

**Klonierung und Expression einer für  
stereoselektive Reduktionen  
einsetzbaren Carbonylreduktase aus  
*Candida parapsilosis***

**Inaugural-Dissertation**

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

vorgelegt von  
Mara Bönitz  
aus Duisburg

München, 2001

---

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

1. Referent: Prof. Dr. M.-R. Kula

2. Referent: Prof. Dr. G. Gellissen

Tag der mündlichen Prüfung: 22.November 2001

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1996 bis März 2000 am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Frau Prof. Dr. M.-R. Kula durchgeführt.

---

So wird in jeweils zarter Bindung - dies ist der Kernpunkt der „Erfindung“ - sehr viel Substrat rasch umgesetzt und keinesfalls Enzym verletzt, von dem selbst schon in Minimengen, die Reaktion zum Ablauf drängen. Die Wirkung also, das ist typisch, vollzieht sich einfach katalytisch!

Für meine Eltern, Claudia und Michael

---

# Inhaltsverzeichnis

## I Abkürzungsverzeichnis

## II Abbildungsverzeichnis

## III Tabellenverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Bedeutung von Enzymen	1
1.2 Enzymreaktionen	3
1.3 Spezifität	4
1.4 Cofaktorabhängigkeit	5
1.5 Klassifizierung von Enzymen	8
1.6 Dehydrogenasen	8
1.7 <i>CPCR</i>	10
1.8 Motivation und Zielsetzung	16
<b>2. Material &amp; Methoden</b>	<b>18</b>
2.1 Material	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Chemikalien/Enzyme	19
2.1.3 Kits	19
2.1.4 Mikroorganismen	20
2.1.5 Vektoren	20
2.2 Mikrobiologische Methoden	21
2.2.1 Stammhaltung/-lagerung	21
2.2.2 Zellkultivierungen	21
2.2.2.1 Zellkultivierungen im Schüttelkolben	21
2.2.2.2 Zellkultivierungen im Fermenter	23
2.2.3 Zellaufschluß	25
2.2.4 Mikroskopie von Mikroorganismen	26
2.3 Biochemische Methoden	26
2.3.1 Proteingehaltbestimmung nach <i>Bradford</i>	26
2.3.2 Bestimmung der optischen Dichte	27
2.3.3 Enzymtest	27

---

2.3.3.1	Qualitativer Enzymtest der Reduktaseaktivität	27
2.3.3.2	Quantitativer Enzymtest der Reduktaseaktivität	28
2.3.4	Aufreinigung	29
2.3.4.1	Fraktionierte PEG-Fällung	29
2.3.4.2	Ionenaustauscherchromatographie mit Q-Sepharose FF30	30
2.3.4.3	Ultrafiltration	30
2.3.4.4	Affinitätschromatographie mit 5'AMP-Sepharose 4B	31
2.3.4.5	Gelfiltration	31
2.3.5	Lagerung und Stabilitätstests von Proteinlösungen	32
2.3.6	Lyophilisation	32
2.3.7	Elektrophoretische Methoden	32
2.3.7.1	SDS-PAGE	32
2.3.7.2	Native PAGE	34
2.3.7.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese	34
2.3.8	Transfer von Proteinen (Western Blot)	36
2.3.9	Färbemethoden	36
2.3.9.1	Coomassie-Färbung	37
2.3.9.2	Silberfärbung	37
2.3.9.3	Amidoschwarzfärbung	38
2.3.9.4	Ponceaufärbung	38
2.3.9.5	CuCl <sub>2</sub> -Färbung	38
2.3.9.6	Aktivitätsfärbung	38
2.3.10	N-terminale Proteinsequenzierung	39
2.3.11	Enzymatische Spaltung der wtCPCR	39
2.3.12	Antikörper/Meerrettich-Peroxidase Immunglobulinkonjugat-Test	41
2.3.13	Zuckertest	42
2.3.14	Zn <sup>2+</sup> -Test	42
2.3.15	Inhibitionsstudien	42
2.3.16	Substratspektrum	43
2.3.17	K <sub>M</sub> -Bestimmung	43
2.3.18	Bestimmung des Temperaturoptimums der recCPCR	43
2.3.19	Bestimmung des pH-Optimums der recCPCR	43

---

2.3.20	Cysteinbestimmung	44
2.3.21	Massenspektrometer	44
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologischen Methoden</b>	<b>44</b>
2.4.1	Präparation von genomischer DNA	44
2.4.2	Bestimmung von DNA-Primer für die PCR	46
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
2.4.4	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Elektrophorese	47
2.4.5	DNA-Molekulargewichtsmarker	48
2.4.6	Fällung von DNA	48
2.4.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	49
2.4.8	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E.coli</i>	49
2.4.8.1	DNA-Minipräparationen	49
2.4.8.2	Plasmid-Kits/Qiagen	50
2.4.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	50
2.4.10	5' Dephosphorylierungen von DNA-Fragmenten	50
2.4.11	Ligationen	51
2.4.11.1	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA durch T4-DNA Ligase	51
2.4.11.2	Ligation von glatten Enden („blunt-end ligation“) unter Verwendung des SureClone Kits	51
2.4.12	Herstellung kompetenter Zellen	52
2.4.12.1	Kompetente Zellen	52
2.4.12.2	Elektrokompetente Zellen	53
2.4.13	Transformation von kompetenten Zellen	53
2.4.13.1	Hitzeschock nach Hanahan	53
2.4.13.2	Elektroporation	54
2.4.13.3	Blau / Weiß Selektion	54
2.4.14	Auflösung von „Inclusion Bodies“	55
2.4.15	Klonierungsansätze der recCPCR	55
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>57</b>
3.1	Zellkultivierung zur Gewinnung der CPCR aus <i>Candida parapsilosis</i>	57
3.2	Aufreinigung der CPCR	59
3.3	Denaturierung und Reduktion der Proteinmischfraktion aus der	

---

	Affinitätschromatographie_____	64
<b>3.4</b>	N-terminale Proteinsequenzierung der <i>CPCR</i> _____	66
<b>3.6</b>	Identifikation des 36 kDa Proteins der „ <i>CPCR</i> -Elutionsfraktion“ als eine Malatdehydrogenase_____	68
<b>3.7</b>	Das 40 kDa Protein ist mit Alkoholdehydrogenasen verwandt_____	69
<b>3.8</b>	Gelfiltration_____	71
<b>3.9</b>	Identifizierung des 40 kDa Proteins als <i>CPCR</i> _____	72
	3.9.1 Substratspektrum_____	72
	3.9.2 Temperatur- und pH-Optimum_____	74
	3.9.3 Isoelektrischer Punkt_____	75
	3.9.4 Bestimmung des Molekulargewichts_____	75
	3.9.5 Bestimmung des $K_M$ _____	77
	3.9.6 Einfluss verschiedener Agentien auf die Enzymaktivität_____	77
	3.9.7 Zusammenfassung der Daten_____	81
<b>3.10</b>	Identifizierung der Proteinsequenz der <i>wtCPCR</i> _____	81
<b>3.11</b>	Analyse einer möglichen Glykosylierung der <i>wtCPCR</i> _____	83
<b>3.12</b>	Western Blot Analyse der <i>wtCPCR</i> mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers <i>AKCPCR1</i> _____	84
<b>3.13</b>	Präparation von genomischer DNA_____	85
<b>3.14</b>	Bestimmung der <i>CPCR</i> -Gensequenz_____	87
<b>3.15</b>	Voraussetzungen für die rekombinante Expression von Genen_____	96
<b>3.16</b>	Klonierung und Expression der <i>recCPCR</i> _____	98
<b>3.17</b>	„ <i>Inclusion Bodies</i> “_____	106
<b>3.18</b>	Renaturierungsversuche zur Auflösung von „ <i>Inclusion Bodies</i> “_____	112
<b>3.19</b>	Plasmidinstabilitäten_____	114
<b>3.20</b>	Strukturelle Stabilität und Segregationsstabilität_____	115
<b>3.21</b>	Weitere Untersuchungen zur Expressionsverbesserung_____	120
<b>3.22</b>	Aufreinigung der rekombinanten <i>CPCR</i> _____	121
<b>3.23</b>	Biochemische Charakterisierung der <i>recCPCR</i> _____	123
<b>4.</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b> _____	126
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> _____	130
<b>6.</b>	<b>Literatur</b> _____	131
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> _____	149

---

# I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABEE	Acetylbuttersäureethylester
AK	Antikörper
ADH	Alkoholdehydrogenase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
°C	Grad Celsius
CPCR	<i>Candida parapsilosis</i> Carbonylreduktase
CPMDH	<i>Candida parapsilosis</i> Malatdehydrogenase
d	Tag
DEAE	Diethylaminoethyl
DIG	Digoxinin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung der Mikroorganismen Zentrale
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced ChemoLuminescence assay</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
ee	Enantiomerenüberschuß
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FF	<i>Fast Flow</i>
Glu-C	Glutaminsäure-Endoprotease
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HHEE	Hydroxyhexansäureethylester
HL-ADH	Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber ( <i>Horse Liver ADH</i> )
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
HZD	Hochzelldichte (Fermentation)
INT	3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
Kb	Kilobasen(paare)
kDa	kilo Dalton
kJ	kilo Joule
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LB	Luria Bertani
Lys-C	Lysinendoprotease
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time of Flight</i>
MDH	Malatdehydrogenase
min	Minute
mL	Milliliter
MPP	<i>Matrix processing peptidase</i>
MS	Mass Spectrometry
MTS	<i>Matrix targeting signal</i>
MW	Molekulargewicht
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NADH	Nicotinamidadenosinnukleotid (red. Form)
NAD	Nicotinamidadenosinnukleotid ( ox: Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (red. Form)
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat ( ox. Form)
NC	Nitrocellulose
NTB	Nitrotetrazoliumblau

---

OD	Optische Dichte
P	Produkt
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBTacrec <i>CPCR</i>	Produktionssplasmid der rec <i>CPCR</i> in JM105
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyethylglykol
pl	Isoelektrischer Punkt
PMS	Phenanzinmethosulfat
POD	Peroxidase
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PQQ	Pyrolochinolinchinon
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rec	rekombinant ( <i>recombinant</i> )
RT	Raumtemperatur
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Substrat
S-S	Disulfidbrücke
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TfB1+2	Transformationspuffer
TRIS	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Unit
U/mL	Volumenaktivität
U/mg	spezifische Aktivität
ü/N	über Nacht
UPM	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
µL	Microliter
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol %	Volumenprozent
v/v	Volumenanteil pro Volumenanteil
w/	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil pro Volumenanteil
w/w	Gewichtsanteil pro Gewichtsanteil

---

## II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Physiologische Wirkung von Enantiomerenpaare, S. 5
- Abbildung 2: Cofaktorregenerierungssystem, S. 7
- Abbildung 3: Hypothetische Struktur der *CPCR*-Substratbindungsstelle, S. 11
- Abbildung 4: Sequentieller *Bi-Bi*-Mechanismus der *CPCR*, S. 12
- Abbildung 5: Überblick über das Substratspektrum der *CPCR*, S. 13
- Abbildung 6: Reaktionsschema zur Herstellung von (2*S*,5*S*)-Hexandiol, S. 6
- Abbildung 7: Vom Wildtypenzym zur rekombinanten *CPCR*, S.17
- Abbildung 8: Wachstumskurven verschiedener Kultivierungsansätze, S. 58
- Abbildung 9: Anionenaustauscherchromatographie und SDS-PAGE der wt*CPCR*-Fraktion, S. 61
- Abbildung 10: Affinitätschromatographie der *CPCR*, S. 62
- Abbildung 11: Native PAGE der Elutionsfraktionen aus der Affinitätschromatographie, S. 64
- Abbildung 12: Überprüfung der Reduktions- und Denaturierungsbedingungen, S. 65
- Abbildung 13: N-terminale Proteinsequenzierung der Proteine der „*CPCR*“, S. 66
- Abbildung 14: Homologievergleiche des Proteins der 36 kDa Bande mit ähnlichen Proteinen, S. 67 + S. 68
- Abbildung 15: Katalysierte Reaktion von Malatdehydrogenasen, S. 69
- Abbildung 16: Abtrennung der 36 kDa und 40 kDa Fraktion, S.71
- Abbildung 17: Temperatur- und pH-Optimum der 40 kDa Proteinfraction, S. 75
- Abbildung 18: MALDI-TOF-MS, S. 76
- Abbildung 19: Enzymkinetik des 40 kDa-Proteins (0,2 mg/mL) für die Umsetzung von ABEE, S. 77
- Abbildung 20: Teilsequenzbereiche der wt*CPCR* im Vergleich zur ADH 1 aus *Candida albicans*, S. 82
- Abbildung 21: Test auf Glykolysierung der wt*CPCR*, S. 83
- Abbildung 22: Polyklonaler Antikörper AK*CPCR*1, S. 84
- Abbildung 23: Fließschema zur Klonierung des rec*CPCR*-Gens in verschiedenen Expressionssystemen, S. 86
- Abbildung 24: Agarosegel (0,5 %) zur Analyse der isolierte, genomischen DNA aus *Candida parapsilosis*, S. 86
- Abbildung 25: Verwendete Primerpaare zur Amplifizierung des *CPCR*-Gens, S. 88

---

Abbildung 26: 0,8 %iges Agarosegel zur Analyse der korrekten Amplifikation des *CPCR*-Gens, S. 89

Abbildung 27: 0,8 %iges Agarosegel zur Auftrennung des Restriktionsverdau eines das *CPCR*-Gen enthaltenen pUC18 Klons, S. 90

Abbildung 28: Gen- und die daraus abgeleitete Proteinsequenz der *CPCR*, im Vergleich mit der Gen- und Proteinsequenz der ADH 1 aus *Candida albicans*

Abbildung 29: Sequenz-Alignment zwischen der *CPCR* und cytoplasmatischen bzw. mitochondrialen ADH 1, S. 95

Abbildung 30: Ausschnitt der schematischen Restriktionskarte des *CPCR*-Gens aus *Candida parapsilosis*, S.99

Abbildung 31: Restriktion eines *CPCR*-Genprodukt aus einer PCR und eines Expressionsvektors, S. 101

Abbildung 32: Vektorkarten der aktiven Expressionsplasmide, S. 103

Abbildung 33: Expression der *recCPCR* nach Induktion mit IPTG, dargestellt im Coomassie gefärbten SDS-Gel., S. 104

Abbildung 34: Immunoblot der exprimierten *recCPCR*, S. 105

Abbildung 35: Coomassie gefärbtes SDS-Gel und Immunoblot von Zellpellets des aufgeschlossenen Rohextrakt von pBTacrec*CPCR*-Klonen, S. 107

Abbildung 36: Wachstumskurve von pBTacrec*CPCR*, S. 109

Abbildung 37: Kultivierung von pBTacrec*CPCR* zur Bestimmung der optimalen Kultivierungstemperatur, S. 110

Abbildung 38: SDS-PAGE zur Überprüfung der löslichen *recCPCR*-Fraktionen nach einer Anzucht bei 30 °C und 37 °C mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen, S. 111

Abbildung 39: Immunoblot von resolubilisierter *recCPCR*, S. 113

Abbildung 40: Schüttelkolbenkultur / 100 mL LB-Medium, S. 117

Abbildung 41: Batchfermentation / 20 L LB-Medium, S. 118

Abbildung 42: HZD-Fermentation / 15 L Medium, S. 119

Abbildung 43: Elutionsfraktionen der *recCPCR*, S. 122

---

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl an Coenzymen, die von ihnen übertragenen Gruppen bzw. ihre Funktion und die Beziehung zu Vitaminen [*Lehninger*, 1987], S. 6

Tabelle 2: Preise für Nicotinamid-Coenzyme, S. 6

Tabelle 3: Stereochemie einiger Produkte der Reduktionsreaktion der *CPCR*, S. 12

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Mikroorganismen, S. 20

Tabelle 5: Übersicht zu den Parametern der Zellkultivierungen, S. 25

Tabelle 6: Bearbeitung von „*Inclusion Bodies*“ in *E.coli*, S. 55

Tabelle 7: Klonierungsansätze der *CPCR*, S. 56

Tabelle 8: Verschiedene Kultivierungsansätze zur Herstellung von Biomasse aus *Candida parapsilosis* zur Gewinnung der *CPCR*, S. 59

Tabelle 9: Aufreinigungsdaten der *CPCR*, S. 60

Tabelle 10: Überprüfung des Substratspektrums der *CPCR* anhand der Reduktionsreaktion, S. 73

Tabelle 11: Überprüfung des Substratspektrums der *CPCR* anhand der Oxidationsreaktion, S. 73

Tabelle 12: Einfluß von Zinkionen auf die Enzymaktivität der *CPCR*, S. 78

Tabelle 13: Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität der wt*CPCR*, S. 80

Tabelle 14: Aminosäurezusammensetzung der *CPCR*, S. 91

Tabelle 15: Eignung verschiedener Organismen zur Expression von Fremdprotein, S. 98

Tabelle 16: Spezifische *CPCR*-Aktivitäten in zellfreien Rohextrakten verschiedener Expressionssysteme, S. 101

Tabelle 18: Aufreinigungsdaten der rec*CPCR*, S. 123

Tabelle 19: Zusammenfassung der Charakteristika der rec*CPCR*, S. 124

---

# 1. Einleitung

## 1.1 Bedeutung von Enzymen

Fermentative Prozesse wie die alkoholische Gärung oder das Ansäuern der Milch sind seit Jahrtausenden bekannt. Die wissenschaftliche Untersuchung enzymatischer Reaktionen, wie der Hydrolyse, begann in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts. *Berzelius* prägte 1837 den Begriff Katalyse im Hinblick auf die Reaktionen im lebenden Organismus. Um die Mitte des vorigen Jahrhunderts lehrte *Pasteur*, daß alle Gärungs- und Fermentationsprozesse durch lebende Mikroorganismen hervorgerufen werden. Er postulierte, daß diese ohne lebenden Zellen nicht möglich seien. Abgeleitet von „Zyme“, dem griechischen Wort für Hefe, schlug *Kühne* 1878 vor, die rein chemisch wirkenden Katalysatoren dieser Prozesse „Enzyme“ zu nennen, [Fonds der Chemischen Industrie, 2001].

Enzyme sind die universalen Katalysatoren lebender Zellen. Die Gesamtheit der biochemischen Umsetzungen im Organismus ist nur durch die Wirkung dieser Biokatalysatoren möglich. Die Zahl der natürlich vorkommenden Enzyme wird auf mehr als 10.000 geschätzt, von denen ein Drittel inzwischen bekannt ist. Chemisch gesehen; gehören die nur aus L-Aminosäuren bestehenden Enzyme zur Gruppe der Proteine. Die von ihnen umgesetzten Substanzen bezeichnet man als Substrate.

In der organischen Synthese von chiralen Molekülen und Intermediaten werden Biokatalysatoren in verschiedenen Reinheitsgraden eingesetzt. Da 90 % aller industriell genutzten Enzyme von Mikroorganismen erzeugt werden, handelt es sich dabei um ruhende oder wachsende Zellen, Rohextrakte bzw. gelöste oder immobilisierte isolierte Enzyme [Godfrey & West, 1996]. Trotz der Nachteile in technischen Verfahren wie Instabilität, hohe Kosten und geringe Substratbreite [Knowles, 1991] ist gerade die Biotransformation mit isolierten Enzymen zu einer gebräuchlichen Anwendung in Forschung und industrieller Produktion geworden [Liese et al., 2000; Liese & Filho, 1999]. Die Einsatzgebiete von Biokatalysatoren beziehen sich hauptsächlich auf die Produktion von Feinchemikalien, Lebensmittelzusatzstoffen und Pharmaka [Bommarius et al., 1998]. Proteasen werden z.B. in der Nahrungsmittel- und Waschmittelindustrie, Carbohydrasen in der Backwaren- und Getränkeproduktion oder auch zur Textilveredelung eingesetzt. Verschiedene Enzyme, wie z.B. Cellulasen oder Proteasen, werden unter das Tierfutter gemischt, damit Hühner und Schweine die angebotene Kost besser und effektiver verdauen, oder sollen in der

---

Papier- und Zellstoffindustrie aggressives, umweltschädliches Chlor als Bleichmittel ersetzen. Weiteren Einsatz finden Enzyme in der medizinischen Diagnostik, als Therapeutika und als molekularbiologische Reagenzien. Wirtschaftlich wichtige Anwendungen sind z.B. die Waschmittelenzyme, die Stärkehydrolyse mit Amylase, die Produktion von Acrylamid aus Acrylnitril durch eine Nitrilhydratase (30.000 t/a) [Bommarius & Drauz, 1994] wie auch die Herstellung von Insulin mit Trypsin [Ladisch & Kohlmann, 1992]. Das im industriellen Maßstab erfolgreichste enzymatische Verfahren ist die Herstellung von Glukose-Sirup mit einem hohen Fructoseanteil durch die Isomerisierung von Glucose zu Fructose durch eine Glucoseisomerase ( $8 \cdot 10^6$  t/a). Diese Synthese zielt darauf ab, aus einem billigen Rohstoff (Getreidestärke) ein Produkt zu gewinnen, dessen Süßkraft mit der der Saccharose vergleichbar ist [Wingard et al., 1979].

Neben dem industriellen Einsatz von Enzymen aus ihren natürlichen Quellen stieg im letzten Jahrzehnt die Bedeutung von gentechnisch hergestellten Enzymen. Drei Gründe waren für diese Entwicklung entscheidend. 1. Der natürliche Wirt produzierte das Enzym nur in geringen Mengen. 2. Das gewünschte Enzym konnte nicht sauber genug aufbereitet werden. 3. Der Biokatalysator arbeitete schlecht unter bestimmten Bedingungen wie z.B. hohen Temperaturen oder in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln.

Bei der Herstellung von Enzymen wird heutzutage die gentechnische Methodik benutzt, um den Mikroorganismus, der den Biokatalysator produzieren soll, zu verändern oder um das Enzym selbst zu verändern oder beides. Grundsätzlich stehen dazu zwei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Beim Gentransfer werden die Gene von einem Organismus auf einen anderen übertragen und so die Eigenschaft des Empfängerorganismus verändert. Man unterscheidet zwischen homologen Gentransfer, bei dem das Gen z. B. in mehreren Kopien im ursprünglichen oder in einem diesem nahe verwandten Mikroorganismus verwendet wird oder den heterologen Gentransfer. Bei diesem artfremden Gentransfer wird das Gen in einen anderen Mikroorganismus eingeführt. Die zweite Möglichkeit umfaßt die Genmodifikation bzw. das sogenannte „*protein engineering*“, bei dem das Gen selbst verändert wird, um das codierte Enzym z. B. für eine neue Anwendung effektiver zu machen. Die Vorteile der gentechnisch hergestellten Enzyme liegen in dem Zugang zu neuen Produkten, in der Effizienzverbesserung, in der Erhöhung der Prozesssicherheit bzw. der Vereinfachung des Prozesses wie auch der ökonomischen und umweltschonenden

---

deren Produktion. Auch die Reinigung von rekombinanten Proteinen wird wesentlich erleichtert durch neue Verfahren der Proteinextraktion [Rodenbrock *et al.*, 2000; Rämisch *et al.*, 2000], der Proteinaufreinigung durch Adsorption im Fließbett [Thömmes, 1997] sowie mit Hilfe von spezifischen Reinigungs-Tags [Grisshammer & Tate, 1995].

