *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford
- [184] Takagi, H., Hirai, K., Wada, M., Nakamori, S. (2000) Enhanced thermostability of the single-Cys mutant subtilisin E under oxidizing conditions. *J Biochem (Tokyo)* **128**, 585-589
- [185] Tandon, S., Horowitz, P.M. (1987) Detergent-assisted refolding of guanidinium chloride-denatured rhodanese. The effects of the concentration and type of detergent. *J. Biol. Chem.* **262**, 4486-4491
- [186] Thein, S.L., Wallace, R.B. (1988) In: *Human genetic diseases: A practical approach* (Davis, K.E., ed.). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. IRL Press, Herndon, Virginia
- [187] Tishkov, V.I., Egorov, A.M. (1985) Mechanism of the formate dehydrogenase reaction. *Biokh.* **50**, 895-901
- [188] Tishkov, V.I., Galkin, A.G., Marchenko, G.N., Tsygankov, Y.D., Egorov, A.M. (1993 a) Formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Pseudomonas sp.* 101: Gene cloning and expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **18**, 201-207

- [189] Tishkov, V.I., Galkin, A.G., Marchenko, G.N., Egorova, O.A., Sheluho, D.V., Kulakova, L.B., Dementieva, L.A., Egorov, A.M. (1993 b) Catalytic properties and stability of a *Pseudomonas sp.* 101 formate dehydrogenase mutants containing Cys-255-Ser and Cys-255-Met replacements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **192**, 976-981
- [190] Tishkov, V., Galkin, A., Kulakova, L.B., Egorov, A. (1993 c) Protein engineering of bacterial formate dehydrogenase. *Enzyme Engineering XII*, Deauville, France
- [191] Tishkov, V.I., Matorin, A.D., Rojkova, A.M., Fedorchuk, V.V., Savitsky, P.A., Dementieva, L.A., Lamzin, V.S., Mezentzev, A.V., Popov, V.O. (1996) Site-directed mutagenesis of the formate dehydrogenase active centre: Role of the His³³²-Gln³¹³ pair in enzyme catalysis. *FEBS Lett.* **390**, 104-108
- [192] Tishkov, V.I., Galkin, A.G., Fedorchuk, V.V., Savitsky, P.A., Rojkova, A.M., Gieren, H., Kula, M.-R. (1999) Pilot scale production and isolation of recombinant NAD- and NADP-specific formate dehydrogenases. *Biotechnol. Bioeng.* **64**, 187-193
- [193] Tomazic, S.J., Klivanov, A.M. (1988) Mechanisms of irreversible thermal inactivation of *Bacillus* α -amylases. *J. Biol. Chem.* **263**, 3086-3091
- [194] Vacca, J., Christen, P., Malashkevich, V.N., Jansonius, J.N., Sandmeier, E. (1995) Substitution of apolar residues in the active site of aspartate aminotransferase by histidine-effects on reaction and substrate specificity. *Biochem.* **227**, 481-487
- [195] Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., Rivier, J. (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* **213**, 1394-1397
- [196] Vieille, C., Zeikus, G.J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* **65**, 1-43
- [197] Villafranca, J.E., Howell, E.E., Voet, D.H., Strobel, M.S., Ogden, R.C., Abelson, J.N., Kraut, J. (1983) Directed mutagenesis of dihydrofolate reductase. *Science* **222**, 782-788
- [198] Voigt, C.A., Kauffman, S., Wang, Z.G. (2000) Rational evolutionary design: The theory of *in vitro* protein evolution. *Adv. Protein Chem.* **55**, 79-160
- [199] Volkin, D.B., Klivanov, A.M. (1987) Thermal destruction processes in proteins involving cystine residues. *J. Biol. Chem.* **262**, 2945-2950
- [200] Wagner, C.R., Benkovic, S.J. (1990) Site Directed Mutagenesis: A tool for enzyme mechanism dissection. *Trends Biotechnol.* **8**, 263-270
- [201] Walsdorf, A., Forciniti, D., Kula, M.-R. (1990) Investigation of affinity partition chromatography using formate dehydrogenase as a model. *J. Chromatography* **523**, 103-117
- [202] Bossow, B., Wandrey, C. (1987) Continuous enzymatically catalyzed production of L-leucine from the corresponding racemic hydroxy acid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **506**, 325-336
- [203] Wedler, G. (1987) *Lehrbuch der physikalischen Chemie*. Weinheim, New York, 1987
- [204] Wells, J.A., Powers, D.B. (1986) *In vivo* formation and stability of engineered disulfide bonds in subtilisin. *J. Biol. Chem.* **261**, 6564-6570
- [205] Wetzel, R., Perry, L.J., Baase, W.A., Becktel, W.J. (1988) Disulfide bonds and thermal stability in T4 lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 401-405
- [206] Weuster-Botz, D., Paschold, H., Striegel, B., Gieren, H., Kula, M.-R., Wandrey, C. (1994) Continuous computer controlled production of formate dehydrogenase (FDH) and isolation on a pilot scale. *Chem. Eng. Technol.* **17**, 131-137
- [207] Weuster-Botz, D., Wandrey, C. (1995) Medium optimization by genetic algorithm for continuous production of formate dehydrogenase. *Process Biochem.* **30**, 563-571
- [208] Wichmann, R., Wandrey, C., Bückmann, A.F., Kula, M.-R. (1981) Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 2789-2802
- [209] Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M., Altenbuchner, J. (2001) High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 95-103

- [210] Wingfield, P.T., Mattaliano, R.J., MacDonald, H.R., Craig, S., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Schmeissner, U. (1987) Recombinant-derived interleukin-1 alpha stabilized against specific deamidation. *Protein Eng.* **1**, 413-417
- [211] Winter, J., Neubauer, P. (1999) Successful production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. In: Recent research development, Vol. 2. Research singpost. Trivandrum India
- [212] Xu, H., Petersen, E.I., Petersen, S.B., El-Gewely, M.R. (1999) Random mutagenesis libraries: Optimization and simplification by PCR. *BioTechniques* **27**, 1102-1108
- [213] Zaccolo, M., Gherardi, E. (1999) The effect of high-frequency random mutagenesis on *in vitro* protein evolution: A study on TEM-1 β -Lactamase. *J. Mol. Biol.* **285**, 775-783
- [214] Zachariou, M., Scopes, R.K. (1986) Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J. Bacteriol.* **167**, 863-869
- [215] Zale, S.E., Klibanov, A.M. (1986) Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures? *Biochemistry* **25**, 5432-5444
- [216] Zaslavsky, B.Y. (1994) Aqueous two-phase partitioning. M. Dekker, Inc. New York
- [217] Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A., Arnold, F.H. (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat. Biotechnol.* **16**, 258-261
- [218] Zhao, H., Moore, J.C., Volkov, A.A., Arnold, F.H. (1999) Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2nd Ed. (A. L. Demain and J. E. Davies, eds.) Chapter 49, pp. 597-604, ASM Press, Washington, DC