## 1.2 Enzymreaktionen

Als Katalysatoren verringern die Enzyme die Aktivierungsenergie, ohne das thermodynamische Gleichgewicht zu beeinflussen. Ihre Wirkungsweise beruht darauf, daß sie bereits in geringen Mengen chemische Reaktionen um den Faktor von  $10^8$ –  $10^{10}$  beschleunigen oder erst ermöglichen, ohne dabei selbst verbraucht zu werden. Man kann hohe katalytische Aktivitäten unter milden Reaktionsbedingungen in wäßrigen Medien erreichen, indem die Reaktionen bei Temperaturen zwischen 20 – 40 °C, neutralen pH-Werten wie auch atmosphärischen Druck ablaufen. Die enzymatische Aktivität eines Biokatalysators ist eine Funktion von Parametern wie Temperatur, Substratkonzentration, Cofaktoren, Inhibitoren, Lösungsmittel und pH-Wert. Um quantitative Vergleiche ziehen zu können, wurden von der "*International Unit of Biochemistry*" Enzymaktivitäten in Units (U) bzw. katal (kat) definiert. Ein Unit ist die Enzymmenge, die notwendig ist, die Umsetzung von einem Mikromol Substrat pro Minute unter definierten Bedingungen zu katalysieren. Ein kat ist die Menge eines Enzyms, die die Umsetzung eines Mols Substrat pro Sekunde unter definierten Bedingungen katalysiert (  $1 \text{ kat} = 6 \cdot 10^7 \text{ U}$ ;  $1 \text{ U} = 16,67 \text{ nkat}$  ). Bei spezifischen Aktivitäten werden Enzymaktivitäten auf die Proteinkonzentration bezogen (U/mg). Die Messung von Enzymaktivitäten erfolgt entweder durch die Verfolgung der Umsetzung des Substrates oder die Bildung des Produktes in Abhängigkeit von der Zeit. Alternativ wird auch die Aktivität durch Bildung oder Verbrauch von zugehörigen Coenzymen, wie z. B. NAD(H) bestimmt. Als Randbedingung ist die Messung bei 30 °C im pH-Optimum des Enzyms bei optimaler Konzentration und Substratsättigung festlegt.

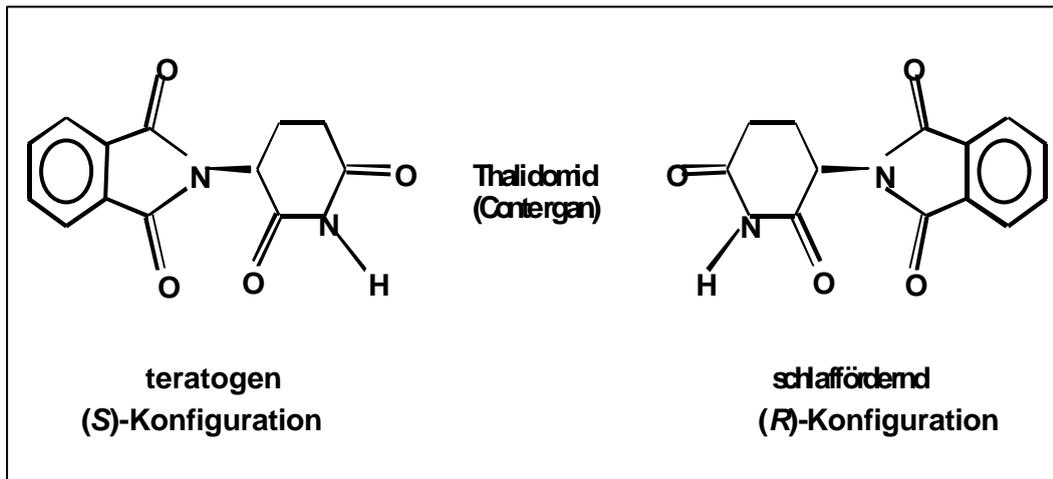
Der  $K_M$ -Wert, der die Affinität des Enzyms zum Substrat ausdrückt, hängt von der Art des Enzyms und ist zusätzlich eine Funktion von Temperatur und pH-Wert. Enzymreaktionen können durch ihre Substrate und Reaktionsprodukte negativ beeinflusst werden. Die Art der Inhibition (kompetitiv, nicht kompetitiv) kann durch kinetische Messungen bestimmt werden. Aus diesem Grund ist die Kenntnis der kinetischen

---

Parameter des Reaktionssystems für den optimalen Einsatz von Enzymen notwendig [Biselli et al., 1995].

### 1.3 Spezifität

Enzyme wirken im Gegensatz zu chemisch-technischen Katalysatoren in mehrfacher Hinsicht hochspezifisch. Sie besitzen eine ausgesprochene Substratspezifität, d. h. sie reagieren nur mit einem oder mehreren bestimmten Substraten, während andere, auch strukturell sehr nahe verwandte Moleküle, nicht umgesetzt werden. Diese Eigenschaft ist in der Größe, der sterischen Konfiguration und der Ladungsverteilung der katalytischen Zentren begründet. Sie sind wirkungsspezifisch, d. h. von vielerlei Reaktionen, die ein Stoff mit seiner chemischen Umgebung eingehen kann, wie z. B. Hydrolyse oder Oxidation/Reduktion, katalysieren Enzyme nur eine einzige. Enzyme sind stereospezifisch. d.h. sie können prochirale Substrate so umwandeln, daß nur eine von zwei möglichen Formen von Molekülen entstehen kann, die sich bei gleicher Summenformel und Konstitution nur durch die räumliche Anordnung der Atome unterscheiden. Enantiomere, eine Form der Stereoisomerie, sind chemisch und physikalisch völlig gleichartig aufgebaut und trotzdem nicht identisch; die Strukturen ihrer Moleküle sind zueinander spiegelbildlich, sie unterscheiden sich voneinander so wie die rechte von der linken Hand [Le Bel, 1874]. Aufgrund ihrer gleichen physikalischen Eigenschaften können Enantiomere nur durch ihre optische Aktivität unterschieden werden. Beim Durchgang von linearisiertem Licht durch die Lösung eines Enantiomers erfährt die Polarisationssebene eine Drehung um einen bestimmten Betrag nach rechts oder links [Biot, 1815]. Gerade diese Stereospezifität stellt einen entscheidenden Selektionsfaktor der Enzyme dar, der bedeutsam in der therapeutischen Anwendung von enantiomeren Verbindungen ist [Roth, 1982]. Enantiomere können durch ihre Chiralität unterschiedliche, biologische Wirkungen auf lebende Organismen haben, die sich z. B. Ende der sechziger Jahren durch verheerende Folgen bei dem Medikament Contergan® (Grünthal, Stolberg) zeigten. Das (*R*)-Enantiomer wirkte schlaffördernd, das (*S*)-Enantiomer fruchtschädigend [Gemballa, 1993; Faber, 1997], (Abbildung 1).



**Abbildung 3**  
 Physiologische Wirkung von Enantiomerenpaaren.

## 1.4 Cofaktorabhängigkeit

Enzymreaktionen können von Cofaktoren abhängig sein, d. h. viele Enzyme benötigen für die katalytische Aktivität eine zusätzliche chemische Komponente. Neben einem oder mehreren anorganischen Ionen wie  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  kann es sich dabei auch um ein komplexes organisches oder metallorganisches Molekül, ein sogenanntes Coenzym handeln. Viele Organismen können solche essentiellen Coenzymen nicht selber synthetisieren; sie müssen mit der Nahrung als Vitamine aufgenommen werden (Tabelle 1, folgende Seite).

Die Kosten von Nicotinamid-Coenzymen sind generell zu hoch, um sie in äquimolaren Mengen im industriellen Maßstab einzusetzen (Tabelle 2, folgende Seite).

Zur Reduzierung der Synthesekosten sind enzymatische, chemische, elektrochemische oder photochemische Verfahren zur Regenerierung und Wiederverwendung von NAD(P)H in einer enzymatischen Synthese entwickelt worden [Chenault & Whitesides, 1987; Kula & Wandrey, 1987; Hummel & Kula, 1989a; Fry et al., 1994; Bommarius & Drauz, 1995; Kragl et al., 1996, Seelbach et al., 1996, Wichmann et al., 2000, Rissom & Kragl, 2001]. Dabei stellen die enzymatischen Anwendungen die effizienteste Methode zur Coenzymregenerierung dar. Hervorzuheben ist die gekoppelte-Substrat-*in situ*-Regeneration, bei der ein Enzym gleichzeitig das gewünschte Produkt bildet und das Coenzym über eine zweite Reaktion regeneriert.

**Tabelle 4:** Auswahl an Coenzymen, die von ihnen übertragenen Gruppen bzw. ihre Funktion und die Beziehung zu Vitaminen [Lehninger, 1987].

Coenzym	Funktion Gruppenübertragung	Vitamin
Coenzym A	Acylgruppen	Pantothensäure
Coenzym B <sub>12</sub>	1,2-Verschiebung von Wasserstoffatomen	Vitamin B <sub>12</sub>
Flavin-adenin-dinukleotid (FAD)	Wasserstoffatom	Riboflavin
Flavinmononukleotid (FMD)	Wasserstoffatom	Riboflavin
Lipoyllysin	Wasserstoffatom Acylgruppen	Liponsäure
Nicotin-adenin-dinucleotid (NAD)	Wasserstoffatom	Nikotinsäure
Nicotin-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP)	Wasserstoffatom	Nikotinsäure
Pyridoxalphosphat	Aminogruppen	Pyridoxin
Tetrahydrofolsäure	C <sub>1</sub> -Gruppen	Folsäure
Thiamindiphosphat (ThDP)	Aldehydgruppen	Thiamin

**Tabelle 5:** Preise für Nicotinamid-Coenzyme

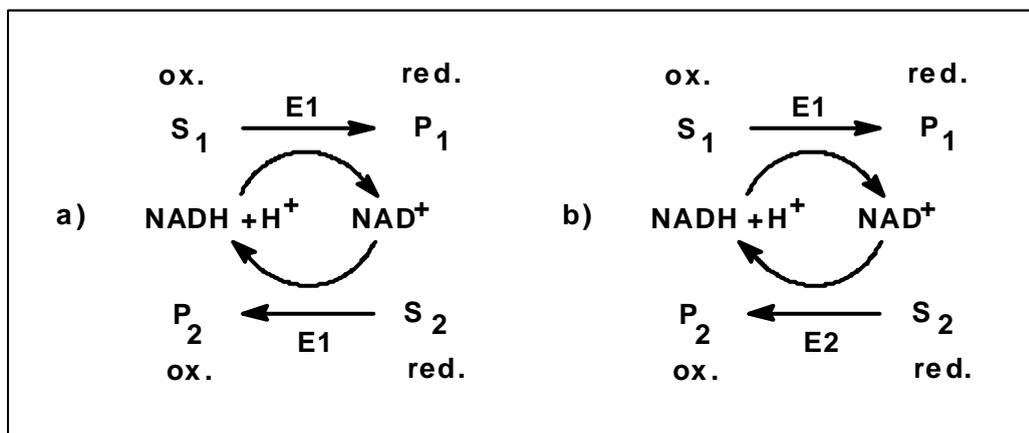
Coenzym	Preis/DM g <sup>-1</sup>	Preis DM/mol <sup>-1</sup>
NAD	31,-	20.520,-
NADP	295,-	232.170,-
NADH	98,-	69.390,-
NADPH	745,-	620.585,-

**Biomol-Katalog 00/01, die Preise würden bei größeren Abnahmemengen geringer ausfallen.**

Eine Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii* oxidiert Isopropanol S<sub>2</sub> zu Aceton P<sub>2</sub> und reduziert dabei das Coenzym, das bei der Reduktion von S<sub>1</sub> zu P<sub>1</sub> verbraucht wurde. [Keinan et al., 1987], (Abbildung 2 a). Eine weitere Coenzymregenerierung ist die gekoppelte-Enzym-*in-situ*-Regeneration, in der neben der gewünschten Synthesereaktion ein zweites Enzym das Coenzym durch die Oxidation eines zweiten Substrates reduziert. Diese Regenerierung wird von der Degussa AG

bei der Produktion von L-*tert*-Leucin durch reduktive Amidierung von Trimethylpyruvat im Enzym-Membran-Reaktor industriell angewandt [Kragl, 1992; Bommarius et al., 1995, Drauz & Waldman, 1996]. Dabei wird Trimethylpyruvat  $S_1$  durch eine Leucin-Dehydrogenase aus *Bacillus spec.* zu L-*tert*-Leucin  $P_1$  reduziert und der Cofaktor NADH durch die Formiat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii* (E.C.1.2.1.2) unter Oxidation von Formiat  $S_2$  zu Kohlendioxid  $P_2$  regeneriert [Wichmann et al., 1981], (Abbildung 2 b). Vorteile dieser Reaktion sind, daß das gebildete  $CO_2$  leicht abtrennbar ist, keine unerwünschten Nebenprodukte erzeugt werden und das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite des Kohlendioxids bzw. des reduzierten Coenzym liegt [Schütte et al., 1976]. Formiat ist relativ preisgünstig, stabil und gegenüber der Leucin-Dehydrogenase neutral. Ein Sonderfall der enzymgekoppelten Cofaktoregenerierung ist die Nutzung von zwei Enzymen, von denen das Produkt des Regenerierungsenzyms gleichzeitig das Substrat des Syntheseenzym ist. Untersucht wurde dieses Verfahren bei der Synthese von  $\alpha$ -Aminosäuren aus  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren in einem Zweistufenprozeß [Rissom, 1999].

Abbildung 4



Cofaktoregenerierungssysteme

- a) **Substratgekoppeltes Cofaktoregenerierungssystem**
- b) **Enzymgekoppeltes Cofaktoregenerierungssystem**

## 1.5 Klassifizierung von Enzymen

Je nach Art der katalysierten Reaktion wurden Enzyme durch die "International Union of Biochemistry" in sechs Klassen unterteilt. Die Klassifizierung erfolgt nach der Wirkungsspezifität der Enzyme über eine vierstellige EC-Nummer. Über 3700 Enzyme sind mittlerweile registriert, aber nur ca. 300 kommerziell zugänglich. Die Oxido-

---

reduktasen (Klasse 1) katalysieren die Übertragung von Reduktionsäquivalenten zwischen zwei Redoxsystemen, die Transferasen (Klasse 2) die Übertragung bestimmter Gruppen, wie z.B. Methylgruppen, von einem Molekül auf ein zweites. Auch die Hydrolasen (Klasse 3) übertragen bestimmte funktionelle Gruppen; Akzeptor ist in der Regel ein Wassermolekül. Lyasen (Klasse 4) katalysieren die Spaltung oder Bildung chemischer Bindungen, wobei Doppelbindungen entstehen oder gespalten werden. Die Isomerasen (Klasse 5) verschieben funktionelle Gruppen innerhalb eines Moleküls ohne das sich dabei die Bruttoformel des Substrats ändert. Die durch Ligasen (Klasse 6) katalysierten Verknüpfungsreaktionen sind energieabhängig und stets an die Hydrolyse von Nucleosidtriphosphaten gekoppelt. Die Enzyme der Klassen 1 - 5 sind die industriell bedeutendsten Biokatalysatoren.

## 1.6 Dehydrogenasen

Eine Unterklasse der mit ca. 1000 Einträge bei der "*International Unit of Biochemistry*" eingetragenen Oxidoreduktasen, sind die Dehydrogenasen. Sie katalysieren Redoxreaktionen, d.h. Umsetzungen, bei denen die Reaktionspartner Elektronen austauschen bzw. Übertragungen von Reduktionsäquivalenten zwischen Substraten und Coenzymen. Alle Oxidoreduktasen benötigen Coenzyme. Man unterteilt die Oxidoreduktasen in drei Kategorien [Reid & Fewson, 1994]. Die NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen, die NAD(P)-unabhängigen Dehydrogenasen, die  $F_{420}$  oder PQQ (Methoxatin) als Cofaktor verwenden [Widdel & Wolfe, 1989] und die hauptsächlich FAD-abhängigen Alkoholoxidasen. Reduktionsreaktionen ergeben einen oxidierten Cofaktor, der bei vielen bakteriellen Fermentationen der Antriebsfaktor der Reaktion ist [Clark, 1989]. Oxidationen, die in einem reduzierten Cofaktoren resultieren, sind hauptsächlich an anabolen Stoffwechselprozessen beteiligt. Die meisten Dehydrogenasen haben deshalb eine kinetisch bevorzugte Reaktionsrichtung. Der Reaktionsmechanismus konnte mittlerweile durch umfangreiche Untersuchungen und Vergleiche mit Daten der Kristallstruktur von der Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase (HLADH) geklärt werden [Bränden et al., 1975]. Bei der siebenstufigen Reaktion bindet NADH an der bei Nicotinamid-abhängigen Enzymen konservierten Bindungsdomäne [Rossmann et al., 1975]. Die Carbonylverbindung wird als zweites Substrat über das Sauerstoffatom am katalytischen Zink koordiniert. Die weiteren Liganden des Metallkations sind zwei Thiolgruppen von Cystein-46 bzw. -174 und ein Imidazol-Stickstoff des Histidins-67. Das Zinkatom polarisiert die Carbonylgruppe, so

---

daß das C-4 Wasserstoffatom des Nicotinamidringes als Hydrid zu dem sich in einer sterisch günstigen Lage angeordneten Carbonylkohlenstoffatom transferiert werden kann. Das Alkoholat wird durch Wasserspaltung protoniert und abgelöst, der reaktive  $Zn^{2+}OH$ -Komplex durch ein Proton zum  $Zn^{2+}OH_2$  umgesetzt. Der oxidierte Cofaktor  $NAD^+$  wird freigegeben. Die einzelnen Reaktionen können zu einem sogenannten geordneten *Bi-Bi*-Mechanismus zusammengefaßt werden [Cleland, 1963]. Die beiden Substrate werden dabei sowohl bei der Reduktions- als auch bei der Oxidationsreaktion in bestimmter Reihenfolge nacheinander gebunden und ihre Produkte freigesetzt. Diese Auslegungen wurden durch die Studien dieses Mechanismus zur der von der HL-ADH katalysierten Ethanoloxidation [Theorell, 1951] wie durch weitere Arbeiten bestätigt [Ford, 1993]. Es wird angenommen, daß dieser Mechanismus auch für andere  $NAD(P)H$ -abhängige Dehydrogenasen gilt, da z.B. für die Hefe-ADH I ein ähnlicher Mechanismus postuliert wurde [Ganzhorn et al., 1987; Jörnvall et al., 1978; Gould et al., 1990].

Pyridinnukleotid-abhängige Oxidoreduktasen zeichnen sich durch ihre Stereospezifität aus. Sie katalysieren den reversiblen Transport von Hydrid-Ionen von einem Substrat auf die Position  $C_4$  des Pyridinringes von  $NAD^+$ . Viele Oxidoreduktasen können zwischen den beiden diastereotopen Methylenatomen an der Position 4 des Dihydropyridins unterscheiden [Arnold et al., 1976]. Daher teilt man Oxidoreduktasen in zwei verschiedene Klassen ein; die A-(pro-*R*) spezifischen und die B-(pro-*S*) spezifischen Enzyme [Prelog, 1964]. Eine ganze Reihe an stereospezifischer Biokatalysatoren sind bekannt und kommerziell erhältlich. Zu ihnen gehören die z.B. (*R*)-spezifische  $NADPH$ -abhängigen Alkoholdehydrogenasen aus *Lactobacillus kefir* [Hummel et al., 1989c; Hummel, 1990] und *Lactobacillus brevis* [Hummel, 1997; Hummel et al., 2000] sowie (*S*)- und (*R*)-spezifische  $NADH$ -abhängige Enzyme aus *Candida boidinii* [Schütte et al., 1982]. Auch wenn Enzyme, die keine Cofaktoren benötigen, in der asymmetrischen Synthese das größere Interesse besitzen, hat die Bedeutung der Dehydrogenasen in der industriellen Produktion trotz des erforderlichen Einsatzes von Coenzymen an Bedeutung gewonnen [Carrea & Riva, 1986; Hummel & Kula, 1989a; Kula & Kragl, 2000]. Durch die substrat- und vor allen Dingen enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung werden für die Präparation optisch aktiver Hydroxysäuren und Aminosäuren Biokatalysatoren wie die L- oder D-Hydroxyisocaproinsäure Dehydrogenasen [Bradshaw et al., 1991; Hummel et al., 1984], L-Phenylalanin Dehydrogenase [Hummel et al., 1988] oder die Leucin-Dehy-

---

drogenase aus *Bacillus sphaericus* [Bommarius et al., 1995] erfolgreich eingesetzt. Der Cofaktor bleibt bei diesen Verfahren stabil über einen längeren Zeitraum erhalten [Janssen et al., 1987; Wong & Whitesides, 1981] und wird bei der enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung mit Formiat kostengünstig regeneriert [Wichmann et al., 1981].

## 1.1 1.7 **CPCR**

Ein Enzym, das sowohl mit Substrat- als auch mit Enzym-gekoppelter Cofaktorregenerierung von NADH eingesetzt werden kann, ist die zur Klasse 1 der Oxidoreduktasen zugehörige CPCR. Diese Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR, EC 1.1.1.1.) wurde im Rahmen eines Screening von Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit Ketoester zu reduzieren, gefunden und 1992 von Peters et al erstmals beschrieben [Peters et al. 1992]. Der natürliche Wirtstamm der CPCR (*Candida parapsilosis*; DSMZ 70125) ist eine weit verbreitete, echte Hefe.

Die CPCR ist das erste NADH-abhängige Enzym, das prochirale  $\beta$ -Ketosäureester stereoselektiv zu den (S)-Enantiomeren mit hoher Enantiomerenreinheit von  $\geq 99,5$  % reduziert wie auch Hydroxyverbindungen oxidiert [Peters et al., 1993]. Analog zu dem Modell der sekundären Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii* (TB-ADH) [Keinan et al., 1987] besitzt die Carbonylreduktase zwei hydrophobe Bindungsstellen, die sich in Affinität und Größe unterscheiden. Daraus kann man schlußfolgern, daß eine Seitenkette der Carbonylgruppe eine kleine Bindungsstelle hat, während die zweite Bindungsstelle groß und hydrophob ist. Die CPCR transferiert das Hydrid mit hoher Enantioselektivität auf die *re*-Seite des Carbonylkohlenstoffs, wobei (S)-Enantiomere entstehen (Peters et al., 1992, 1993], (Abbildung 3).

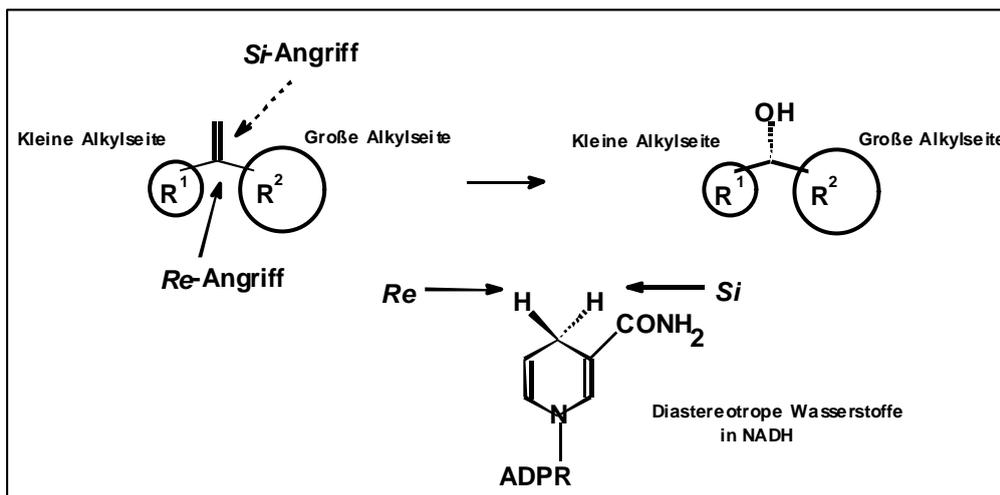


Abbildung 3

Hypothetische Struktur der CPCR-Substratbindungsstelle.

**ADPR: Adenosin-5'-diphosphatribose.**

Inwieweit die CPCR zwischen der *re*- und *si*-Seite des Substrats unterscheiden kann, drückt sich im Enantiomerenüberschuß (*ee*) aus. Als *ee*-Wert bezeichnet man den Überschuß des vornehmlich gebildeten Enantiomers gegenüber dem untergeordnet gebildeten Enantiomer. Ein Racemat hat einen *ee*-Wert von 0 %; industrielle Produkte sollten über einen *ee*-Wert von > 95 % verfügen [Stinson, 1993].

$$ee = \frac{E_S - E_R}{E_S + E_R} * 100 \%$$

$E_S$ : Konzentration des (S)-Enantiomers

$E_R$ : Konzentration des (R)-Enantiomers

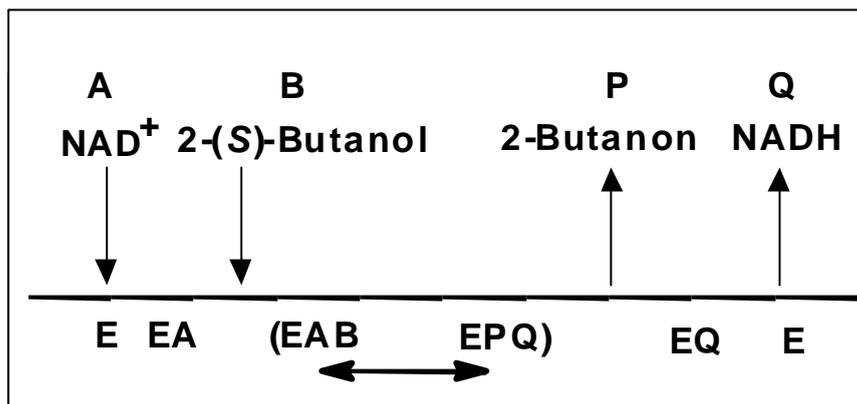
Eine Auswahl der *ee*-Werte von einigen durch die CPCR synthetisierten Hydroxyverbindungen zeigt Tabelle 3 (folgende Seite), [Peters et al., 1993].

Der Reaktionsmechanismus der CPCR wurde durch eine Studie der Anfangsgeschwindigkeits- und Produktinhibitionsmuster untersucht [Peters et al., 1993]. Daraus ergab sich, daß die Enzymreaktion einem geordneten *Bi-Bi*-Mechanismus folgt [Cleland, 1963]. Abbildung 4 zeigt analog zu dem Modell des geordneten *Bi-Bi*-Mechanismus am Beispiel der Umsetzung von 2-(S)-Butanol zu 2-Butanon wie zunächst der Cofaktor und dann der Alkohol an das Enzym bindet. Darauf folgend ver-

Tabelle 6: **Stereochemie einiger Produkte der Reduktionsreaktion der CPCR**

Produkt	(S)-Enantiomer
3-Hydroxybutansäuremethylester	99 %
4-Hydroxypentansäureethylester	100 %
5-Hydroxyhexansäureethylester	100 %

läßt das Produkt dieser Enzymreaktion das Enzym vor dem Cofaktor. Die Reaktion findet nur dann statt, wenn beide Substrate gleichzeitig am Enzym gebunden sind.\_\_\_\_\_



**Abbildung 4**

Sequentieller *Bi-Bi*-Mechanismus der *CPCR*.

Das erste Substrat  $\text{NAD}^+$  (A) bindet an die *CPCR* (E) + (A)  $\rightleftharpoons$  (EA), gefolgt vom 2. Substrat 2-(S)-Butanol (B)  $\rightleftharpoons$  (EAB). Nach dem Hydridtransfer (EAB)  $\rightleftharpoons$  (EPQ) wird zuerst 2-Butanon (P) freigesetzt, danach das reduzierte Coenzym NADH (Q) [Cleland, 1963].

Die NADH-abhängige *CPCR* kann bei Synthesen sowohl mit dem enzym- als auch mit dem substratgekoppelten Cofaktorregenerierungssystem eingesetzt werden. Bei der substratgekoppelten Regenerierung wird die Alkoholdehydrogenase-Aktivität der *CPCR* genutzt und als zweites Substrat Isopropanol eingesetzt, welches die Carboxylreduktase bis zu einer Konzentration von 10 % (v/v) tolerieren kann [Peters et al., 1993]. Die enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung wird mit der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* durchgeführt [Wichmann et al., 1981]. Die Kosten einer industriellen Biotransformation mit der *CPCR* werden außer durch den Einsatz der Regenerierungssysteme auch durch Verwendung von NADH anstelle NADPH erheblich reduziert. Eine weitere Verminderung erfolgt durch den Start der Reaktion mit  $\text{NAD}^+$  anstelle NADH.

Neben der Stereospezifität und der NADH-Abhängigkeit zeichnet sich die *CPCR* durch ein breites Substratspektrum aus. Es sind bereits an die 100 Substanzen bekannt, die von dem Enzym umgesetzt werden. Neben den Ketoestern wie 5-Oxohe-xansäureethylester werden z.B. aliphatische und aromatische Ketone wie auch Diketone, Ketoacetale, Aldehyde und Alkohole umgesetzt. Ketosäuren werden nicht als Substrate akzeptiert (Abbildung 5). Es wird angenommen, daß für die Aktivität der Carbonylreduktase ein kleiner Rest, wie z. B. Methyl, an der einen Seite des zu reduzierenden Carbonyl-Kohlenstoffs eine wichtige Rolle spielt, während die Beschaffenheit des anderen Restes flexibler ist [Peters *et al.*, 1993]. Viele der Produkte der Carbonylreduktase sind für die Synthese von Pharmaka, Naturstoffen und Agrochemikalien verwendbar. So können mit Hilfe der *CPCR* Intermediate hergestellt werden, z. B. für die Synthese von Desoxyzucker. Desoxyzucker können im biologischen System als Glycosidase-Inhibitoren [Fleet & Ramsden, 1990], als Bestandteil von Sekundärmetaboliten [Marcinowski & Grisebach, 1978] wie auch als unnatürliche Substrate von Glycosyltransferasen wirken. 3-Hydroxybuttersäuremethylester und 3-Hydroxyhexansäureethylester können z. B. bei der Herstellung von Pheromonen,  $\beta$ -Lactam-Intermediaten und natürlichen Makroliden benutzt werden [Peppe, 1992].

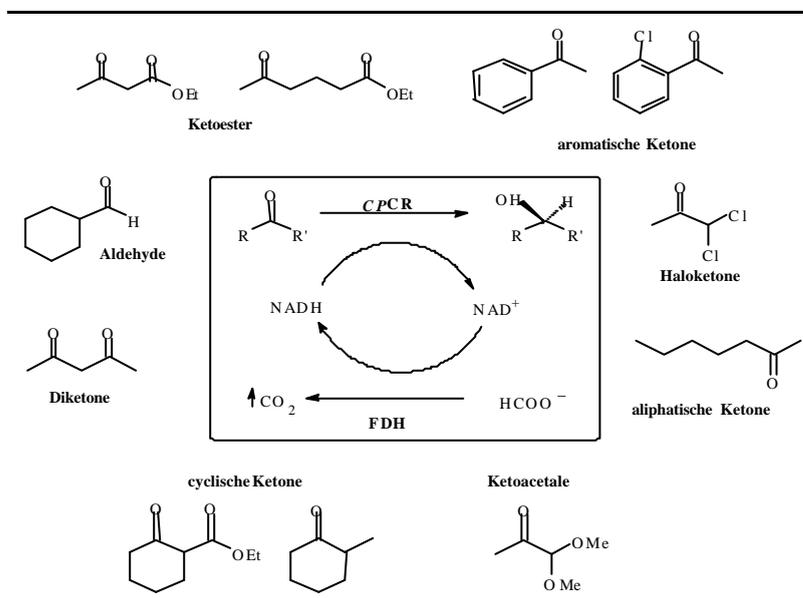


Abbildung 5  
 Überblick über das Substratspektrum der *CPCR*.

Die entsprechenden  $\beta$ -Ketosäureester werden von der *CPCR* umgesetzt. Auch die Reduktion von 2,5-Hexandion zu (2*S*,5*S*)-Hexandiol ist mit der Carbonylreduktase durchführbar [Rissom, 1999], da beide Carbonylverbindungen von der *CPCR* zum (*S*)-Alkohol umgesetzt werden. Das Produkt wird bei der Synthese chiraler Liganden für Homogenkatalysatoren verwendet, bei denen sie als Träger der chiralen Information eingesetzt werden [Chen & Sih, 1990] (Abbildung 6, folgende Seite).

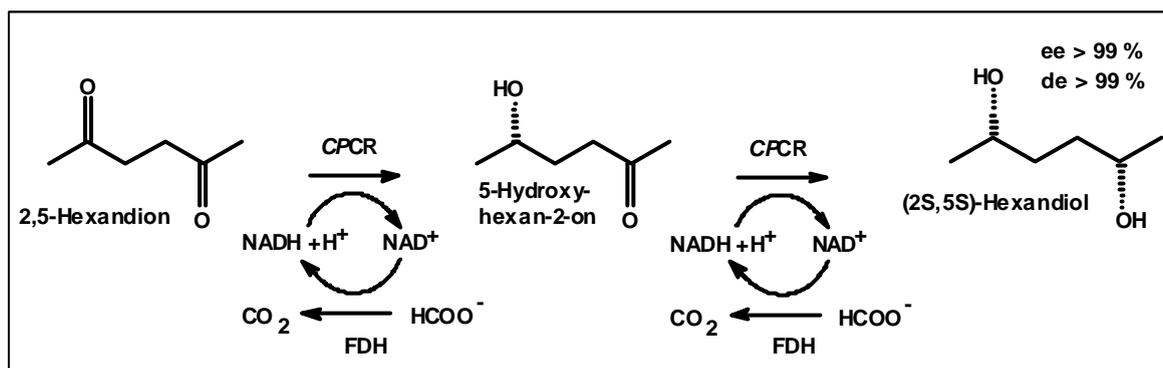


Abbildung 6

Reaktionsschema zur Herstellung von (2*S*,5*S*)-Hexandiol.

Weitere Anwendungen der *CPCR* wurden von *Peters et al.*, 1993; Kragl, 1997; *Liese & Zelinski*, 1997; *Liese et al.*, 1998; *Schubert et al.*, 1999; *Schubert et al.*, 2001 (*in press*) beschrieben.

Die *CPCR* aus *Candida parapsilosis* wurde mittels fraktionierter PEG-Fällung, Anionenaustauscher- und Affinitätschromatographie aufgereinigt und biochemisch charakterisiert [Peters *et al.*, 1993]. Durch Gelfiltration wurde ein Molekulargewicht von 135 kDa für die native *CPCR* bestimmt, die aus zwei Untereinheiten mit den scheinbaren Molekularmassen von 65 kDa (SDS-PAGE) besteht. Der  $pI$  wurde bei 6,8 ermittelt. Inhibitionsstudien zeigten, daß die Carbonylreduktase von verschiedenen Metallkationen unterschiedlich stark inhibiert wurde. Auch starke Komplexbildner wie  $\sigma$ -Phenanthrolin oder 2,2'-Bipyridyl bewirkten eine komplette Inhibition der *CPCR*, während Chelatoren wie EDTA oder DTT keine Wirkung auf das Enzym hatten. Dies sprach dafür, daß ein oder mehrere Metallkationen für die Katalyse oder Stabilität der *CPCR* wichtig sind. Sulfhydryl-Schutz-Reagenzien wie DTT oder reduziertes Glutathion zeigten keinen Einfluß auf die Carbonylreduktase, während Sulfhydryl-Reagenzien wie *p*-Hydroxymercurbenzoat oder 5,5'-Dithio-bis(2)-nitrobenzoat die *CPCR*

---

bei einer Konzentration von 1 mM innerhalb 30 min vollständig inhibierten. Dies ließ auf das Vorhandensein essentieller SH-Gruppen für die Bildung von funktionsrelevanten S-S Brücken schließen, allerdings konnten keine Aussagen über die Lokalisation der Disulfide gemacht werden [Peters *et al.*, 1993]. Das pH-Optimum der Reduktions bzw. Oxidationsreaktion liegt zwischen pH 7,8 - 8 bzw. 9,5, das Temperaturoptimum zwischen 36 – 40 °C und 50 – 56 °C. Die Reduktionsreaktion weist eine Aktivierungsenergie von 42 kJ/mol, die Oxidation von 28 kJ/mol auf. Die Reduktionsreaktion wird prinzipiell bevorzugt. Die physiologische Bedeutung der *CPCR* in der Hefe konnte nicht geklärt werden. Oxidoreduktasen sind hauptsächlich an der Glykolyse, am Acetoin- und Diacetyl-Metabolismus, dem Vitaminstoffwechsel, 2-Oxaldehyd-Metabolismus und dem Fettsäure-Metabolismus beteiligt [Ward & Young, 1990]. Obwohl keine Ähnlichkeiten mit bereits isolierten Reduktasen oder Dehydrogenasen vorhanden waren, vermuteten Peters *et al.*, 1993, daß die *CPCR* eine Funktion innerhalb des Fettsäure-Stoffwechsels ausüben könnte [Peters *et al.*, 1993]. Gründe dafür lieferten die Ergebnisse, daß die *CPCR* einer gewissen Glucose-Repression unterliegt und insbesondere durch Wachstum auf Dodecansäure (*n*-Alkanabbau,  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren) induzierbar ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten eine deutliche Zunahme des Peroxisomenvolumens bei Wachstum auf Glycerin oder Dodecansäure gegenüber einem Wachstum auf Glucose. Die Peroxisomen sind Organellen, in denen u.a. die  $\beta$ -Oxidation, bei eukaryotischen Zellen stattfindet. Die Aktivität der Katalase, dem Leitenzym der Peroxisomen, stieg proportional zu der *CPCR* Aktivität bei Anzucht auf Glycerin oder Dodecansäure an. Außerdem ist bekannt, daß Hydroxycarbonsäuren im Lipid-Anteil extrazellulärer Glykoproteine bei verschiedenen *Candida*-Arten vorkommen [Rapp, 1992].

---

## 1.2 1.8 Motivation und Zielsetzung

Chirale Verbindungen sind wertvolle Bausteine für die Synthese von Pharmaka, Agrochemikalien, Enzyminhibitoren und Naturstoffen. Zur Synthese dieser Produkte sind insbesondere solche Oxidoreduktasen interessant, die über eine hohe Enantioselektivität und ein breites Substratspektrum verfügen.

Die Darstellung chiraler  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -Hydroxysäuren bzw. -ester erfolgt heute immer noch hauptsächlich durch mikrobielle Reduktionen mit Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), [Poppe, 1992]. Allerdings zeigt z. B. die ADH I nur gute Umsätze mit Aldehyden zu (S)-Alkoholen [MacLeod et al., 1964] und ihr Substratspektrum ist begrenzt. Dazu kommen Instabilität gegenüber Hitze und organischen Lösungsmitteln [Dickinson & Dalziel, 1967]. Andere bekannte Carbonylreduktasen brauchen NADPH als Cofaktor [Shieh, 1987] und sind somit ausgesprochen kostenintensiv bei der industriellen Anwendung.

Aufgrund des breiten Substratspektrums, der (S)-Enantioselektivität und der NADH-Cofaktorabhängigkeit wäre eine industrielle Anwendung der CPCR von großem Interesse. Da das Enzym aber nur in geringen Mengen im Wildstamm von *Candida parapsilosis* vorkommt ( $< 0,03$  % des Gesamtzellproteins), muß zur industriellen Anwendung die ausreichende und wirtschaftliche Verfügbarkeit des Biokatalysators gewährleistet sein.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Voraussetzung für den Einsatz des Enzyms im technischen Bereich durch Klonierung und heterologe Überexpression der CPCR in einem geeigneten Wirt, vorzugsweise *E.coli*, geschaffen werden. Dazu wurde die Methode der reversen Genetik gewählt. Ausgehend vom homogen aufgereinigten Enzym sollte die Proteinsequenz ermittelt und daraus die DNA-Sequenz abgeleitet werden. Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) sollte folgend das komplette CPCR-Gen amplifiziert und kloniert werden. Verschiedene Expressionssysteme sollten in *E.coli* getestet und optimiert und die rekombinant vorliegende Carbonylreduktase biochemisch charakterisiert werden.

Des Weiteren sollten Kultivierungsversuche zur optimalen Bereitstellung des Biokatalysators erfolgen (Abbildung 7).

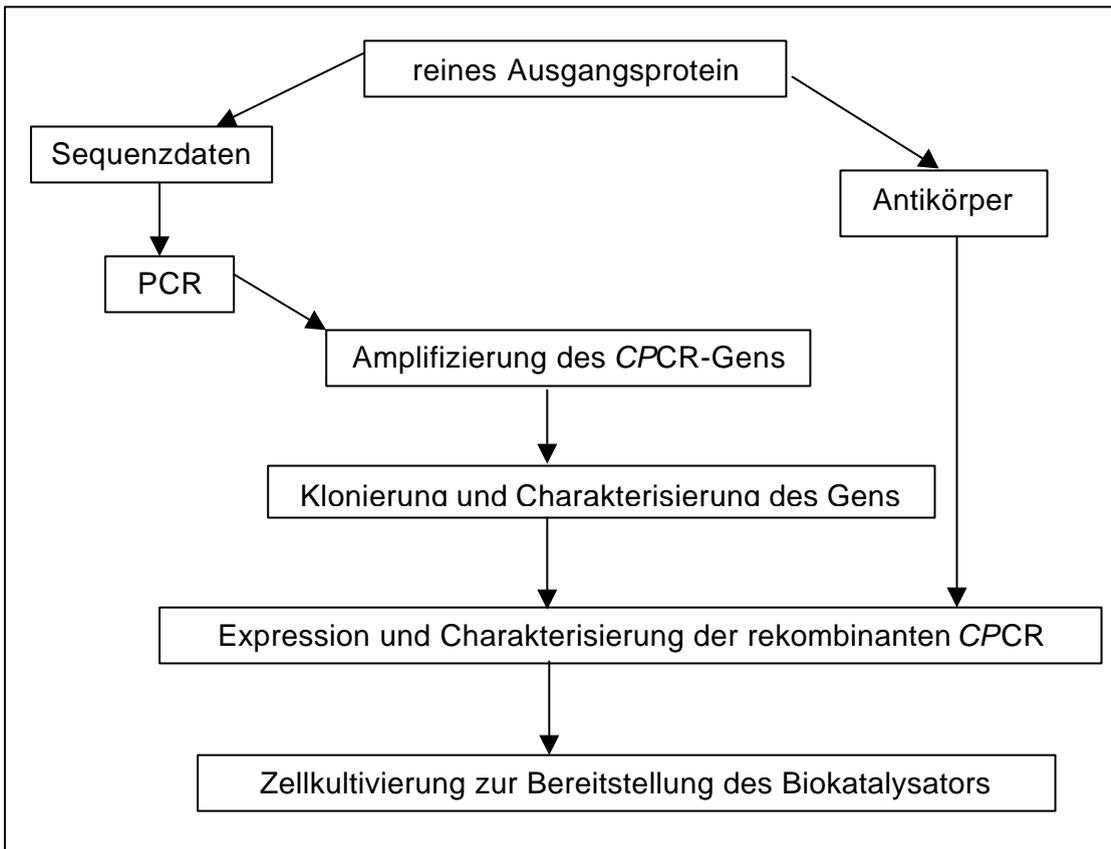


Abbildung 7  
Vom Wildtypenzym zur rekombinanten CPCR.

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### Analytik

- DNA-Agarose Gelkammern/Biozym, Hessisch-Oldendorf
- Dual Gel Caster/Hoefer Instruments, Freiburg
- E.coli* Pulser/Bio-Rad, München
- 0,2; 0,45 µm Filter/Sartorius, Göttingen
- Gradientenmischer/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg
- Hamiltonspritze/Hamilton, Darmstadt
- Kryoröhrchen/Nunc, Nidderau
- MALDI-TOF-MS/Universität Düsseldorf
- Mikrotiterplatten-Flachboden/Schott, Feldbach, Schweiz
- Mikrowelle/Micromat, Dresden
- Nitrocellulose/Millipore, Eschborn
- Novablot 211/ Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg
- Nylonmembran/ Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg
- PCR Automat/Biometra, Göttingen
- pH-Stat 763 Multicalimat/Knick, Weilheim
- Power Supply Modul 1000/500/Bio-Rad, München
- Power Supply/Hoefer Instruments, Freiburg
- Protean TMIJ/Bio-Rad, München
- Protein Sequenzer/Applied Biosystem, München
- PVDF-Membran/Millipore, Eschborn
- Robocycler/Stratagene, Heidelberg
- Sterilbank ultra clean/Weiss Technik, Fischen
- Thermostat/Eppendorf, Hamburg
- Thermostatic Circulator/Eppendorf, Hamburg
- Trockenschrank/Memmert, Schwabach
- Ultrafiltrationsmodul Amicon/Amicon, Eschborn
- UV-Spektrophotometer/Shimadzu, Duisburg
- UV-Spektrometer DU 650/Beckmann, München
- UV-Transilluminator/Stratagene, Heidelberg
- Varioklav Autoklav/H+P Labortechnik, Oberschleißheim
- Waage/Sartorius, Göttingen
- Whatman-Papier/Schleicher&Schüll, Göttingen

##### Bildverarbeitung

- Eagle Eye II/Stratagene, Heidelberg
- Luminograph/Berthold, Bad Wildbad

##### Chromatographie

- ÄKTA/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg
- DEAE-Säulen/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg
- Fraktionssammler FRAC-300/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg
- HPLC/Dionex, Germering
- Nucleosil RP C<sub>8</sub>/Macherey&Nagel, Düren
- Peristaltic Pumpe P1/ Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg
- Schreiber/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg
- Sephadex G 50/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg
- Sephadex G-75, 200/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg
- Single Path Monitor UVI/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg

---

## Zellkultivierung und Zellaufschluß

- AnzuchtKolben (+/- Schikane)/Faust, Aachen
- 10, 30 l Biostat/Braun, Crissier, Schweiz
- Brutschrank/Memmert, Schwabach
- 300 l Fermenter/Chemat, Recklinghausen
- Disintegrator S/IMA, Neu-Isenburg
- Glasperlen 0,25-0,5 µm Durchmesser/Roth, Karlsruhe
- Mikroskop Axioplan/Zeiss, Jena
- Kugelmühle LME05/Netzsch, Selb
- pH- und Sauerstoffelektrode/Mettler Toledo, Giessen
- Schüttler/Infors AG, Bottmimen, Schweiz
- Ultraschall/Bandelin Electronics, Berlin

## Zentrifugation

- Contifuge 300 MD/Heraeus Christ, Hanau
- Kammerseparator Typ KA6/Westfalia, Oelde
- Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B/DuPont, Bad Homburg
- Tischzentrifuge/Eppendorf, Hamburg
- Vakuumszentrifuge Speed Vac/Uniequip, Martinsried

### **2.1.2 Chemikalien/Enzyme**

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A. Qualität. Falls nicht anders vermerkt, wurden sie von den folgenden Firmen bezogen: Applied Biosystems/München; Bio-Rad/München; Biomol/Hamburg; Biozym/Karlsruhe; Difco/LePont de Claix (Frankreich); Faust/Aachen; Fluka/Neu-Ulm; Gibco/Karlsruhe; MBI Fermentas/Vilnius (Litauen); Merck/Darmstadt; Amersham Pharmacia Biotech/Freiburg; Roche Diagnostics/Mannheim; Roth/Karlsruhe; Serva/Heidelberg; Sigma-Aldrich/Deisenhofen. Die eingesetzten Enzyme für die Molekularbiologie stammen von Stratagene/Heidelberg; Biolabs/Schwalbach und Roche Diagnostics/Mannheim. Die angesetzten Lösungen beziehen sich, falls nicht anders vermerkt, auf 1000 mL, aufgefüllt mit Aq. dest.

### **2.1.3 Kits**

- Diabur Glucose-Test 500 / DIG Glycan Detection Kit / DIG Hybridization Kit / DIG-Labeling Kit / Rapid Ligation Kit / High Pure PCR Product Purification Kit / Roche Diagnostics / Mannheim
- ECL<sup>R</sup>-System/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg
- Nucleo Spin Kit / Macherey & Nagel, Düren
- QIAgen Plasmid Midi Kit / QIAprep Spin Miniprep Kit / QIAquick Gel Extraction Kit / Qiagen, Hilden
- SureClone* Kit / Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

## 2.1.4 Mikroorganismen

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Mikroorganismen

Stamm	Literatur	Vertrieb	Genotyp
<b><i>Candida parapsilosis</i> DSMZ70125</b>	[Ashford, 1932]	DSMZ, Braunschweig	--
<b><i>E.coli</i> AD494</b>	[Phillips et al., 1984]	Novagen, Darmstadt	[trxB hsdS gal ( $\lambda$ clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5)]
<b><i>E.coli</i> BL21</b>	[Studier, 1991]	Novagen, Darmstadt	[hsdS gal ( $\lambda$ clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5)]
<b><i>E.coli</i> DH5a/</b>	[Vieira & Messing, 1982]	Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg	[(supE44 $\Delta$ lacU169 $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15)hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1]
<b><i>E.coli</i> HB101</b>	[Hanahan, 1983]	Roche Diagnostics, Mannheim	[supE44 hsdS20( $r_B^- m_B^-$ )recA13 ara-14 proA2 lacY1galK2 rpsL 20xyl-5mtl-1]
<b><i>E.coli</i> JM105</b>	[Yanish-Perron et al., 1985]	Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg	[supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL(Str <sup>r</sup> ) thi $\Delta$ (lacproAB) F'(traD36 proABlac <sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15)]
<b><i>E.coli</i> JM109</b>	[Reha-Krantz, 1985]	Stratagene, Heidelberg	[recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi $\Delta$ (lacproAB)F'(traD36proA B <sup>+</sup> lac <sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15)]
<b><i>E.coli</i> XI1Blue</b>	[Bullock et al., 1987]	Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg	[supE44 hsdR R17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac <sup>-</sup> F'(proAB <sup>+</sup> lac <sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15 Tn10(tet <sup>r</sup> )]

## 2.1.5 Vektoren

- pBTac2/Roche Diagnostics, Mannheim 4,570 kb, *ColE1*-Replikon, *lacZ'*, *lac1*,  $P_{tac}$ ,  $Amp^R$
- pKK223-3/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg 4,584 kb, *ColE1*-Replikon,  $P_{tac}$ ,  $Amp^R$
- pET15b/Novagen, Darmstadt 5,708 kb, *ColE1*-Replikon,  $Amp^R$
- pTrc99a/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg 4,176 kb, *ColE1*-Replikon,  $P_{trc}$  *lac1<sup>q</sup>*,  $Amp^R$
- pUC18/Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg 2,686 kb, *ColE1*-Replikon, *lacZ'*, *lac1*,  $Amp^R$

---

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Stammhaltung/-lagerung

Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurden Aliquots von allen verwendeten Ausgangsmikroorganismen und deren Derivaten entnommen, um Stammkulturen zur Animpfung, Langzeithaltung und zur Archivierung herzustellen. Nach 35 % (v/v) Zugabe von sterilem 86 % Glycerin wurden die Glycerolstocks in sterilen Kryoröhrchen bei – 80 °C aufbewahrt. Zur kurzzeitigen Lagerung und Verwendung wurden die Stämme als Einzelkolonien auf Agarplatten ausgestrichen und kultiviert. Nach Inkubation der Hefekulturen bei 30 °C und der *E.coli*-Stämme bei 37 °C über Nacht im Brutschrank, wurden die Platten bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Unter diesen Bedingungen waren die Platten 6 - 8 Wochen haltbar.

### 2.2.2 Zellkultivierungen

Alle Medien wurden 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien ca. 1,8 % Agar zugesetzt. Nach der Sterilisierung wurde dem LB-Medium über 0,2 µm Filtermembranen sterilfiltrierte Antibiotikälösungen zugefügt.

#### 2.2.2.1 Zellkultivierung im Schüttelkolben

*-Candida parapsilosis*

100 mL, 500 mL, 1 L und 2 L Kulturen wurden mit Einzelkolonien von Agarplatten, oder mit 0,1 - 5 Vol % Vorkulturen angeimpft und ü/N bei 30 °C, 160 UPM im Schüttler kultiviert (Wachstumsoptimum nach [Barnett et al., 1979]). Die Schüttelkolbenkulturen wurden in der Regel als Inokula für nachfolgende Zellkultivierungen zur Produktion von Biomasse verwendet, die die wtCPCR enthielt.

-wtCPCR-Hefemedium [Guerin et al., 1982]	2 % (w/v) Glycerin	1 % (w/v) Hefeextrakt
	0,12 % (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 % (w/v) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,1 % (w/v) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 4,5/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

*-Escherichia coli*

*E.coli*-Stämme wurden im 50 - 400 mL Maßstab (Schüttelkolben/+Schikane) mit Einzelkolonien von Agarplatten, oder mit 0,1 - 3 Vol % Vorkulturen angeimpft und bis zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase bei 37 °C, 160 UPM ü/N kultiviert.

Diese Kultivierung wurde angewendet, um ausreichend Vektormaterial für die Klonierung des *CPCR*-Gens zu gewinnen (↪2.4.16) oder um Klone auf das Vorhandensein des Vektor/*CPCR*-Konstrukts (↪2.4.8) zu überprüfen bzw. um kompetente Zellen herzustellen (↪2.4.12). Den Medien der *E.coli* - Stämme, die aufgrund von Vektorinsertionen über Antibiotikaresistenzen verfügten, wurde nach dem Autoklavieren 100 µg sterilfiltriertes Ampicillin pro mL LB - Medium zugefügt. *E.coli*-AD494 besitzt eine eigene Neomycin/Kanamycin Plasmidresistenz; bei der Anzucht wurden 20 µg Neomycin oder 50 µg Kanamycin und 100 µg Ampicillin pro mL LB - Medium bei Vektorinsertion zugegeben.

-LB-Medium [Sambrock, 1989]	1 % (w/v) Trypton	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	1 % (w/v) NaCl	pH 7 / NaOH

-Anzucht auf M9-Minimalmedium zur Überprüfung des F'-Plasmids

*E.coli* Glycerinstocks wurden für 48 h bei 37 °C auf M9-Minimalagarplatten kultiviert. Das Vorhandensein von Kolonien läßt auf eine Existenz des F'-Plasmids beim dem zu testenden *E.coli* Klon schliessen.

-M9Minimalmedium [Sambrock, 1989]	6 % (w/v) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 % (w/v) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1 % (w/v) NH <sub>4</sub> Cl	0,5 % (w/v) NaCl
	0,003 % (w/v) CaCl <sub>2</sub>	pH 7 / NaOH

-Expression der *recCPCR* in *E.coli*

Die in verschiedenen *E.coli*-Stämmen hergestellte rekombinante *CPCR* wurde in 5 - 100 mL LB<sub>amp</sub>-Kulturen bei 37 °C und 160 UPM ü/N produziert. Gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurde frisches LB<sub>amp</sub>-Medium mit 3 Vol % der Übernachtskulturen zur Expression der Carbonylreduktase überimpft. Zur Überprüfung und Optimierung der Expression wurden die Kulturen bei einer OD<sub>550</sub> von 0,4 - 0,5 mit verschiedenen Konzentrationen von 0 - 2 mM IPTG versetzt. Dem Produktionsstamm pBTacrec*CPCR*JM105 (*recCPCR*) wurde im Schüttelkolben bis zu 2 L Kulturvolumen 0,75 mM und im Fermenter ab 8 L LB<sub>amp</sub>-Medium 1 mM IPTG zugegeben. Die Produktionsstämme wurden bei 30 °C kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte 4 - 6 h nach IPTG-Zugabe durch Pelletierung bei 4 °C, 5 min, 5000 UPM (SS34-Rotor-Sorvall/Tischzentrifuge) Die Überprüfung aller *recCPCR* Klone erfolgte im 5 mL Reagenzglasmaßstab (↪2.3.3). Die optimierten Anzuchtbedingungen wurden in 500 mL Schüttelkolben/+Schikane mit 100 mL LB<sub>amp</sub>-Medium übertragen.

---

### 2.2.2.2 Zellkultivierungen im Fermenter

Alle Medien wurden automatisch im jeweiligen Fermenter 20 min bei 121 °C autoklaviert und der pH nach dem Abkühlen auf die Kultivierungstemperatur eingestellt. Antibiotika und Zusatzlösungen wurden mit 0,2 µm Filtermembranen sterilfiltriert und über Zuspritzventile dem Medium zugegeben. Als Inokula wurden Schüttelzellkultivierungen verwendet. Das Wachstum der Zellen wurde über die OD bestimmt und durch das Redoxpotential, den Sauerstoffpartialdruck, die Abgasanalytik (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>), den pH-Wert und durch eine Trübungssonde fortwährend kontrolliert. Das Ende der Kultivierung wurde durch Bestimmung der Wachstumsrate und durch den Verlauf des Sauerstoffpartialdruck pO<sub>2</sub> in der Lösung festgelegt. Nahm die Wachstumsgeschwindigkeit ab, so stieg der pO<sub>2</sub>-Druck an. Am Ende der Kultivierungen wurden die Zellsuspensionen auf 4 °C gekühlt und geerntet. 10-30 L Zellsuspensionen wurden in einer Contifuge bei 4 °C, 11000 UPM abzentrifugiert, 300 L in einem Kammerseparator bei RT, 8530 UPM geerntet. Bei HZD-Fermentationen erfolgte die Ernte portionsweise durch Pelletierung bei 10000 UPM, 5 min (GSA/GS3 Rotor, Sorvall).

#### -Batch-Kultivierungen von *Candida parapsilosis*

Um größere Mengen an wtCPCR aus der Hefe zu erhalten, wurden die Hefezellen in 10 L bzw. 30 L Fermenter angezogen. Die 20 L Kulturen wurden auch als Inokula für den 200 L Ansatz verwendet. Die 200 L Zellkultivierung war ein „Scale-up“ der 20 L Fermentation und wurde mit 5 Vol % dieser Kultivierung angeimpft. Die Parameter wurden entsprechend übernommen. Die Zuluft wurde in diesem System variiert.

#### -Batch-Kultivierungen des Produktionsstammes pBTacrecCPCRJM105

Batch-Kultivierungen des Produktionsstammes (recCPCR) wurden im 30 L Fermenter mit 20 L LB<sub>amp</sub>-Medium bei 30 °C durchgeführt. Die Wachstumsbedingungen wurden den optimierten Bedingungen aus der Schüttelkolbenkultivierung angeglichen bzw. aus anderen *E.coli*-Zellkultivierungen zur Erzeugung rekombinanter Proteine abgeleitet [Fieschko & Humphrey, 1983]. Bei einer OD<sub>550</sub> von 0,4 - 0,6 wurde der Ansatz mit 1 mM sterilfiltrierten IPTG induziert. Gegen Ende der Wachstumsrate, nach ca. 4 - 6 h wurde die Rührleistung auf 500 UPM erhöht und bei einer OD von 4 - 5 erneut 1 mM IPTG zugegeben. Dies diente einer Steigerung der Enzyymbildung gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase.

#### -HZD-Zellkultivierung des Produktionsstammes pBTacrecCPCRJM105

Zur Erhöhung der Biomasse bzw. des Anteils an recCPCR wurden Hochzelldichtekultivierungen durchgeführt. 10 L steriles HZD-Medium wurde mit 3 % Vol Inokulum

einer Übernachtskultur des Produktionsstammes pBTacrecCPCR JM105 angeimpft und so lange bei 30 °C, 500 UPM, pH 7,0 und  $pO_2 > 20\%$  im „Batch“ kultiviert, bis keine Glucose mehr im Medium vorhanden war. Der Nachweis auf Glucose erfolgte mit Teststäbchen (Diabur Test 5000/Roche Diagnostics, Mannheim), die entsprechende Farbumschläge bei Glucose-An- und -abwesenheit zeigten. Nach Verbrauch der Glucose wurde vom „Batch“- in das „Fed-Batch“- Verfahren gewechselt; den Zellen wurde 5 L einer „Nährlösung“ („Feed“-Lösung) zugeführt. Die Induktion der recCPCR mit 1 mM IPTG erfolgte, nachdem 1 L der „Feed“-Lösung verbraucht war bzw. eine  $OD_{550}$  von 40 - 60 erreicht wurde. Die Rührleistung zur Durchmischung der Kultursuspension wurde auf 800 UPM erhöht. Das Ende des Wachstums wurde durch drastische Zunahme des  $pO_2$  – Drucks angezeigt.

-10 L HZD-Medium/ <i>E.coli</i>	0,6 % (w/v) Glucose	0,1 % (w/v) $MgSO_4 \times 7 H_2O$
	0,3 % (w/v) Hefextrakt	0,02 % (w/v) $NH_4Cl$
	2 % (w/v) $(NH_4)_2SO_4$	1,3 % (w/v) $KH_2PO_4$
	0,53 % (w/v) $NaH_2PO_4$	0,84 % (w/v) NaEDTA
	5 mL Vitaminlösung 428/DSM	
	4 mL Spurenelementlösung	
	0,01 % (w/v) Thiamin	
	50 µL Antischaummittel Silikonöl	pH 7
-Vitaminlösung 428	10 mg Riboflavin (Vitamin B2)	0,5 g Thiamin x HCl (Vitamin B1)
	50 mg Nicotinsäure	50 mg Pyridoxin x HCl (Vitamin B6)
	50 mg Calciumpanthotenat	0,1 mg Biotin
	0,2 mg Folsäure	1 mg Cyanocobalamin (Vitamin B12)
	pH 7	

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert.

-Spurenelementlösung	40 mg $CaCl_2 \times 2 H_2O$	2 mg $ZnSO_4 \times 7 H_2O$
	1 mg $CuCl_2 \times 2 H_2O$	10 mg $MnSO_4 \times H_2O$
	7 mg $CoCl_2 \times 6 H_2O$	0,5 mg $H_3BO_3$
	10 mg $Al_3Cl_3 \times 6 H_2O$	2 mg $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$
	40 mg $FeSO_4 \times 7 H_2O$	in 5 N HCl

Die Spurenelementlösung brauchte aufgrund der hohen HCl-Konzentration nicht sterilisiert werden.

-Feedlösung	500 g Glucose	10 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$
	15 g Hefeextrakt	0,2 g Thiamin

Glucose und  $MgSO_4$  wurden immer getrennt von den übrigen Bestandteilen autoklaviert, Thiamin sterilfiltriert.

Tabelle 5: **Übersicht zu den Parametern der Zellkultivierungen**

Parameter	10 L Batch <i>C. parapsilosis</i>	30 L Batch <i>C. parapsilosis</i>	30 L Batch/ recCPCR	HZD- Kultivierungen
<b>Gesamtvolumen</b>	8 L	20 L	20 L	15 L
<b>Batchvolumen</b>	8 L	20 L	20 L	10 L
<b>Feedvolumen</b>	8 L	20 L	20 L	5 L
<b>v (Rühren)</b> nach ca. 10 h	300 UPM	400 UPM	400 UPM 500 UPM	500 UPM 800 UPM
<b>Temperatur</b>	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
<b>pH</b>	4,5	4,5	7,0	7,0
<b>Säure</b>	3 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /			
<b>Base</b>	3 M NaOH	3 M NaOH	12,5 % NH <sub>3</sub>	12,5 % NH <sub>3</sub>
<b>Inokulum</b>	5 %/400 mL	5 %/1 L	3 %/600 mL	3 %/300 mL
<b>O<sub>2</sub>-Sättigung</b>	60 %	60 %	50 %	>20 %
<b>Zuluft</b> nach 4 - 6 h	10 L/min	15 L/min	10 L/min 15 L/min	15 L/min
<b>Antischaummittel</b>	0,01 %	0,01 %	0,01 %	0,01 %
<b>Kultivierungs- dauer</b>	20 h	25 h	10 - 12 h	10 - 12 h

Die abzentrifugierte Biomasse wurde entweder sofort weiter verarbeitet oder ohne Zusätze bei – 20°C eingefroren.

### 2.2.3 Zellaufschluß

Hefezellen wurden generell mit  $d = 0,5$  mm und *E.coli*-Zellen mit  $d = 0,3$  mm Glasperlen aufgeschlossen. Dazu wurden 40 % Zellsuspensionen mit Aufschlußpuffer hergestellt und mit der doppelten Menge an Glasperlen versetzt. Volumina von 1 - 2 mL wurden zum einen mittels Schwingmühle 2 x 8 min bei RT bearbeitet [Hummel & Kula, 1989b]. Der Aufschlussprozeß wurde durch Kühlsschritte (5 min, 4°C) unterbrochen. Zum anderen wurden die resuspendierten Zellen durch gepulsten Ultraschall mit einem Aufschluss von 2 x 30 sec und 30 sec Intervallkühlung am Pulsed Sonifier mit 25 % Intensität behandelt. Volumina von 5 - 10 mL wurden mittels 2 x 10 - minütiges Vortexen im SS34 Röhrchen und Zwischenkühlung auf Eis aufgeschlossen. Mengen von 10 - 300 mL wurden im Disintegrator S per Naßvermahlung 10 min bei 4000 Hz auf Eis behandelt. Volumina >300 mL wurden kontinuierlich bei einer Flußrate von 5 L/h zweimal mittels Kugelmühle aufgeschlos-

---

sen. Glasperlen, Zelltrümmer und *CPCR*-haltiger Überstand wurden je nach Volumina durch Zentrifugation bei 7000 UPM, 4 °C, (Tischzentrifuge, SS34, GSA, GS3-Rotor/Sorvall) abgetrennt und der sogenannte Rohextrakt entweder weiter verwendet oder mit dem gleichen Volumen Glycerin bei – 20 C eingefroren (↪2.3.5). Die Glasperlen wurden durch Waschen in Aq.<sub>dest.</sub> und 1 M NaOH regeneriert, neutralisiert und im Trockenschrank getrocknet. Überstände, die direkt mittels Anionenaustauscherchromatographie (↪2.3.4.2) aufgereinigt wurden, wurden in 20 mM TEA/NaOH, pH 7,0 umgepuffert (↪2.3.4.3).

-Aufschlußpuffer	100 mM TEA/NaOH, pH 7,0	1 mM DTT
	0,004 % (w/v) Pefabloc	1-3 Tropfen Uculoup/Antischaummittel

## 2.2.4 Mikroskopie von Mikroorganismen

Aliquots von wachsenden Kulturen und Langzeitkultivierungen wurden auf ihre Reinheit und den Zustand der Zellen mikroskopisch überprüft. *E.coli*-Zellen sind stäbchenförmig, echte Hefen wie *Candida* liegen in oval-kugeliger Form vor und können flechtenartige Fortsätze, sogenannte Mycele bilden [Ashford et al., 1932].

## 2.3. Biochemische Methoden

### 2.3.1 Proteingehaltbestimmung nach Bradford

Diese von Bradford entwickelte Proteinbestimmung basiert auf der Reaktion des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 mit basischen Aminosäuren. Durch die Messung der Extinktion bei 595 nm, dem Absorptionsmaximum des Bindungskomplexes, kann die Proteinkonzentration der jeweiligen Lösungen bestimmt werden. Durch diese Methode können bereits Proteinmengen im Bereich von 1 - 10 µg erfasst werden [Bradford, 1976].

Für die Messung wurden 100 µL Proteinprobe mit 900 µL Bradford-Reagenz versetzt. Nach 8 min Inkubation erfolgte die Messung bei 595 nm. Die dazu gehörende Eichkurve umfasste den Bereich von 1 - 20 µg BSA. Proteinkonzentrationen außerhalb des geeichten Bereichs  $OD_{595} \geq 0,8$  wurden entsprechend verdünnt.

---

-Bradford-Lösung      100 mg Coomassie Brilliant Blue G250      50 mL 95 % Ethanol  
                                 100 mL 85 % H<sub>3</sub>P0<sub>4</sub>

## 2.3.2      **Bestimmung der optischen Dichte**

Mikrobielle Zellen, die in einen Lichtstrahl gebracht werden, bewirken einen Intensitätsverlust durch Lichtstreuung, der in Beziehung zum Lambert-Beer'schen Gesetz folgendermaßen beschrieben werden kann [Bergter, 1983]:  $E = e \times c \times d$ .

Es besteht für definierte Bereiche eine direkt proportionale Beziehung zwischen der Extinktion **E** und der Zellkonzentration **c**, wenn der Extinktionskoeffizient **e** und die Küvettenschichtdicke **d** konstant sind. Hefezellen wurden bei einer OD von 600 nm, *E.coli* -Zellen bei einer OD von 550 nm gemessen. Die Zellsuspensionen wurden bei jeder OD-Messung durch das entsprechende Medium oder Puffer soweit verdünnt, dass die Extinktion unterhalb von 0,4 lag. Dadurch wurde gewährleistet, dass eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration bestand [Joeres, 1992]. Zur Erstellung von Wachstumskurven wurde das Medium des zu testenden Stammes mit 1 - 5 Vol % einer Übernachtskultur angeimpft und die jeweilige OD bis zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase bestimmt.

## 2.3.3      **Enzymtest**

### 2.3.3.1      **Qualitativer Enzymtest der Reduktaseaktivität**

Dieser von *Blaich* entwickelte Enzymtest beruht auf der NAD-abhängigen Oxidation von Hydroxysäureestern durch die Carbonylreduktase [Blaich, 1987]. Bei Anwesenheit der *CPCR* wird das Substrat Hydroxyhexansäureethylester (HHEE) oxidiert und der Cofaktor NAD<sup>+</sup> reduziert. Das entstandene NADH reduziert PMS (Phenanzinmethosulfat), welches als Elektronenakzeptor dient und seinerseits den gelblichen Leukofarbstoff INT in einen violetten Farbkomplex umsetzt. NAD<sup>+</sup> wird dabei gleichzeitig regeneriert. 100 µL EnzymLösung und 100 µL Enzymfarblösung werden im Dunkeln inkubiert. Bei vorhandener Carbonylreduktaseaktivität wird der farblose Leukofarbstoff sekundenschnell zu einem tiefblauen, unlöslichen Formazanfarbstoff umgesetzt. Alternativ konnte anstelle INT auch Nitrotetrazoliumblau (NTB) verwendet werden.

---

-Enzymtestlösung	30 mM HHEE	500 $\mu$ M NAD <sup>+</sup>
	wahlweise 500 $\mu$ M NTB	60 $\mu$ M PMS
	50 mM TEA/NaOH, pH 7,0	

### 2.3.3.2 Quantitativer Enzymtest der Reduktaseaktivität

Dieser optische Test nutzt die Extinktionsänderung einer Lösung durch die Adsorption des Cofaktors NADH bei 340 nm.

Im Standardenzymtest wurde 4-Acetylbuttersäureethylester (ABEE) zu (S)-Hydroxyhexansäureethylester (HHEE) reduziert, während der Cofaktor NADH zu NAD<sup>+</sup> oxidiert wurde. Dazu wurden folgende Stocklösungen angesetzt. 100 mM TEA/ NaOH, pH 7,0; 80 mM ABEE in 100 mM TEA/NaOH, pH 7,0; 2 mM NADH in 100 mM TEA/NaOH, pH 7,0. Die Kalibrierung der Messung erfolgte gegen Luft.

-Standardenzymtest	10 $\mu$ L <i>CPCR</i>	
	790 $\mu$ L Puffer	
	100 $\mu$ L ABEE	Messbedingungen: 340 nm, 37 °C
	100 $\mu$ L NADH	

Anstelle ABEE wurden auch andere Substrate eingesetzt. Die Oxidationsreaktion der *wt/recCPCR* setzt den Einsatz von NAD<sup>+</sup> voraus; gemessen wird die Extinktionszunahme bei pH 9,5 - 9,7. Als Cofaktor wurde eine Stammlösung von 5 mM NAD<sup>+</sup> verwendet. Es könnten folgende Parameter bestimmt werden:

-Volumenaktivität	$\frac{E * V * f}{v * \epsilon_{\text{NADH}} * d}$	(U/mL)
-------------------	--	--------

-Spezifische Aktivität	$\frac{\text{Volumenaktivität}}{c \text{ (Protein)}}$	(U/mg)
------------------------	---	--------

-E = Extinktionsänderung pro Minute

-V = Volumen des Testansatzes in  $\mu$ L

-v = Volumen der dosierten EnzymLösung in mL

$\epsilon_{\text{NADH}}$  = Molarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm: 6220 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

-d = Optische Wegstrecke in der Küvette in cm

-f = Vorverdünnung der Enzymlösung

---

## 2.3.4      **Aufreinigung**

Alle salzhaltigen Chromatographiepuffer wurden über 0,45 µm Sartorius-Membranen gefiltert und mittels Vakuumpumpe entgast. Die Aufreinigungen wurden bei 4 °C durchgeführt. Zum Auftrag der jeweiligen Lösungen waren die Säulen mit einer Peristaltikpumpe verbunden, über der die jeweiligen Flussraten eingestellt wurden. Zur Detektion des Aufreinigungsverlaufes war ein UV-Detektor, ein Schreiber und ein Fraktionssammler zur Sammlung der Proben angeschlossen. Nach der Equilibrierung der Säule wurde die Basislinie eingestellt. Das Waschen der Säule nach dem Auftrag diente der Entfernung unspezifisch an das Säulenmaterial gebundener Proteine. Die Elutionsfraktionen wurden entweder sofort weiter verwendet oder bei – 80 °C bzw. mit Flüssigstickstoff schockgefroren und lyophilisiert (↪2.3.6). Für eine Langzeitlagerung wurden die Proben mit dem jeweils gleichen Volumen an Glycerin gemischt und bei – 20 °C eingefroren.

### 2.3.4.1      **Fraktionierte PEG-Fällung**

Polyethylenglycol (PEG) fällt hochmolekulare Substanzen wie Proteine aus, niedermolekulare Substanzen bleiben in Lösung [Atha & Ingham, 1981].

Zu einer definierten Menge wtCPCR Rohextrakt wurde solange eine 50 % (w/v) PEG<sub>4000</sub> – Lösung hinzugegeben, bis eine PEG<sub>4000</sub> Konzentration von 2,5 Vol % in der Fällungssuspension erreicht wurde. Der Ansatz wurde 30 min bei 4 °C leicht gerührt und anschließend 30 min bei 7000 g und 4 °C im GS3 Rotor zentrifugiert (Sorvall). Der Überstand wurde einer zweiten PEG<sub>4000</sub> - Fällung unterzogen. Gemäß folgender Gleichung wurde soviel PEG<sub>4000</sub> zugegeben, dass eine Endkonzentration an PEG<sub>4000</sub> von 17,5 % Volumenteilen erreicht wurde.

$$(y * 0,025) + x * 0,5 = (y + x) * 0,175$$

y = Volumen mL CPCR Überstand aus der 1. Fällung

x = Volumen mL PEG<sub>4000</sub> der 2. Fällung

Der Ansatz wurde 30 min auf Eis leicht gerührt und 5 min bei 8000 g, 4 °C im GS3 Rotor zentrifugiert. Pellets, die direkt aufgereinigt werden sollten, wurden in 20 mM TEA/NaOH, pH 7,5 aufgenommen.

---

### 2.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF

Bei der Ionenaustauschchromatographie binden Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen an eine Matrix [Rossomando, 1990]. Der hier verwendete Anionenaustauscher trägt positiv geladene quarternäre Ammoniumionen.

PEG-gefällte wtCPCR-Suspensionen wie auch zellfreie recCPCR Überstände wurden mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Dazu wurden Säulen (10 - 30 cm \* 5,3 cm Säulenumfang) mit Q-Sepharose FF als Säulenmaterial verwendet.

Die Flussraten der Aufreinigung setzten sich wie folgt zusammen: Equilibrierung/ Säulenpuffer: 0,7 mL/min, 10-faches Säulenvolumen; Auftrag/ Rohextrakt: 0,5 mL/min, Waschung/Säulenpuffer: 0,7 mL/min, 5-faches Säulenvolumen; Elution/ Elutionspuffer: 0,5 mL/min, 4 mL Fraktionen.

Der Säulenpuffer enthielt DTT als Oxidationsschutz der Sulfhydrylgruppen im aktiven Zentrum der CPCR. 2-Propanol wurde zugesetzt, da festgestellt worden ist, dass ansonsten die Wiederfindungsrate der CPCR nach dem Säulenlauf auf unter 50 % sinkt [Peters et al., 1993]. Die Elution der CPCR erfolgte bei 100 mM NaCl mittels linear aufsteigenden NaCl-Gradienten (Gradientenmischer/Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg) von 0 - 500 mM NaCl. Die Elutionsfraktionen wurden mit dem qualitativen Enzymtest (↪2.3.3.1) auf CPCR-Aktivität getestet und positive Fraktionen vereinigt. Das Säulenmaterial konnte bei nachfolgender Regenerierung mit 1 M NaOH/1 M NaCl, Säulenpuffer; 75 % Essigsäure, Säulenpuffer und Lagerung in 20 % reinem Ethanol mehrfach verwendet werden.

-Säulenpuffer	20 mM TEA/NaOH, pH 7,5
	1 mM DTT
	5 % (v/v) Isopropanol
-Elutionspuffer	Säulenpuffer, pH 7,5
	500 mM NaCl

### 2.3.4.3 Ultrafiltration

Aufgrund des Volumens des durch die Anionenaustauschchromatographie erhaltenen CPCR-Eluats von ca. 50 mL, wurde die Lösung in einer Rührzelle (Typ 8050/ Amicon) mit einer YM 30 Membran (30 kDa Ausschlußgröße) aufkonzentriert und dabei gleichzeitig mit 10 mM TEA, NaOH, pH 7 umgepuffert. Der Arbeitsdruck betrug 3,5 bar. Alle verwendeten Membranen, die aus einem hydrophilen Polymer bestehen, wurden vor der erstmaligen Benutzung mehrmals mit Aq.bidest gewaschen

---

und 30 min in einer 5 % PEG<sub>4000</sub>-Lösung eingelegt. Hierdurch wurden unspezifische Bindungen von Proteinen blockiert. Die Ultrafiltration [Schratter 1996] wurde ebenfalls eingesetzt, um aufgeschlossene recCPCR aus *E.coli* auf 20 mM TEA/NaOH, pH 7,5 umzupuffern. Amicon-Membranen konnten bei einer Regenerierung in 1 M KOH/1 M KCl und Lagerung in 20 % reinem Ethanol mehrfach verwendet werden. Die Ultrafiltration fand bei RT statt. Die zur Umpufferung verwendeten Lösungen wurden kühl gehalten.

#### 2.3.4.4 Affinitätschromatographie mit 5'AMP-Sepharose 4B

Bei der Affinitätschromatographie wird die spezifische Wechselwirkung zwischen einem Enzym und einem geeigneten immobilisierten Liganden ausgenutzt [Dean et al., 1985]. Zur Aufreinigung der CPCR war die Cofaktorabhängigkeit Kriterium zur Auswahl des Liganden.

Zur Feinreinigung der wt/recCPCR wurde eine Affinitätschromatographie an 5'AMP-Sepharose 4B (Sigma-Aldrich/Deisenhofen) im 5 mL Gelbett unter folgenden Bedingungen eingesetzt.

Equilibrierung/Säulenpuffer: 0,4 mL/min, 5-faches Säulenvolumen; Auftrag: 0,2 mL/min; Waschung/Säulenpuffer: 3-faches Säulenvolumen, 0,3 mL/min; Elution/ Elutionspuffer: 3 mM NAD<sup>+</sup>, 0,2 mL/min, 1 mL Fraktionen.

Die Fraktionen wurden mittels quantitativen Enzymtest (§2.3.3.2) auf Aktivität getestet und vereinigt. Die recCPCR war nach diesem Aufreinigungsschritt aufgereinigt, die wtCPCR wurde homogen durch eine Gelfiltration (§2.3.4.5) hergestellt. Das Säulenmaterial wurde durch abwechselndes Waschen mit 100 mM TRIS-HCl, pH 8,5/500 mM NaCl und 100 mM NaCH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, pH 4,5/500 mM NaCl regeneriert und in 20 % (v/v) Ethanol gelagert.

-Säulenpuffer	10 mM TEA/NaOH, pH 7	1 mM DTT
-Elutionspuffer	Säulenpuffer, pH 7	3 mM NAD <sup>+</sup>

#### 2.3.4.5 Gelfiltration

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurde eine Gelfiltration an Sephadex G 75 durchgeführt, um die wtCPCR homogen aufzureinigen bzw. eine störende Malatdehydrogenase zu entfernen. Die gewonnenen Fraktionen wurden quantitativen Enzymtests (§2.3.3.2) unterzogen. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und für weitere proteinchemische Untersuchungen verwendet oder in 50 Vol % Glycerin bei – 20 °C gelagert. Die Gelfiltration erfolgte bei RT. Des weiteren wurde durch eine

---

Gelfiltration an Sephadex G 200 das native Molekulargewicht der wtCPCR bestimmt, da die Gelfiltrationschromatographie Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Volumen trennt, welches häufig mit dem Molekulargewicht der zu trennenden Proteine korreliert [Stellwagen, 1990]. Die Gelfiltrationssäulen wurden bei einer Flußrate von 1 mL/min mit Thyroglobulin (667 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), BSA (67 kDa), Chymotrypsin (25 kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa) kalibriert.

-Gelfiltrationspuffer	20 mM TEA/NaOH, pH 7,5	1 mM DTT
	5 % (v/v) Isopropanol	150 mM NaCl

### **2.3.5 Lagerung und Stabilitätstests von Proteinlösungen**

RecCPCR-Proben wurden mit verschiedenen Zusätzen von Glycerin und DTT bei – 20 °C auf ihre Lagerstabilität getestet. Proteinlösungen der wt/recCPCR wurden mit gleichen Volumenanteil Glycerin bei – 20 °C aufbewahrt.

Die Stabilität der recCPCR im Rohextrakt wurde bei verschiedenen Temperaturen (37, 56, 70, 95 °C) in 100 mM TEA/NaOH, pH 7 über verschiedene Zeiträume (30 min, 3 h, 24 h, 5 d) untersucht.

Da konzentrierte Proteinlösungen stabiler sind, wurden die Proben bei Bedarf mittels Ultrafiltration (↪2.3.4.3) aufkonzentriert.

### **2.3.6 Lyophilisation**

CPCR-Fraktionen wurden durch Lyophilisieren nahezu unbegrenzt haltbar gemacht. Dabei wurden die Proben nach kurzer Schockgefrierung durch flüssigen Stickstoff oder 10 min Inkubation bei – 80 °C im Lyophilisator gefriergetrocknet und bei –20 °C gelagert. Zur Weiterverarbeitung wurde das Lyophilisat in wäßrige Lösungen aufgenommen.

### **2.3.7 Elektrophoretische Methoden**

#### **2.3.7.1 SDS-PAGE**

Zur Untersuchung von wt/recCPCR-Proteinproben wurden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) durchgeführt. Die Methode basiert auf der Anlagerung von SDS an die Peptidketten, wodurch die Proteine denaturiert werden. Hierbei können fast alle nicht kovalenten Wechselwirkungen eines Proteins unter-

---

bunden werden. Das negativ geladene SDS bindet zudem in einem Verhältnis von 1,4 g SDS pro g Protein [Nielsen, 1990]. Die Trennung erfolgte in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel [Laemmli, 1970].

In der Regel wurden 7,5 oder 10 % selbsthergestellte MIDI- bzw. große Gele bei der Auftrennung der *CPCR* verwendet. MIDI-Gele besitzen eine Größe von 100 x 80 x 1 mm, große Gele eine Größe von 180 x 200 x 1,5 mm. Die gegossenen Trenngele wurden während der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet, um sie vor der Austrocknung zu schützen und eine gerade Trennlinie zu gewährleisten. Abschließend wurde das Sammelgel gegossen und der entsprechende Probenkamm eingesetzt. Die aufzutragenden Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 120 sec im Thermostat bei 95 °C erhitzt [Kowit & Maloney, 1982; Kubo, 1995]. Der SDS-Probenpuffer wurde zur Reduktion der Proben wahlweise je nach Experiment mit 3%  $\beta$ -Mercaptoethanol oder 10 % DTT (w/v) versetzt. Die über Nacht laufenden großen Gele wurden mit einer Stromstärke von 8 mA/pro Gel betrieben, MIDI-Gele 2 h mit 20 mA. Es wurden je nach Fragestellung gleiche Proteinmengen aufgetragen, die durch den *Bradford*-Test (↪2.3.1) bestimmt worden sind. Die Proteinbanden wurden nach einer SDS-PAGE entweder direkt angefärbt, oder auf eine Membran gebロットet und die transferierten Proteine mit Ponceau S bzw. Amidoschwarz detektiert (↪2.3.9). Als Standardmarker wurde der Molekulargewichtsmarker „Premixed Marker, *low range*“ (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Er besteht aus den Eichproteinen Phosphorylase B (97,4 kDa); BSA (66,2 kDa); Aldolase (39,2 kDa); Triosephosphatisomerase (26,6 kDa); Trypsininhibitor (21,5 kDa) und Lysozym (14,4 kDa). Für Coomassie gefärbte Gele wurde der Marker 1:20, für die Silberfärbung 1:100 in SDS-Probenpuffer verdünnt. Analog zu den Proben für die SDS-PAGE wurde der Marker mit Reduktionsmittel versetzt und 2 min bei 95 °C erhitzt. Für Gele, die gebロットet werden mussten, wurde der vorgefärbte „Prestained Standards, *low range*“-Marker (Bio-Rad, München) mit folgenden Eichproteinen verwendet: 106 kDa Phosphorylase B; 81 kDa BSA; 47,5 kDa Ovalbumin; 35,3 kDa *Carbonic* Anhydrase; 28,2 kDa Sojabohnen-Trypsin Inhibitor und 20,8 kDa Lysozym.

-SDS-Laufpuffer/10fach  
0,025 M TRIS  
0,129 M Glycin  
0,1 % (w/v) SDS  
ad 1000 mL Aq.millipore  
-SDS-Stocklösung

-SDS-Probenpuffer  
10 % (w/v) Glycerin  
2 % SDS (einer 10% (w/v) Stocklösung)  
0,063 M TRIS-HCl, pH 6,8  
0,1 % (w/v) Bromphenolblau    ad 1000 mL Aq.millipore  
10 % (w/v) SDS

ad 1000 mL Aq.millipore

-Trenngele:

Prozentigkeit	Trenngelpuffer	Bisacrylamid- lösung (Roth, Karlsruhe)	SDS-Stock- lösung	Aq.millipore
7,5 %	12,5 mL	12,5 mL	500 µL	24,5 mL
10 %	12,5 mL	16,4 mL	500 µL	20 mL

+ 120 µL APS und 40 µL TEMED (100 mg/mL APS frisch ansetzen)

-Sammelgele:

Anzahl	Sammelgel- puffer	Bisacrylamid- lösung (Roth, Karlsruhe)	SDS-Stock- lösung	Aq.millipore
4 große Gele	12,5 mL	7,5 mL	500 µL	29,5 mL

+ 150 µL APS und 50 µL TEMED (100 mg/mL APS frisch ansetzen)

-Trenngelpuffer 1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8  
ad 1000 mL Aq.millipore

-Sammelgelpuffer 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8  
ad 1000 mL Aq.millipore

### 2.3.7.2 Native PAGE

Native Gelsysteme enthalten kein SDS. Die Ladung der Proteine im Gel richtet sich daher nach ihrem isoelektrischen Punkt und dem pH des verwendeten Puffers. Die Proteine werden nicht denaturiert und bleiben aktiv erhalten [Schägger & Jagow, 1991]. Es wurden 10 % MIDI-Gele verwendet (↪2.3.7.1) und die Proteinbanden mittels Aktivitätsfärbung sichtbar gemacht (↪2.3.9.6).

### 2.3.7.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die isoelektrische Fokussierung [O'Farrel, 1975] wird angewendet, um Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) zu trennen. Im elektrischen Feld wird unter Verwendung künstlicher Ampholyte ein pH-Gradient aufgebaut. In diesem pH-Gradient bewegt sich jedes Proteinmolekül zu der Stelle, die seinem isoelektrischen Punkt entspricht. Dort bleibt es liegen, da auf das isoelektrische Molekül keine Kraft mehr wirkt.

---

- Die erste Dimension: IEF

Die IEF-Gele wurden als Rundgele in Glaskapillaren gegossen. 5 g Harnstoff wurden in 3,25 mL Aq.millipore unter Erwärmen gelöst. Unter Rühren wurden 1,5 mL Acrylamid-Fertiglösung, 0,4 mL Ampholyte Lösung, pH 3 - 10 und 0,1 mL Ampholyte-Lösung, pH 3 - 7 zugegeben. Der Ansatz wurde mit einer zuvor angefertigten, entgasten, sterilfiltrierten Lösung aus 0,15 g CHAPS, 0,05 mL Nonidet P-40 und 0,45 mL Aq.millipore versetzt. Die Polymerisation der Rundgele dauerte 2 h nach der Zugabe von 20 µL einer 10 % (w/v) APS-Lösung und 10 µL TEMED. Die wtCPCR-Proben wurden mit 9 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS sowie 5 % Ampholyt, pH 3 - 10 behandelt. Nach Befestigung der Glaskapillaren in der Elektrophorese-Einheit wurden luftblasenfrei ca. 25 µL Proteinprobe auf die Geloberfläche der Rundgele aufgetragen. Das untere Reservoir wurde mit Anodenpuffer, das obere Reservoir mit Kathodenpuffer gefüllt. Der Gellauf folgte folgenden Zeitplan: 2 h bei 200 V, 5 h bei 500 V, 16 h bei 800 V.

- Die zweite Dimension: SDS-PAGE

Die zweite Dimension wurde mit einem 7,5 % Trenngel durchgeführt. Der Protein-Standardmarker („low range“/Roche Diagnostics, Mannheim) wurde in Form eines 1 cm großen Agarose-Rundgelstück auf das Trenngel aufgetragen. Die Glaskapillaren wurden aus dem Ständer genommen und die Rundgele aus den Glaskapillaren entfernt. Das Gel wie auch das Markerstück wurden 3 - 5 min in Equilibrierungspuffer inkubiert und mit Kenntnis der Elektrodenseiten der IEF-Anlage auf dem Trenngel vertikal ausgerichtet. Die Elektrophorese wurde bei 10 °C, 20 mA und 70 V durchgeführt. Nach 16 h wurde der Stromversorger auf 35 mA/Gel eingestellt. Die aufgetrennten Proteinbanden wurden mittels Silberfärbung (↳2.3.9.2) angefärbt.

-IEF-Anodenpuffer (für SDS-PAGE)	6 mM H <sub>3</sub> P0 <sub>4</sub>	-IEF-Equillibrierungspuffer	71,4 M TRIS-HCl, pH 6,8
		2,9 % (w/v) SDS	
		2,9 % (w/v) Bromphenolblau	
-IEF-Kathodenpuffer		20 mM NaOH	
-IEF-Probenpuffer		9 M Harnstoff	
		4 % (w/v) CHAPS	
		5 % (v/v) Ampholyt, pH 3-10	
-IEF-Rundgel		5 g Harnstoff	0,15 g CHAPS
		3,25 mL H <sub>2</sub> O millipore	0,05 mL Nonidet P-40
dazu		1,5 mL Acrylamid-Lösung	0,45 mL H <sub>2</sub> O millipore
		0,4 mL Ampholyte, pH 3-10	20 µL 10 % APS-Lösung
		0,1 mL Ampholyte, pH 3-7	10 µL TEMED

---

### 2.3.8 Transfer von Proteinen (Western Blot)

Das Prinzip dieser immunbiochemischen Methode [Kyhse-Andersen, 1984] liegt in der diskontinuierlichen Übertragung von Proteinen auf Membranen. Das Trenngel wurde nach der SDS-Gelelektrophorese mit Milli-Q-Wasser gewaschen, um störende Salze und überschüssiges Glycin aus dem Elektrophoresepuffer zu entfernen. Anschließend wurde das Gel in Kathodenpuffer 5 min equilibriert. Die Proteinbanden werden je nach Anwendung mit Transferpuffer vom Gel auf Nitrocellulose oder PVDF-Membranen übertragen. Während Nitrocellulose sofort nach der Befeuchtung mit Anodenpuffer II verwendet werden kann, bedarf die PVDF-Membran einer Aktivierung durch 1 - 3 sec Inkubation in 100 % Methanol [Gültekin & Heermann, 1988]. Die Kathode des Blottinggerätes wurde mit Anodenpuffer I befeuchtet und zwei mit Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere in der Größe des Trenngels aufgelegt. Darauf wurde ein mit Anodenpuffer II getränktes Filterpapier und die entsprechende Membran gestapelt. Auf die Membran wurde das Gel und darauf drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt, bevor die Kathode aufgesetzt wurde. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,5 mA/cm<sup>2</sup> Membran für 45 min, die Detektion der aufgetrennten Proteinbanden mit Amidoschwarz oder Ponceau S (↪ 2.3.9). Die auf diesen Membranen transferierte Proteine können anschließend angefärbt, ansequenziert, mit Antikörpern nachgewiesen, mit Enzymen umgesetzt und ihre Modifizierung, z.B. Zuckerreste, bestimmt werden.

-Anodenpuffer I	300 mM TRIS, pH 10,4/ NaOH 10 % Methanol ad 1000 mL Aq.millipore pH 10,4 /NaOH	-Anodenpuffer II	25 mM TRIS 10 % Methanol ad 1000 mL Aq.millipore pH 10,4 /NaOH
-Kathodenpuffer	5 mM TRIS 40 mM Aminohexansäure 10 % Methanol ad 1000 mL Aq.millipore		pH 9,4 /NaOH

### 2.3.8 Färbemethoden

Zur Dokumentation wurden gefärbte Gele und Blots entweder photographiert oder mit dem *Eagle Eye II* (Stratagene, Heidelberg) detektiert. Vor der Färbung wurden die Gele oder Membranen mit Aq.millipore von störenden Salzen rein gewaschen [Pohl, 1990].

---

### 2.3.9.1 Coomassie – Färbung

Proteine, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt werden, können direkt nach Ende des Gellaufes durch den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue [Merril, 1990] sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff lagert sich durch Komplexbindung an basische Aminosäuren der getrennten Proteine an. Nach Zugabe eines speziellen Coomassie-Entfärbers kann nicht gebundener Farbstoff aus der Gelmatrix wieder herausgelöst werden. Dazu wurden die Gele für 10 min mit Coomassie unter Schütteln gefärbt [Pohl, 1990]. Die angefärbten Proteinbanden wurden durch Entfärbung des Hintergrundes mittels Coomassie-Entfärbes sichtbar gemacht. Die Nachweisgrenze liegt bei 200 - 400 ng Protein pro Bande.

-Coomassie-Färbelösung	40 % (v/v) Ethanol 0,1 % (w/v) Coomassie Blue G250	10 % (v/v) Essigsäure <sub>konz</sub> ad 1000 mL Aq.millipore
-Coomassie-Entfärber	40 % (v/v) Ethanol ad 1000 mL Aq.millipore	10 % (v/v) Essigsäure <sub>konz</sub>

### 2.3.9.2 Silberfärbung

Neben der Coomassie-Färbung wurde als eine sensitivere Färbemethode für geringere Proteinmengen ( $\leq 1 \mu\text{g}$ ) die Silberfärbung [Blum *et al.*, 1987; Rabilloud, 1992] zur Detektion der *CPCR* herangezogen. Die Nachweisgrenze liegt bei 5 - 10 ng Protein pro Bande.

Fixierung	40% EtOH, 10 % AcOH	3 x 30 min
Spülen	20% EtOH	10 min
	Aq.millipore	10 min
Sensitivierung	0,2 g/l Hypo	1 min
Spülen	Aq.millipore	3 x 20 sec
Silber	2 g/l AgNO <sub>3</sub> , 750 $\mu\text{L}$ HCHO	2 x 20 sec
Spülen	Aq.millipore	2 x 20 sec
Entwicklung	60 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 500 $\mu\text{L}$ HCHO, 5 mg Hypochlorid	5-10 min
Abstoppen	40% EtOH, 10 % AcOH	10 min

---

### 2.3.9.3 Amidoschwarzfärbung

Diese Färbemethode [Soutar & Wade, 1989] wird hauptsächlich für die Anfärbung von Proteinen auf Blotmembranen benutzt, die sequenziert werden. Die NC- oder PVDF- Membran wurde 10 min gefärbt und mit Entfärber inkubiert bis der Hintergrund klar ist. Dabei wurde die Blotmembran durch den Entfärber gezogen und der Entfärber mehrmals gewechselt.

-Amidoschwarzfärber            40 % (v/v) Ethanol  
    10 % (v/v) Essigsäure<sub>konz</sub>  
    0,1 % (w/v) Amidoschwarz  
    ad 1000 mL Aq.millipore

### 2.3.9.4 Ponceaufärbung

Im Anschluß an den Western Blot (↳2.3.8) wurden transferierte Proteine vor weiteren Versuchen wie z.B. Zucker- (↳2.3.13) oder Antikörpertest (↳2.3.12) in Ponceaulösung inkubiert, um die Qualität des Blots, die aufgetragenen Mengen/Gelbahn zu überprüfen bzw. die SDS-PAGE zu dokumentieren. Dieser Farbstoff bindet reversibel an die Proteine. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Aq.millipore von der Membran gewaschen. Je länger der Blot mit Aq.millipore gewaschen wurde, desto stärker nahm die Färbungsintensität ab [Ahnen et al., 1982].

-Ponceaulösung                    0,2 % (w/v) Ponceau S  
    gelöst in 3 % (v/v) TCA/ Aq.millipore

### 2.3.9.5 CuCl<sub>2</sub>-Färbung

Die Kupferfärbung wurde für Proben angewandt, die nach der Elektrophorese nicht fixiert, sondern aus dem Gel eluiert wurden. Die Proteinbanden sind als weiße Negativbanden auf blauem Hintergrund sichtbar.

-Färbelösung                      5 % (w/v) CuCl<sub>2</sub>

### 2.3.9.6 Aktivitätsfärbung

2.3.9.7

Nach der nativen PAGE wurden die aufgetrennten Proteine einer Aktivfärbung im Gel unterzogen. Dazu wurde prinzipiell die gleiche Färbelösung verwendet, die auch die Farbreaktion des qualitativen Enzymtests hervorruft (↳2.3.3.1). Das Gel wurde 5 - 10

---

min in der Färbelösung inkubiert und die *CPCR*-Proteinbande violett bzw. blau angefärbt. Alternativ zu der Aktivitätsfärbung wurden native Gele auch Silber gefärbt (↪2.3.9.2).

### **2.3.10 N-terminale Proteinsequenzierung**

Zur Sequenzierung von Proteinen bedient man sich des automatisierten Edman-Abbaus [Edman, 1956; Edman & Begg, 1967]. Dabei wird jeweils die 1. Aminosäure chemisch in das spezifische PTH-Derivat umgewandelt und über HPLC identifiziert [Matsudaira, 1987]. Durch Vergleich mit Standard-Aminosäuregemischen werden die PTH-Derivate nach der Auftrennung über HPLC den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet. Die *CPCR* wurde ungespalten als Blotprobe auf PVDF-Membran mehrfach N-terminal sequenziert. Des Weiteren wurden die nach der enzymatischen Spaltung (↪2.3.11) erhaltenen Peptide der *CPCR* N-terminal sequenziert. Dazu wurde ein *Automated Sequencer 477A* mit einer on-line HPLC 120 A verwendet [Baumann, 1990].

### **2.3.11 Enzymatische Spaltung der wtCPCR**

Zur Identifikation der *CPCR*-Proteinsequenz wurde homogen aufgereinigte wtCPCR jeweils mit den Endoproteasen Lys-C und Glu-C (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten. Die Lys-C Protease spaltet spezifisch C-terminal an der Aminosäure Lysin und die Glu-C Protease spezifisch C-terminal an Glutaminsäure. Die beiden Proteasen waren „sequencing grade“.

-Carboxymethylierung der Proteinprobe

Um die störende Bildung von Cysteinbrücken zu verhindern, wurden freie Cysteine durch Carboxymethylierung mit Iodessigsäure an ihren Schwefelatomen modifiziert [Lind & Eaker, 1982]. 100 µg reines Protein wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und 4 mg/mL in Guanidiniumpuffer gelöst. Die Proteinlösung wurde zur vollständigen Denaturierung 30 min bei RT inkubiert. 1/10 Volumen frisch angesetztes 111 mM DTT wurde als Reduktionsmittel zugegeben, der Ansatz mit N<sub>2</sub> überschichtet und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen frisch angesetzter 360 mM Iodessigsäure wurde erneut mit N<sub>2</sub> überschichtet und im Dunkeln 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 14 µL/mL β-Mercaptoethanol abgestoppt.

---

#### -Umpuffern der Probe

Vor der Zugabe der Lys-C bzw. Glu-C Protease musste die carboxymethylierte Probe mit kleinen Sephadex G-50 Säulen (Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg) umpuffert werden, da die Endoproteasen bei Anwesenheit von Guanidinium im Puffer ihre Spaltaktivität verlieren. Die Sephadex-Säulen wurden mit BSA geeicht und mit Spaltungspuffer equilibriert. Die Probe wurde tropfenweise mit dem jeweiligen Spaltungspuffer eluiert (Elutionsvolumen ca. 260 µL). Durch den Spaltungspuffer wurden die Eluate der zuvor durch die Detergenzien hochkonzentrierten Proteinproben für die Lys-C Spaltung auf 2 M Harnstoff und für die Glu-C Spaltung auf 1 M Guanidinium verdünnt. Dieser Schritt war notwendig, da die Salzkonzentration für die Endoproteasen Lys-C mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid und Gluc-C mit 8 M Harnstoff zu hoch gewesen wäre, so dass ein Aktivitätsverlust die Folge gewesen wäre. Zu diesen Lösungen wurde 1 % Triton-X-100 (Endkonzentration) sowie 1/25 Lys-C bzw. 1/20 Glu-C Protease der Probenproteinmenge hinzugegeben. Die Ansätze wurden mind. 16 h bei 37 °C inkubiert. Die proteolytische Spaltung wurde durch Zugabe von 1 % TFA (Endkonzentration) gestoppt.

#### -HPLC

Die nach der proteolytischen Spaltung erhaltenen Peptide der *CPCR* wurden mit einer Nucleosil RP C<sub>8</sub> (250 mm x 4 mm) über RP-HPLC aufgetrennt [Leube *et al.*, 1987, Prussak *et al.*, 1989], um über Edman-Abbau sequenziert werden zu können. Laufmittel A wurde über 0,45 µm Filter filtriert. Bei Laufmittel B wurde nur Aq.millipore filtriert, da die konzentrierte TFA und Acetonitril den Filter zerstören. Die HPLC verfügt über eine eigene Entgasungseinheit. Die Peptide wurden unmittelbar nach dem Detektordurchlauf manuell gesammelt. Anhand der Retentionszeiten wurden gleiche Peptide verschiedener Läufe vereinigt. Die einzelnen Peptidlösungen wurden auf 100 µL in der Vakuumszentrifuge eingeengt und im Sequenzer identifiziert.

-Laufmittel A	0,1 % TFA (v/v)	-Laufmittel B	0,085 % TFA (v/v)
			84 % CH <sub>3</sub> CN (v/v)
-Guanidinium-Puffer			100 mM TRIS-HCl, pH 8,5
			6 M Guanidiniumhydrochlorid
			0,2 % EDTA (w/v)
-Harnstoff-Puffer			100 mM TRIS-HCl, pH 8,5
			6 M Harnstoff
			0,2 % EDTA (w/v)

---

-Spaltungspuffer/Glu-C	25 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH 7,8 1 mM EDTA
-Spaltungspuffer/Lys-C	50 mM TRIS-HCl, pH 8 1 mM EDTA 20 mM Methylamin

### 2.3.12 Antikörper/ Meerrettich-Peroxidase Immunoglobulinkonjugat-Test

Nach dem Transfer auf eine geeignete Blotmembran können Proteine über spezifische Antikörper detektiert werden. Nach Inkubation mit einem 1. Antikörper erfolgt der Nachweis der Antigen-Antikörperbindung indirekt über den Substratumsatz eines sekundären Antikörper-Enzym-Konjugats (anti-Rabbit-Peroxidase / Roche Diagnostics, Mannheim). Das zur Detektion eingesetzte ECL<sup>R</sup>-System erzeugt über die von einer Meerrettich-Peroxidase katalysierte Umsetzung von Luminol ein fluoreszierendes Signal [Leong *et al.*, 1986; Leong & Fox, 1988].

Nach SDS-Page, Blot und Detektion der mit Ponceau S (↪2.3.10.4) angefärbten Proteinbanden wurden die Eichproteine des Protein-Standardmarker („low range“/ Bio-Rad, München ↪2.3.7) markiert und der Marker vom restlichen Blot abgetrennt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei RT und leichtem Schütteln (40 UPM). Der restliche Blot wurde in Blockinglösung 2 - 16 h inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen [Hauri & Bucher, 1986].

Waschen: 3 x 10 min; 2 x 30 min; 3 x 5 min; AKCPCR1: 60 min, 1:1000-1:100000;  
Waschen: 3 x 10 min; 2 x 30 min; 3 x 5 min; Anti-Rabbit-Peroxidase/Roche Diagnostics, Mannheim: 60 min; Waschen: 3 x 10 min; 2 x 30 min; 3 x 5 min.

Final wurde die Membran 1 min mit dem ECL-Reagenz benetzt und die Reaktion mittels Luminographen (Berthold, Bad Wildbach) detektiert. Die Empfindlichkeit des Serums wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen des gegen das CPCR-Antigen gerichteten Antikörpers AKCPCR1 getestet. Zur Kontrolle des ECL-Systems und der eingesetzten Antikörper wurden CPCR-Spuren nur mit 1. AK und ECL-Reagenzien bzw. CPCR-Spuren mit 1. AK, 2. AK und ECL-Reagenzien versehen. Der AKCPCR1 wurde mit nicht CPCR-haltigen Fraktionen auf seine Spezifität getestet. Der AKCPCR1 wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durch Immunisierung von Neuseeland-Kaninchen mit jeweils 4 x 100 µg wtCPCR hergestellt. Das Serum wurde aliquotiert und bei – 20 °C gelagert.

---

-PBS, pH 7,4	8 g NaCl	0,2 g KCl
	1,44 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	ad 1000 mL Aq.millipore	
-Waschlösung	PBS + 1 % Tween 20 (v/v)	
-Antikörperverdünnungslösung	PBS, pH 7,4 + 2 % BSA (w/v)	
-Blockinglösung	PBS (Antikörpertest)	
	5 % (w/v) Milchpulver	
-Luminol-Substrat-Lösung	0,5 % (w/v) Luminol	
(ECL-Reagenz A und B)	0,075 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	52,2 mM Iodophenol	
	10 mM TRIS/HCl, pH 8,0	

### 2.3.13 Zuckertest

Der Zuckertest mit dem DIG-*Glycodetection*-Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) [Kniep & Muhlradt, 1990] wurde zum Nachweis von glykosidischen Resten der wtCPCR verwendet. Es wurde Methode B des Kits, Oxidation und Didoxigenin-Markierung von Proteinen, die sich bereits auf einer NC-Blotmembran (Millipore, Eschborn) befanden, gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde 1 µg Transferrin, als Negativkontrolle 1 µg Creatinase verwendet.

### 2.3.14 Zn<sup>2+</sup>-Test

Zinkionen können essentielle Bestandteile des katalytischen Zentrums bei Dehydrogenasen sein. Mit verschiedenen Konzentrationen von Zink<sup>2+</sup>-Ionen wurde homogen aufgereinigte wtCPCR auf den Einfluss des Metallkations getestet. Dazu wurden Enzymproben in Dreifachansätzen jeweils 15 und 45 min, bei RT bzw. 4 °C mit 25, 125, 250, 500 µM; 1, 5 mM ZnSO<sub>4</sub> inkubiert und anschließend die Restaktivität mittels quantitativen Standardenzymtest (→2.3.3.2) in Bezug auf die Aktivität von Proben ohne Zinkzusatz bestimmt.

### 2.3.15 Inhibitionsstudien

Der Einfluss verschiedener Reagenzien, die einen inhibierenden Einfluss auf das Wildtypenzym zeigen [Peters et al., 1993], wurden auf ihre Wirkung zur recCPCR getestet. Es wurden verschiedene Konzentrationen an EDTA, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> und KCN bei RT 1 min und 30 min inkubiert und die Restaktivität durch den quantitativen

---

Enzymtest (↪2.3.3.2) bestimmt. Des Weiteren wurde der Einfluss von DTT und o-Phenanthrolin getestet.

### **2.3.16 Substratspektrum**

Verschiedene Verbindungen wurden mittels des quantitativen Enzymtests (↪2.3.3.2) auf ihre Umsetzung durch die wt/recCPCR getestet. Es wurden unterschiedliche Aufreinigungsfraktionen der wtCPCR verwendet, um das bereits aufgestellte Substratspektrum [Peters et al., 1993] zu verifizieren. Generell wurden 80 mM Stamm-lösungen hergestellt und die Umsetzung beider Enzyme jeweils als relative Aktivität im Vergleich zum Standardsubstrat ABEE für die Reduktions- und HHEE für die Oxidationsreaktion bestimmt. Als weitere Substrate dienten 2,5-Hexandion, (3,4)-MDA, Acetophenon, Formaldehyd, Oxalacetat, Acetaldehyd, (2S,5S)-Hexandiol, Iso-propanol, Ethanol, Methanol, 5-Hydroxyhexansäureethylester.

### **2.3.17 $K_M$ –Bestimmung der Reduktionsreaktion**

Homogen oder partiell aufgereinigte Enzymlösungen wurden in Doppelansätzen zur  $K_M$ -Wertbestimmung verwendet. Die Bestimmung von  $K_M$  und  $V_{max}$  erfolgte durch Messung der Anfangsgeschwindigkeiten  $v$  mittels quantitativem Enzymtest (↪2.3.3.2) bei verschiedenen Substratkonzentrationen von ABEE. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms „Excel Solver Routine“ von Microsoft durch nicht lineare Regression.

### **2.3.18 Bestimmung des Temperaturoptimums der recCPCR**

Der quantitative Enzymtest (↪2.3.3.2) wurde mit ABEE als Substrat in 100 mM TEA/NaOH bei verschiedenen Temperaturen (25 - 60°C) und bei dem pH-Wert 7,8 in Doppelansätzen mit recCPCR durchgeführt. Es wurden die relativen Aktivitäten ermittelt und in Bezug zur Temperatur gesetzt.

### **2.3.19 Bestimmung des pH-Optimums der recCPCR**

Der quantitative Enzymtests (↪2.3.3.2) mit ABEE als Substrat der Reduktionsreaktion wurde in Doppelansätzen mit 100 mM TEA-Puffer bei verschiedenen pH-Werten (6 - 10) mit recCPCR-Rohextrakten durchgeführt und die relative Aktivität in Abhängigkeit vom pH bestimmt.

---

### 2.3.20 Cysteinbestimmungen

Durch verschiedene Konzentrationen von  $\beta$ -Mercaptoethanol wurde das Reduktionsverhalten aufgereinigter wtCPCR-Proben im 10 % SDS-Gel überprüft.  $\beta$ -Mercaptoethanol hat die Eigenschaft im SDS-Gel über die jeweilige Proben tasche hinaus zu wandern. Vorweg erhitzte Proben (2 min, 95 °C) können auf diese Weise während des Gellaufes reduziert werden. Anhand von entstandenen „Shifts“ kann man bei Anfärbung der Gele mit Coomassie die Reduktion und Spaltung von Cysteinbrücken verfolgen [Creighton, 1989].

### 2.3.21 Massenspektrometer MALDI-TOF-MS

Mit Hilfe eines Massenspektrometers wurde das genaue Molekulargewicht des Monomers der wt/recCPCR bestimmt [Siuzdak, 1996]. Die zu untersuchenden Enzymproben wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:5 mit der Matrix auf dem Proben teller gemischt, getrocknet und vermessen. Das Molekulargewicht der Monomere wurde anhand der Flugzeit über eine externe Kalibrierung mit BSA errechnet. Bei der Bestimmung wurden folgende Messbedingungen berücksichtigt:

- Laser: Stickstofflaser,  $\lambda = 337$  nm, Pulsdauer 3 nsec, Frequenz 1 Hz, Auflösung~40 (Masse M/Peakbreite bei halber Peakhöhe dM)
- Matrix: 9 mg/mL 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 1 mg/mL 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure in 20 % (v/v)Acetonitril/79,9 % (v/v)Aq.bidest/0,1 % TFA
- Kalibrant: 1,6 mg BSA/mL in Acetonitril/Aq.bidest/TFA;  $MW_{(BSA)} = 66430$  Da
- 1 mg/mL Enzym gegen Aq.bidest dialysiert.

## 2.4. Molekularbiologische Methoden

Alle für molekularbiologische Experimente verwendeten Lösungen wurden 20 min bei 121 °C bei 2 bar autoklaviert. Reagenzien, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden mittels 0,2  $\mu$ m Membranen sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zu den entsprechenden Lösungen gegeben. Der verwendete Ethanol hatte p.A. Qualität.

### 2.4.1 Präparation von genomischer DNA

Zur Präparation genomischer DNA (gDNA) [Ferbeyre et al., 1993] wurden Zellpellets von 200 mL Schüttelkolbenkulturen ( $\hookrightarrow$ 2.2.2.1) von *Candida parapsilosis* mit 10 mM

Citrat-Phosphatpuffer, pH 7,5 (Citronensäure-Monohydrat/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O) gewaschen und in 20 mL Lysispuffer resuspendiert. Der Suspension wurde 1 mg Protease (Qiagen, Hilden) und 200 Units Lyticase aus *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich, Karlsruhe) pro mL Lysispuffer zugesetzt. Nach 1 h Inkubation der Zellen bei 37 °C, wurde mit demselben Volumen Phenol-Chloroform (PCI) extrahiert. Nach 30 min Zentrifugation der Proben (RT, 12000 UPM im SS34 Rotor) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und bei Auftreten einer Interphase erneut mit PCI extrahiert. Die in der wässrigen Phase befindliche genomische DNA wurde mit 1/10 Vol. 3 M NaCH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, pH 5,2 und 2 Vol kaltem Ethanol (- 80 °C) gefällt. Nach 5 min Inkubation auf Eis, wurde die gDNA auf einen Glasstab gewickelt und unter der Sterilbank getrocknet. Die DNA wurde ü/N in 5 mL TE, pH 7,5 bei 4 °C gelöst. Durch Zugabe von 100 µg RNaseA/mL DNA-Lösung (Qiagen, Hilden) und Inkubation für 60 min, bei 37 °C unter leichtem Schütteln (40 UPM) wurde die RNA verdaut. Die RNase A wurde durch Extraktion mit 1 Vol. PCI entfernt; die wässrige Phase musste mit einem Vol. CI bearbeitet werden, um störende Phenolreste zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit 1/10 Vol. 3 M NaCH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, pH 5,2 und 0,7 Vol. Isopropanol bei RT gefällt, wiederum auf einen Glasstab gewickelt und unter der Sterilbank getrocknet. Die gDNA wurde ü/N in 2,5 mL TE, pH 7,5 bei 4 °C gelöst und durch Auftrennung in einer Agarosegelelektrophorese (0,5 %) hinsichtlich der Reinheit und Größenverteilung analysiert. Bei einer reinen DNA-Probe liegt das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm (A<sub>260</sub>/ A<sub>280</sub>) bei 1,8. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Protein oder Phenol hin. Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist direkt proportional zu ihrem DNA-Gehalt. Bei 260 nm entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA [Sambrock *et al.*, 1989].

-Lysispuffer	10 mM Citratphosphat, pH 7,5 100 mM EDTA 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol/frisch zugeben	1 M Sorbitol 1 % (w/v) SDS
-PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	
-CI	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	
-TE	10 mM TRIS-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA	

---

## 2.4.2 Bestimmung von DNA-Primern für die PCR

Die DNA-Sequenz der Primer wurde aus der N- und C-terminalen Aminosäuresequenz des zu amplifizierenden *CPCR*-Gens entsprechend dem genetischen Code unter Berücksichtigung der „*Codon Usage*“ von *Candida parapsilosis* abgeleitet. Dabei wurde die Degeneration des genetischen Codes berücksichtigt. Die Sequenzen der Oligonukleotide entsprachen den komplementären DNA-Strängen der Randbereiche des zu amplifizierenden Gens von jeweils 20 - 35 Basen; 5'-terminal wurden nicht komplementäre Erkennungssequenzen von geeigneten Restriktionsendonukleasen eingefügt. Durch PCR (§2.4.7) wurden ausreichend *CPCR*-Fragmente amplifiziert und durch Ligation in Klonierungsvektoren eingefügt (§2.4.11). Die Primer wurden jeweils in 5'-3' Richtung konstruiert und von der Firma MWG (München) synthetisiert. Die Primer wurden mit Aq.millipore auf eine Konzentration von 100 pmol/µL an Primern eingestellt und bei -20 °C gelagert. Als Richtwert für Oligonukleotide wird der  $T_m$ -Wert, die Temperatur bei der 50 % der Stränge denaturiert sind, folgendermaßen bestimmt:

$$T_m = 16,6 \log M + 0,41 (\%GC) + 81,5 - 820/l - 1,2(100-h)$$

GC=GC-Gehalt der Probe      l=Länge der Oligonukleotide

M=Molare Salzkonzentration      h=Homologie zum Template in %

Die verwendeten Primer sind im [Anhang] aufgelistet.

## 2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR besteht die Möglichkeit gezielt spezifische DNA-Fragmente *in vitro* zu amplifizieren [Mullis & Faloona, 1987]. Durch entsprechende Geräte ist die Reaktion vollkommen automatisiert. In den durchgeführten Reaktionen diente entweder gDNA oder Plasmid-DNA als Template für die spezifischen Primer. Die DNA-Fragmente wurden durch thermostabile Polymerasen amplifiziert. Durch zyklische Wiederholung der Denaturierung, Anlagerung der Primer („*Annealing*“) und Polymerisation von DNA (Elongation) erhält man eine exponentielle Amplifizierung der Templates, da jedes neugebildete DNA-Stück Ausgangsmaterial für eine folgende Reaktion sein kann. Die Kettenreaktion wurde durch Kühlung der Proben auf 4 °C beendet. Es wurde die Taq-Polymerase [Saiki *et al.*, 1988] aus *Thermus aquaticus* von Biometra/Göttingen (Primezyme) und die sogenannte „*proof-reading*“ DNA-Polymerase von

---

Biolabs/ Schwalbach (Vent<sub>R</sub>-DNA-Polymerase/*Thermococcus litoralis*), bei der durch ihre 3'-5' Exonukleaseaktivität beim Kopieren 5 -115 mal weniger Fehler als bei der Taq-Polymerase auftreten, verwendet. Jedes Enzym wurde mit den zugehörigen Puffern verwendet. Die Templates, Primerkonzentrationen und dNTP-Konzentrationen wie auch das PCR-Verfahren selbst wurden variiert [Rychlik et al., 1990]. Die PCR durchlief 25 - 40 Zyklen. Bei Verwendung des Robocycler (Stratagene, Heidelberg) wurden die Proben zum Schutz vor Kondensation mit 100 µL Mineralöl (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) überschichtet. Das PCR-Fragment wurde entweder aus dem Agarosegel, oder direkt aus dem PCR-Ansatz isoliert (↪2.4.6).

-Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes, aufgefüllt mit Aq.millipore ad 100 µL

375-1000 ng gDNA /20-50 ng Plasmid-DNA	1/10 DMSO
je 100 pmol Sense/Antisense-Primer	je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
1/10 Polymerase-Puffer (10 x)	2,5-5U Polymerase

-Standard-PCR-Bedingungen

-Denaturierung:	4 min 94 °C
-Primerbindung:	2 min bei 46 °C - 60 °C
-Polymerasereaktion:	2 min bei 72 °C

Vor dem ersten Zyklus wurde das Reaktionsgemisch 5 min bei 94 °C denaturiert. Im letzten Zyklus wurde der Polymerisationsschritt 10 min durchgeführt, um alle Stränge bis zum Ende zu synthetisieren. Bis zur weiteren Verwendung wurde der PCR-Ansatz bei 4 °C gekühlt oder bei – 20 °C eingefroren.

#### **2.4.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Elektrophorese**

Zur Überprüfung isolierter DNA und zur Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht wurde die doppelsträngige DNA auf 0,5 – 1 % Agarosegele aufgetragen [Aaij & Borst, 1972; Helling et al., 1974; Sambrook et al., 1989]. 0,5 – 1 % Agarose (Biozym/ Karlsruhe) wurde mit 1 x TAE in der Mikrowelle aufgeköcht. Um den Verlust durch Kondensation auszugleichen, wurde die gelöste Agarose mit Wasser auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Nach Abkühlung der Lösung auf 50 °C wurde 0,005% Ethidiumbromid zur Detektion der DNA unter UV-Licht hinzugefügt. Ethidiumbromid

---

ist ein unter UV-Licht (312 nm) fluoreszierender Farbstoff, der durch Interkalierung an die DNA bindet und diese dadurch sichtbar macht. Die Gellösung wurde luftblasenfrei in vorher abgedichtete DNA-Agarose Kammern gefüllt. Nach dem Erstarren wurden die Gele in die Elektrophoresekammern eingelegt und mit 1 x TAE überschichtet. Die mit 1-fach DNA-Probenpuffer (Endkonzentration) vorbereiteten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese der DNA erfolgte 1-1,5 h bei 80-100 mA. Die Daten der Elektrophoreseläufe wurden mit dem *Eagle Eye*-System (Stratagene, Heidelberg) dokumentiert.

-10 x TAE-Puffer		40 mM TRIS-Acetat	1 mM EDTA
-DNA-Probenpuffer (6-fach)	6 x TAE	50 % (v/v) Glycerin	
		0,25 % (w/v) Bromphenolblau	

#### 2.4.4 DNA-Molekulargewichtsmarker

Zur Bestimmung der DNA- Fragmentgrößen wurden folgende Marker verwendet:

-DIG-Marker VII (Roche Diagnostics, Mannheim): 8000, 7100, 6000, 4800, 3500, 2700, 1900, 1850, 1500, 1400, 1150, 100, 680, 490, 370 bp.

-DNA-Marker IV (Roche Diagnostics, Mannheim): 19329, 7743, 5526, 4254, 3140, 2690, 2322, 1882, 1489, 1150, 925, 697, 421, 74 bp.

-KB-Leiter (Gibco, Karlsruhe): 7100, 6100, 5000, 4000, 3000, 2000, 16000, 1000, 500 bp.

-KB-Leiter (MBI-Fermentas, Vilnius): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 500, 250 bp.

#### 2.4.6 Fällung von DNA

Die Ethanolfällung wurde zur Wiedergewinnung der DNA nach Phenolextraktionen oder zur Aufkonzentrierung und Reinigung durchgeführt [Mamur, 1961].

Dazu wurde die Probe mit 1/10 Vol. % 3 M Natriumacetat, pH 5,0 und 2,5 Vol. absoluten Ethanol (-80 °C) versetzt und 20 min bei -80 °C aufbewahrt. Es folgte eine 20 min Zentrifugation bei 13000 UPM und 4 °C (Tischzentrifuge, Eppendorf/ Hamburg). Der Überstand wurde dekantiert, die Probe kurz getrocknet und 2 x 5 min mit 70 % Ethanol (-80°C) gewaschen, um störende Salze zu entfernen. Das Pellet wurde getrocknet und in einem kleinen Volumina ( $\leq 50 \mu\text{L}$ ) Aq.millipore oder TE-Puffer, pH 8,0 aufgenommen. Die gelöste DNA wurde entweder direkt verwendet, oder mittels Vakuumentrifuge eingengt und aufkonzentriert [Pohl, 1990]. Anstelle von absolutem Ethanol wurde auch reines Isopropanol bei RT verwendet.

---

## 2.4.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

In Agarosegelen aufgetrennte DNA kann mit Hilfe verschiedener Kits eluiert werden. Ausgetestet wurden *NucleoSpinExtract 2 in 1* und *QIAquick Gel Extraction Kit*. Hierbei bindet die DNA unter bestimmten Pufferbedingungen an eine Säulenmatrix und kann anschließend wieder von dieser gelöst werden. Die Gelbanden wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Pro 100 mg Gelstück wurden 300 µL Kitpuffer zugefügt und 10 min bei 50 °C im Thermostat inkubiert. Das Beladen der Membransäulen mit DNA und die Ethanolwaschschritte wurden entsprechend der jeweiligen Herstellerprotokolle durchgeführt. Die DNA wurde entweder mit 50 µL 1 mM TE, pH 8,0 oder Aq.millipore eluiert und in einer Vakuumzentrifuge auf die gewünschte Konzentration zur Weiterverarbeitung eingengt. Um bessere Ausbeuten zu erhalten, wurde der Elutionsschritt wiederholt, beide Eluate vereinigt, gefällt (↪2.4.6) und aufkonzentriert. Mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kit wurden DNA-Fragmente auch aus Flüssigproben, z.B. PCR-Produkte, aufgereinigt (Herstellerprotokoll/Roche Diagnostics, Mannheim, ↪2.1.3) [Vogelstein & Gillespie, 1979].

## 2.4.8 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E.coli*

### 2.4.8.1 DNA-Minipräparationen

Zur Überprüfung von positiven Transformanten, die über eine zu testende Anzahl von 5 Klonen hinausging, wurden DNA-Kochminipräparationen durchgeführt [Birnböim & Doly, 1979]. Dafür wurden Einzelkolonien ü/N in 5 mL LB<sub>amp</sub>-Medium bei 37 °C, 160 UPM inkubiert. Nach 12-14 h wurden die Kulturen bei RT, 5000 UPM, abzentrifugiert (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg) und die Pellets in 350 µL STET-Puffer resuspendiert. Zur Zelllyse wurde 20 µL einer 20 mg/mL frisch angesetzten Stammlösung an Lysozym hinzugegeben, 5 min, bei RT inkubiert, 40 sec im Wasserbad (100 °C) denaturiert und 15 min bei 14000 UPM, RT zentrifugiert. Die Pellets wurden mittels sterilen Zahnstochern gepickt, die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Vol. % (42 µL) 5 M Natriumacetat, pH 5 und 400 µL Isopropanol (v/v) und 15 min bei RT gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei RT, 14000 UPM wurden die Pellets 2 x mit 70 % -20 °C kalten Ethanol gewaschen und die salzfreien Pellets in adäquater Menge Aq.millipore oder 5 mM TE-Puffer, pH 8,0 aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsanalyse (↪2.4.9) und

---

Agarosegellauf (↪2.4.4) auf Insertion des jeweiligen Vektor/ recCPCR-Konstrukts überprüft.

-STET-Puffer	8 % Saccharose (w/v)	50 mM TRIS-HCl, pH 8,0
	50 mM EDTA, pH 8,0	8 % Triton-X-100 (v/v)

### 2.4.8.2 Plasmid-Kits/Qiagen

Mittels QIAgen Plasmid Midi/Maxi Kit konnte Plasmid-DNA in unterschiedlichen Mengen nach alkalischer Lyse über Membransäulen isoliert werden [Sh-Horowitz & Burke, 1981]. 4 – 100 mL einer *E.coli*-Übernachtskultur wurde 5 min, 4 °C, 5000 UPM abzentrifugiert und die Plasmid-DNA nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Die eluierte DNA wurde zur Aufkonzentrierung und Reinigung einer Fällung unterzogen (↪2.4.6) oder direkt mittels Vakuumzentrifuge eingeeengt. Die Fragmente waren ausreichend rein und konzentriert, um für Klonierungen, Transformationen oder Sequenzierungen eingesetzt zu werden (↪2.4.8, 2.4.13, 2.4.16).

### 2.4.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Typ-II-Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die eine spezifische Nukleinsäuresequenz in einer doppelsträngigen DNA erkennen und die Spaltung des Zucker-Phosphat-Gerüsts beider Stränge katalysieren. Je nach Restriktionsenzym und palindromischer Erkennungssequenz können glatte („blunt“) und überhängende („sticky ends“) Enden entstehen [Roberts & Macelis, 2000].

100 – 1000 ng DNA wurden je nach Experiment mit 0,1 - 1 Unit Restriktionsendonukleasen (Biolabs-Schwalbach, Amersham Pharmacia Biotech-Freiburg, Roche Diagnostics-Mannheim) mindestens  $\geq 1$  h unter den von den Herstellern angegebenen Bedingungen im Thermomixer inkubiert. Die Restriktionsanalyse wurde in der Agarosegelelektrophorese überprüft (↪2.4.3). Bei präparativen Restriktionsanalysen, z.B. zur Klonierung von Fragmenten (↪2.4.16) wurde der gesamte Ansatz auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und nach der Auftrennung aus dem Gel isoliert (↪2.4.4).

### 2.4.10 5'Dephosphorylierungen von DNA-Fragmenten

Um eine Religation eines linearen Plamids nach der Restriktion bei Vorhandensein von glatten Enden bzw. Spaltung mit nur einem Restriktionsenzym zu verhindern, wurden die 5' Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phos-*

---

*phatase*=SAP/Roche Diagnostics, Mannheim) entfernt. Hierbei entstehen 5' Hydroxylgruppen. Für diese Reaktion wurde die DNA in Reaktionspuffer aufgenommen und 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch 10 min Inkubation bei 68 °C. Dephosphorylierungen mit SAP konnten direkt nach der Restriktionsanalyse in einem Ansatz mit dem Restriktionsenzym durchgeführt werden. Die bei der Ligation (↪2.4.11) störende alkalische Phosphatase wurde nach der Dephosphorylierung durch einen Agarosegellauf vom restlichen Klonierungsansatz abgetrennt.

## **2.4.11 Ligationen**

### **2.4.11.1 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA durch T4-DNA-Ligase**

Restringierte und gereinigte DNA-Fragmente wurden in die entsprechend korrespondierenden Klonierungsvektoren mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim), die ATP als Cofaktor benötigt, eingefügt [Weiss *et al.*, 1968]. Bei diesem Vorgang wurden Phosphodiesterbrücken zwischen benachbarten 5'Phosphat- und 3-OH-Gruppen geknüpft. Bei „*sticky-end*-Ligationen“ zur Klonierung der *recCPCR* wurde die zu klonierende DNA nach Restriktion mit Enzymen (z.B. *Eco R I*, *Pst I*), die spezifische 5' und / oder 3' überstehende Enden bilden, in einer definierten Orientierung in den Vektor eingebunden. Das Insert (*CPCR*-Genamplifikat) lag in 3-fachen molarem Überschuss gegenüber der Vektorkonzentration vor. Die Ligation wurde entweder mit 2 U T4-DNA-Ligase in einem Volumen von 10 - 20 µL 8 - 12 h bei 16 °C, oder 3 h bei RT in Ligationspuffer (Kitzubehör) durchgeführt [Sambrock *et al.*, 1989; Clark, 1989]. „*Blunt-end*“-Ligationen wurden 4 h bei RT oder 12 - 16 h bei 16 °C mit 3 - 4 U pro 20 µL Ligationansatz durchgeführt, um eine vergleichbare Effizienz zur Ligation mit kohäsiven Enden zu erhalten. Alternativ wurden Ligationen mit dem Rapid Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dieser Kit verkürzt den Ligationvorgang auf 5 min bei RT. Die Ligationansätze wurden auf LB<sub>amp</sub>-Platten ausgestrichen, ü/N bei 37 °C inkubiert und auf positive Transformanten getestet (↪2.4.8).

### **2.4.11.2 Ligation von glatten Enden („*blunt end ligation*“) unter Verwendung des *SureClone* Kits**

Der *SureClone*-Kit (Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg) wird für Klonierungen von Genfragmenten in den pUC18 Vektor verwendet [Sambrock *et al.*, 1989]. Cha-

---

rakteristische Merkmale des linearisierten pUC18 Vektor des Kits sind die glatten Enden an der *Sma* I-Schnittstelle und der bereits dephosphorylierte Vektor. Das zu klonierende Genfragment wurde in einer Reaktion 5' mittels Nukleotid-Kinase phosphoryliert und der 5' Überhang mit dem Klenow-Fragment der *E.coli* Polymerase aufgefüllt [Anhang]. Auf diese Weise wurden einheitliche Enden, wie sie dem Vektor entsprechen, gewährleistet. Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt, kurz abzentrifugiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Ein äquivalentes Volumen an Phenol/ Chloroform wurde hinzugegeben, vermischt und zur Phasentrennung 1 min bei 13000 g, RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und über mit Aq.millipore equilibrierten MicroSpin-Säulen aufgereinigt. Ein Aliquot der aufgereinigten DNA wurde im Agarosegel aufgetrennt und die Konzentration anhand eines entsprechenden Molekulargewichtsmarkers (↪2.4.5) abgeschätzt. Der Rest nach Einordnung des molaren Verhältnisses Insert (3) : (1) Vektor in pUC18 ligiert. Alternativ zur Ligase aus dem *SureClone* Kit wurde eine T4 DNA Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Der Ligationsansatz [Anhang] wurde 2 h bei 16 °C inkubiert und in kompetente *E.coli* XL1blue oder DH5 $\alpha$  Zellen transformiert (↪2.4.13). 150  $\mu$ L wurden auf LB<sub>amp</sub>-Platten, die jeweils mit 40  $\mu$ L einer 40 mg/mL X-GAL-Lösung in DMFA und 5  $\mu$ L einer 1 M IPTG-Lösung zur Blau/Weiß-Selektion (↪2.4.13.3) von Transformanten versetzt wurden, ausgestrichen und bei 37 °C ü/N inkubiert.

## 2.4.12 Herstellung kompetenter Zellen

Die Kompetenz von Bakterien ist ein vorübergehender Zustand, der Prokaryonten in die Lage versetzt, mit DNA aus externen Quellen transformiert zu werden bzw. DNA aus fremden Quellen aufzunehmen.

### 2.4.12.1 Kompetente Zellen

400 mL LB-Medium wurde mit 1 Vol % einer Übernachtskultur der unter (↪2.1.4) aufgeführten *E.coli*-Stämme angeimpft und bis zu einer OD<sub>550</sub>=0,4 - 0,6 bei 37 °C, 160 UPM kultiviert. Die Bakterien wurde 10 min auf Eis unter häufigen Schütteln gekühlt und 10 min, bei 3000 UPM und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 mL kaltem Tfb1 resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation von 10 min bei 3000 UPM und 4 °C wurde das Pellet in 4 mL kaltem Tfb2 resuspendiert [Hanahan, 1983]. Aliquots von 100-200  $\mu$ L Volumen wurden auf Eis abgefüllt, schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

-TfB1	1,3 mL 3 M Kaliumacetat	-TfB2	2 mL 100 mM MOPS
	13 mL 0,5 M MnCl <sub>2</sub>		
	26 mL 0,5 M RbCl		0,4 mL 0,5 M RbCl
	1,3 mL 1 M CaCl <sub>2</sub>		1,5 mL 1 M CaCl <sub>2</sub>
	19,5 mL Glycerin (w/v)		3 mL Glycerin
	<u>68,9 mL Aq. millipore</u>		<u>13,1 mL Aq. millipore</u>
	130 mL		20 mL

#### 2.4.12.2 Elektrokompetente Zellen

Die Medien zur Herstellung elektrokompetenter Zellen müssen möglichst salzarm sein, da aufgrund des angelegten Elektropulses hohe Salzkonzentration zu einem Kurzschluss führen [Calvin & Hanawalt, 1988]. Alle Wasch- und Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt, alle verwendeten Lösungen eiskalt bereitgestellt. 400 mL LB-Medium wurde mit 1 Vol % einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD=0,5 - 0,7 bei 37 °C, 160 UPM kultiviert. Nach 15 min Zentrifugation bei 4 °C, 4000 UPM im GS3Rotor (Sorvall/Du Pont, Bad Homburg) wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet in 400 mL 10 % Glycerin resuspendiert. Nach einem Waschschrift (4000 UPM, 4 °C) wurde das Pellet mit 200 mL 10 % Glycerin versetzt, gewaschen und mit 100 mL 10 % Glycerin versetzt. Nach einem finalen Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 2 - 3 mL 10 % Glycerin resuspendiert, aliquotiert, schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

Nach einer Mindestlagerung von 1-2 h konnten die kompetenten Zellen erstmalig verwendet werden

### 2.4.13 Transformation von kompetenten Zellen

#### 2.4.13.1 Hitzeschock nach Hanahan

100 µL kompetente Zellen wurden zügig auf Eis aufgetaut, mit vorgekühlter Plasmid-DNA gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte 1 min bei 42 °C. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 400 µL LB-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37 °C unter leichten Schütteln regeneriert. 150 µL des Ansatzes wurden auf LB-Platten mit komplementären Selektionsdruck ausgestrichen und ü/N bei 37 °C inkubiert [Hanahan, 1983].

---

### 2.4.13.2 Elektroporation

Zur Erhöhung der Transformationsfrequenz von Prokaryonten benutzt man seit einigen Jahren die Elektroporationsmethode. Mit dieser können pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA bis zu  $10^{10}$  Transformanten erzielt werden. Plasmid-DNA wird hierbei durch Anlegen eines elektrischen Puls hoher Spannung in die kompetenten Zellen eingeführt. Der kurzzeitige Stromstoß depolarisiert die Zellmembran. Große Moleküle wie DNA können auf diesem Weg in die Zelle gelangen. Die Transformationsfrequenz hängt vom Kompetenzgrad und der Zelldichte der Bakterien, der DNA-Menge, der Struktur und Größe der DNA, der Prä- und Postinkubation mit den Bakterien, der Vorbehandlung der Zellen sowie von diversen physikalischen Parametern wie Temperatur und Feldstärke ab [Calvin & Hanawalt, 1988].

Die Durchführung erfolgte mit dem Gene Pulser TM (Biorad, München) und Küvetten mit 0,2 cm Elektrodenabstand auf Eis bei einer Feldstärke von ca 2,5 KV/cm. Elektrokompente Zellen wurden zügig aufgetaut, 1 - 2  $\mu\text{L}$  DNA (10 ng-1  $\mu\text{g}$ ) und 40  $\mu\text{L}$  Zellen wurden gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in die Pulser-Küvette übertragen, der Puls ausgeführt, die transformierten Zellen in 1 mL SOC resuspendiert und 1 h bei 37 °C regeneriert. Der Ansatz wurde auf LB-Platten mit komplementären Selektionsdruck ausgestrichen und ü/N im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

-SOC-Medium	4 g Trypton	1 g Hefeextrakt
	0,12 g NaCl	0,41 g $\text{MgCl}_2$
	0,5 g $\text{MgSO}_4$	0,04 g KCl
	0,72 g Glucose	ad 200 mL Aq.millipore

### 2.4.13.3 Blau / Weiß Selektion

Um Transformanten, die das Vektor-Insert Konstrukt besitzen, von insertlosen Transformanten zu unterscheiden, verwendet man u. a. die Blau-Weiß Selektion. Neben der Ampicillinresistenz selektiert man in diesem Klonierungssystem auf die Inaktivierung des *lacZ*-Gens, das einen Teil des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase codiert. Die verwendeten *E.coli*-Stämme besitzen ein verändertes *lacZ*Gen, dem ein großer Abschnitt (*lacZ'*) fehlt und nur den  $\alpha$ -Peptidanteil der  $\beta$ -Galactosidase codiert. Solche Mutanten können das Enzym nur dann bilden, wenn sie mit einem Plasmid transformiert werden, das den fehlenden Teil des Gens enthält. Mittels des Lactoseanaloges IPTG und dem Farbstoff X-Gal wird die Anwesenheit der  $\beta$ -Galactosidase

getestet. Kann die  $\beta$ -Galaktosidase durch das Plasmid komplementiert werden, sind die Kolonien blau. Wird in das Plasmid das *CPCR*-Konstrukt eingeführt, ist der *lacZ*-Abschnitt des  $\beta$ -Galaktosidase-Gen durch Insertion zerstört und das Enzym kann nicht mehr vollständig gebildet werden. Stämme mit relevantem Plasmid erscheinen weiß [Sambrook *et al.*, 1989]. 150  $\mu$ L Klonierungsansatz wurde auf LB<sub>amp</sub>-Platten, die jeweils mit 40  $\mu$ L einer 40 mg/mL X-Gal-Lösung in DMFA und 5  $\mu$ L einer 1 M IPTG-Lösung zur Blau/Weiß-Selektion von Transformanten versetzt wurden, ausgestrichen und bei 37 °C ü/N inkubiert.

#### 2.4.14 Auflösung von „*Inclusion Bodies*“

Zur Auflösung inaktiver Aggregate der *recCPCR* wurden folgende De- und Renaturierungsmethoden getestet. (Tabelle 6), [Rudolph & Lilie, 1996].

Tabelle 6: **Bearbeitung von „*Inclusion Bodies*“ in *E.coli***

Arbeitsschritte	Versuchsbedingungen
1. Solubilisierung	2 h Inkubation bei 20 °C 6 M Guanidinium-HCl oder 8 M Harnstoff 100 mM DTT 0,1 M TRIS-HCl, pH 8 oder 0,1 M TEA/NaOH, pH 7 Proteinkonzentration 5 mg/mL
2. Entfernung des Reduktionsmittel	Einstellung des pH-Werts auf ca. 4,5 PD10-Säulen mit 6 M Guanidinium-HCl
3. Proteinfaltung	1:200 Verdünnung in TRIS-HCL, pH 7,5 oder pH 8,5 bzw. TEA/NaOH, pH 7 oder pH 8; 5 M EDTA, RT in Gegenwart folgender Additive: a) kein Additiv b) 0,5 M L-Arginin + 0,5 M Guanidinium-HCl c) 3 mM Glutathion reduziert 0,3 mM Glutathion oxidiert d) 2 mM Zinksulfat
4. Analyse	Bestimmung der Renaturierungsausbeute nach 1h, 3 h und 24 h

#### 2.4.15 Klonierungsansätze der *recCPCR*

Zur Identifikation des vollständigen *CPCR*-Gens wurden PCR's mit den Sense pUC18MBCPCR und Antisense pUC18MBACPCR Primern und Hybridisierungen durchgeführt (↪ 2.4.7, 2.4.14). Das Amplifikat wurde in pUC18 kloniert und in *E.coli* XL1 Blue oder DH5 $\alpha$  transformiert (↪ 2.4.13). Das Insert (*CPCR*-Gen) wurde se-

quenziert (Sequi Serve/München). Zur Herstellung aktiver, rekombinanter *CPCR* wurden nach der Einfügung bestimmter Schnittstellen Klonierungen und Expressionen durchgeführt. Durch PCR wurde das *CPCR*-Gen mit entsprechenden 5' und 3' Schnittstellen amplifiziert. Das *CPCR*-Insert wurde mit Hilfe des *sureClone*-Kit in pUC18 subkloniert (↪2.4.11.2) und in *E.coli* XL1 Blue oder *E.coli* DH5 $\alpha$  transformiert (↪2.4.13). Positive Klone wurde nach der Sequenzanalyse mittels Plasmidaufreinigung in verschiedenen Maßstäben isoliert (↪2.4.8) und in Expressionsstämmen transformiert (↪2.4.13). Tabelle 7 gibt detaillierte Auskunft über die einzelnen Klonierungsansätze

**Tabelle 7:** Klonierungsansätze der *CPCR*

Expressionsvektor	Expressionsstamm	Schnittstellen	Primer
pKK233-3	<i>E.coli</i> JM105, JM109, HB101	5' <i>Eco</i> RI 3' <i>Pst</i> I	MBCPCR2 MBACPCR7
pTrc99a	<i>E.coli</i> JM105, JM109	5' <i>Eco</i> RI 3' <i>Pst</i> I	MBCPCR2 MBACPCR7
pET15b	<i>E.coli</i> BL21	5' <i>Eco</i> RI 3' <i>Pst</i> I	PETMBCPCR PETMBACPCR
pBTac2	<i>E.coli</i> JM105, JM109, HB101, AD494	5' <i>Eco</i> RI 3' <i>Pst</i> I	MBCPCR2 MBACPCR7

---

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### ***Kultivierung, Reinigung und Charakterisierung der Wildtyp-CPCR***

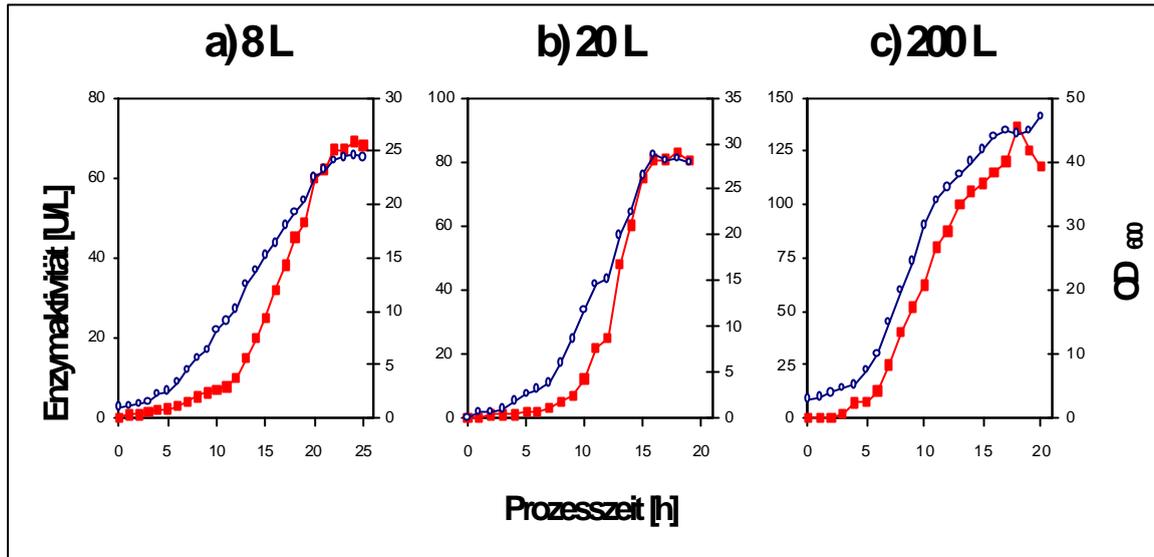
#### **3.1 Zellkultivierung zur Gewinnung der CPCR aus *Candida parapsilosis***

*Candida parapsilosis* (DSMZ 70125) ist eine weit verbreitete echte Hefe. Zur Aufreinigung und biochemischen Charakterisierung der CPCR mußte ausreichend Biomasse der Hefe zur Verfügung stehen. Das Enzym hat nur einen Anteil von 0,03 % am Gesamtprotein der Zelle und bedarf einer 3000-fachen Anreicherung [Peters et al., 1993]. Es wurden 8, 20 und 200 L Kultivierungen durchgeführt, um entsprechendes Ausgangsmaterial zu erhalten.

Die Kultivierung der Hefe zur Produktion der CPCR wurde bereits eingehend untersucht und optimiert [Peters et al., 1993; Rissom et al., 1999]. Die besten Ausbeuten wurden mit Glycerin als C-Quelle erzielt. Die Verwendung eines synthetischen Mediums, welches neben einer C- und einer N-Quelle zusätzlich essentielle Aminosäuren, Vitamine und Spurenelemente enthielt, zeigte keine Verbesserung [Rissom, 1999]. In der Folge wurde ein Medium, welches sich aus Glycerin als C-Quelle,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als N-Quelle sowie Hefeextrakt und verschiedenen Salzen zusammensetzte, verwendet [Guerin et al., 1989]. Die maximale Enzyymbildung wurde gegen Ende der logarithmischen Phase beobachtet [Peters et al., 1993]. Die Kultivierung der Hefe wurde analog dem Wachstumsoptimum nach Barnett durchgeführt [Barnett et al., 1979].

Abbildung 8 zeigt den Verlauf der unterschiedlichen Wachstumskurven dieser Kulturen. Es wurden die Enzymproduktion, dargestellt in der Volumenaktivität (U/L), gegen die Zeit und gegen die optische Dichte (600 nm) der Zellsuspension aufgetragen. Tabelle 8 beschreibt die Ausbeuten an Carbonylreduktase aus den Zellkultivierungen von *Candida parapsilosis*.

Es wurde gezeigt, dass in allen Kulturen die größte Enzymmenge der CPCR gegen Ende der exponentiellen Phase bzw. beim Übergang in die stationäre Phase gebildet wurde. Dabei konnte bei der 8 L und 20 L Zellkultivierung eine  $\text{OD}_{600} = 25 - 28$  eine



**Abbildung 8**  
**Wachstumskurven verschiedener Kultivierungsansätze**

a) 8 L b) 20 L c) 200 L Medium: 2 % (w/v) Glycerin, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,12 % (w/v) (NH<sub>2</sub>)SO<sub>4</sub>, 1 % (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 % (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 4,5, 30 °C. ■: Volumenaktivität der *CPCR*, ○: Wachstumskurve der *Candida parapsilosis*, gemessen bei OD<sub>600</sub>

Enzymmenge von 60 – 80 U/L erzielt werden. Bei der 200 L Zellkultivierung konnte bei einer Verdopplung des OD<sub>600</sub>-Wertes = 45 die Enzymausbeute auf ca. 125 U/L gesteigert werden. Dies deckte sich mit den bekannten Kultivierungsdaten von *C.parapsilosis* zur Gewinnung der *CPCR* [Peters et al., 1993].

Die ersten 5 h der Fermentationen umfassten die sogenannte *lag*-Phase bzw. Verzögerungsphase, in der die *Candida parapsilosis* erwartungsgemäß in allen 3 Batch-Kultivierungen nur ein minimales Wachstum aufwies. Die optische Dichte der *Candida*-Zellen zeigte an, dass die Zellen nach einer kurzen *lag*-Phase über die Beschleunigungsphase sehr schnell in ein exponentielles Wachstum übergingen. Während des exponentiellen Wachstums verdoppelte sich die Zellmasse der *Candida parapsilosis* ausgehend von einem Basiswert bei der 8 und 20 L Kultur von OD<sub>600</sub> = 4 und bei der 200 L Kultur von OD = 6 mehrmals, bis das Zellwachstum durch den Verbrauch der Nährstoffe über die Übergangsphase in den stationären Zustand überging. Das Ende der Enzymbildung bzw. des Wachstums wurde nicht nur durch die OD-Bestimmung der Zellsuspension detektiert, sondern auch durch die drastische Zunahme des Sauerstoffpartialdrucks pO<sub>2</sub> angezeigt. Die Hefezellen wurden zu Beginn der stationären Phase geerntet, da beim Übergang von der exponentiellen Phase in die stationäre Phase die höchste Enzymmenge gebildet wurde. Darüber

---

hinaus sollte der Bildung von ungünstigen Sekundärmetaboliten bzw. *CPCR*-inaktivierenden Proteasen wie auch der Lyse der Hefezellen zuvorgekommen werden.

**Tabelle 8:** Verschiedene Kultivierungsansätze zur Herstellung von Biomasse aus *Candida parapsilosis* zur Gewinnung der *CPCR*

Bioreaktorvolumen	Gesamtbiofeuchtmasse	Gesamtaktivität
8 L	0,15 kg	ca. 600 Units
20 L	0,5 kg	ca. 1640 Units
200 L	6,7 kg	ca. 27400 Units

Erwartungsgemäß wurden die größten Enzymausbeuten in der 200 L Batch-Fermentation erzielt. Da sich die optimalen Bedingungen in einem Bioreaktor bei einer 10-fachen Volumensvergrößerung ändern, wurden die Wachstumsbedingungen variiert. Der pH-Wert (4,5) und die Temperatur (30 °C) wie auch das Animpfvolumen (5 Vol %) wurden gegenüber den 8 und 20 L Kultivierungsansätzen konstant gehalten. Die hohen Ausbeuten wurden über die Erhöhung der Zuluftzufuhr bzw. über die Steigerung der Rührgeschwindigkeit von 300 auf 500 UPM und durch die Vergrößerung des Kulturvolumens erzielt.

### 3.2 Aufreinigung der *CPCR*

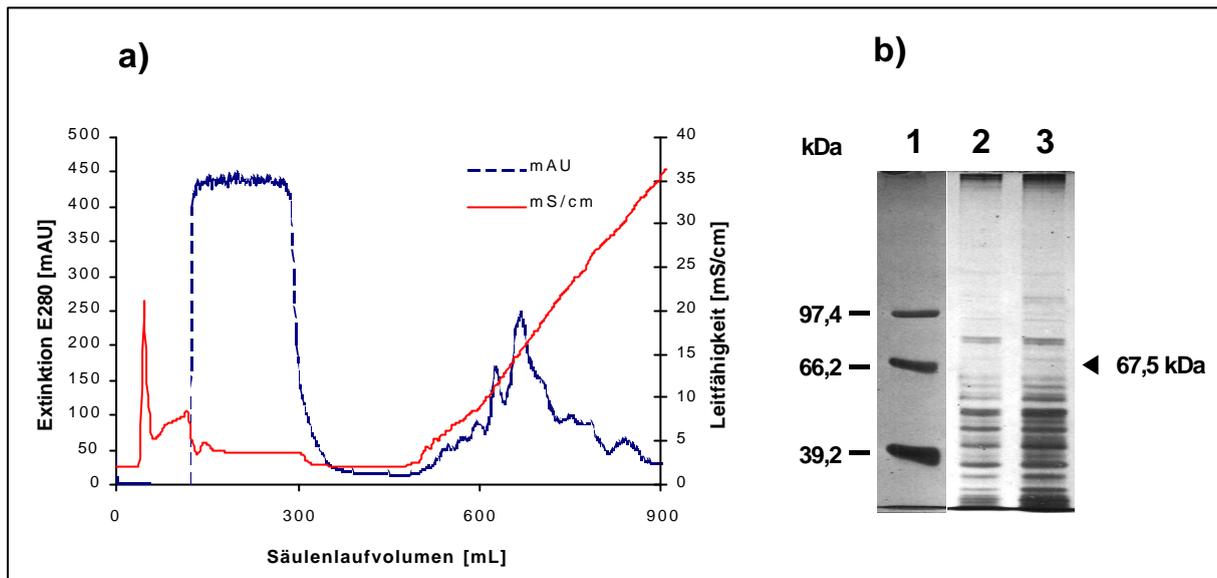
Nach dem Zellaufschluss wurde eine vierstufige Aufreinigung zur Isolierung der Carbonylreduktase aus dem Hefe-Rohextrakt durchgeführt. Es wurden aufeinanderfolgend eine fraktionierte PEG<sub>4000</sub>-Fällung, eine Anionenaustauscherchromatographie an Q-Sepharose FF, eine Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration und abschließend eine Affinitätschromatographie mit 5'-AMP-Sepharose-4b bearbeitet [*Peters et al.*, 1993]. Tabelle 9 stellt die erhaltenen Aktivitäten der entsprechenden Schritte dar.

**Tabelle 9:** Aufreinigungsdaten der *CPCR*

Aufreinigungsschritt	Gesamtausbeute (%)	spez.Aktivität (U/mg)	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	100	0,32	1
1. PEG <sub>4000</sub> -Fällung	90,2	0,74	2,3
2. PEG <sub>4000</sub> -Fällung	75,2	2,05	6,4
Q-Sepharose FF (Abbildung 9)	70,5	25,1	78,4
Ultrafiltration	69,6	33,3	104
5' AMP-Sepharose 4b, (Abbildung 10)	69,5	1132	3537

Mit Hilfe der beschriebenen Aufreinigungsstrategie konnte die *CPCR* angereichert werden. Es wurde ein Aufreinigungsfaktor von ca. 3537 und eine spezifische Aktivität von 1132 U/mg erzielt. Das vollständige Aufreinigungsverfahren ging insgesamt mit einem akzeptablen Enzymverlust von ca. 30 %, ausgehend vom zellfreien Rohextrakt, einher. Der größte Verlust wurde nach dem Zellaufschluss bzw. nach den PEG<sub>4000</sub>-Fällungen beobachtet. Bei der Optimierung der Aufreinigungsverfahren für die *CPCR* führten *Peters et al.*, 1993 an, dass im Vergleich zu einer PEI-, einer pH-, einer Temperatur- oder einer Ammoniumsulfatfällung, die PEG-Fällung zu den höchsten Ausbeuten mit entsprechender Aktivität, Anreicherung und Konzentrierung der *CPCR* führt. Darüber hinaus ist eine PEG-Fällung sehr schonend für Proteine [*Ingham*, 1990]. Der Vorteil gegenüber einer Ammoniumsulfatfällung liegt darin, dass PEG-gefällte Proteine ohne einen zusätzlichen Entsalzungsschritt auf das Ionenaustauschermaterial aufgetragen werden können. Die beobachtete Aktivität und die Ausbeute des Aufreinigungsverfahrens stimmte mit den von *Peters et al.*, 1993, angegebenen Werten weitgehend überein.

In den Abbildungen 9 und 10 sind die entscheidenden Aufreinigungsschritte mit den zugehörigen Chromatogrammen und die Analyse der Elutionen in SDS-Polyacrylamidgelen dargestellt.

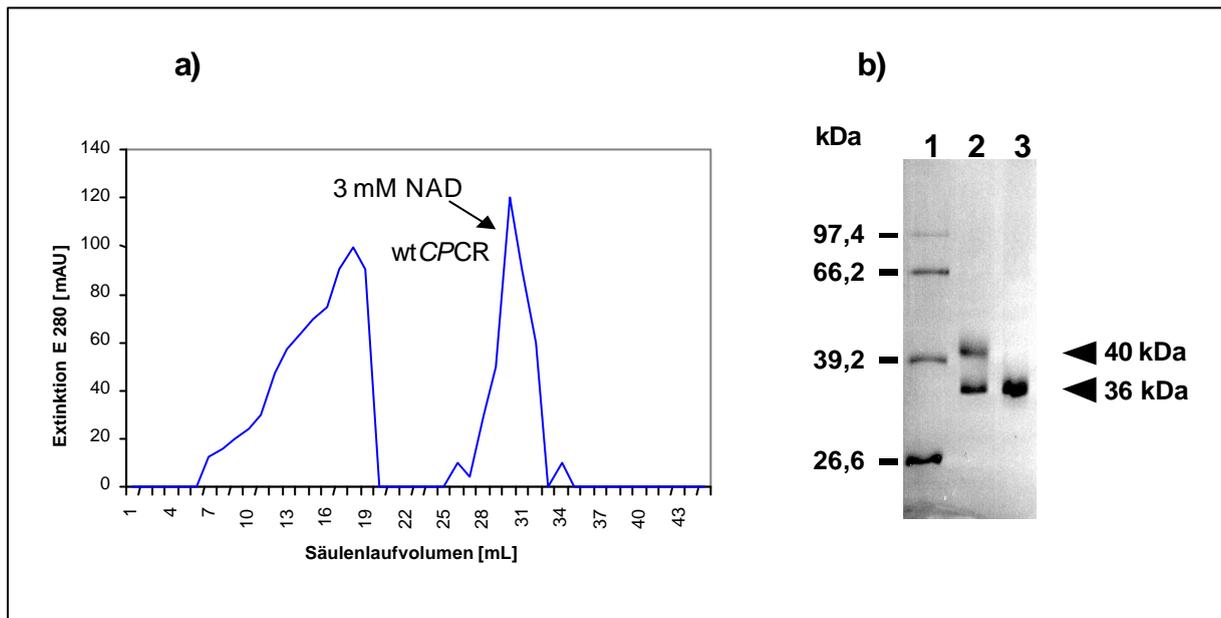


**Abbildung 9**  
**Anionenaustauscherchromatographie und SDS-PAGE der wtCPCR-Fraktion**

a) Anionenaustauscherchromatographie mit Q-Sepharose FF. Elution der wtCPCR durch einen linearen Gradienten von 0 - 500 mM NaCl.

b) SDS-PAGE, Coomassiefärbung: Bahn 1: Standard-Proteinmarker, Bahn 2, 3: Elutionsfraktionen mit wtCPCR-Aktivitäten; entnommen bei einem Säulenlaufvolumen von 625 mL und 630 mL

Das Elutionsprofil der Anionenaustauscherchromatographie in Abbildung 9 a) zeigt einen typischen Verlauf mit dem Auftrag des Rohextraktes, dem Waschen des gebundenen Materials und der Elution mit einem linearen Salzgradienten von 0 - 500 mM NaCl. Die CPCR-Elution erfolgte bei 100 mM NaCl. Es wurden Gesamtausbeuten zwischen 70 - 75 % im Vergleich zur Ausgangsaktivität des Rohextrakts, bzw. 94 - 97 % im Vergleich zur PEG-Fällungssuspension mit einer spezifischen Aktivität von ca. 25,1 U/mg und einem Aufreinigungsfaktor von ca. 78 in Bezug auf den Rohextrakt erzielt. *Peters et al.*, 1993 beschrieben die Carbonylreduktase als ein Homodimer mit einem apparenten Molekulargewicht der Monomere von ca. 67,5 kDa. Die Bahnen 2, 3 in Abbildung 9 b) zeigen Elutionsfraktionen, deren CPCR-Aktivitäten sowohl in quantitativen wie auch in qualitativen Enzymtests bestimmt worden sind. In dem Coomassie gefärbten SDS-Gel konnten nur sehr schwache Signale in den mit DTT reduzierten und denaturierten Proben bei 67,5 kDa detektiert werden.



**Abbildung 10**  
**Affinitätschromatographie der CPCR**

a) Elutionsprofil mit spezifischer Elution des Enzyms bei 3 mM NAD<sup>+</sup>, Auftragung: 10 mL konzentrierte Sepharose Q-Fraktion

b) Silbergefärbtes SDS-Gel: Bahn 1: Protein-Standardmarker; Bahn 2: mit DTT reduzierte Elutionsprobe, Bahn 3: denaturierte Elutionsprobe, ohne Reduktionsmittel. Die aufgetragenen Elutionsfraktionen wurden bei einem Säulenlaufvolumen von 30,5 mL entnommen.

Eine Feinreinigung der CPCR wurde entsprechend dem Protokoll von *Peters et al.*, 1993 durch Affinitätschromatografie an dem NAD<sup>+</sup>-Agarose Analogon 5' AMP-Sepharose 4b erreicht. Hierbei wurden die durch Ultrafiltration entsalzten und umgepufferten CPCR-Fractionen an die Affinitätsmatrix gebunden, der Biokatalysator durch spezifische Elution mit 3 mM NAD<sup>+</sup> eluiert und die Enzymaktivität durch den quantitativen Enzymtest bestimmt. Durch diesen Aufreinigungsschritt konnte ein Aufreinigungsfaktor von 3587 erzielt werden. Die Gesamtausbeute konnte mit 69,5 % im Bezug auf den Rohextrakt nach der Ultrafiltration erhalten bleiben. Dies entsprach einer Steigerung der Aufreinigungsqualität um ein 34-faches, die nur auf die Affinitätschromatographie zurückzuführen war.

Im Gegensatz zu dem von *Peters et al.*, 1993 publizierten Molekulargewichts des Monomers der CPCR von 67,5 kDa, zeigt das zur Analyse der Elutionsfraktionen mit Silber angefärbte SDS-Gel allerdings in Bahn 2 wie auch bei mehrfacher Wiederholung des Versuchs keine Bande im Bereich von 67,5 kDa bei der mit DTT reduzierten und denaturierten Probe. Anstelle der erwarteten Proteinbande in Höhe von 67,5 kDa kann man in Bahn 2 jedoch zwei Proteinbanden erkennen, die einem

---

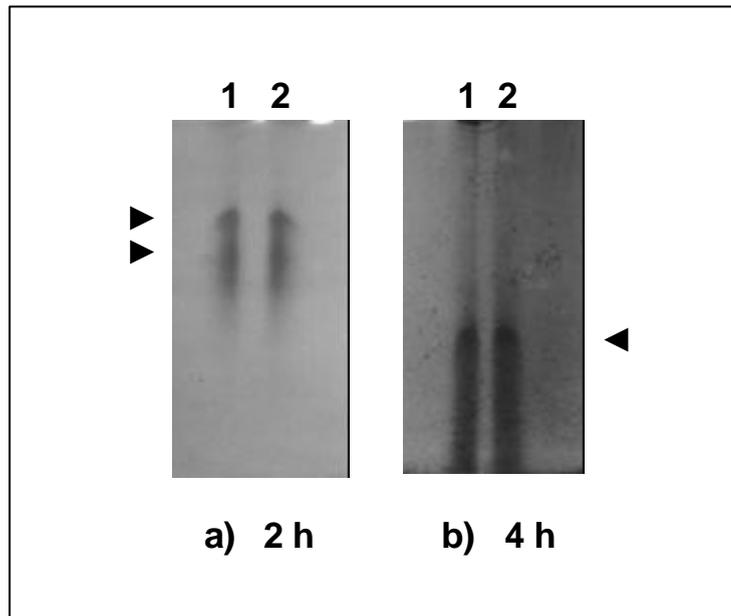
Molekulargewicht von 36 bzw. ca. 40 kDa entsprachen. Darüber hinaus wurde in Bahn 3 nur eine Bande im Bereich von 36 kDa detektiert. Im Gegensatz zu der Elutionsprobe in Bahn 2 wurde die Probe in Bahn 3 nicht reduziert, sondern nur denaturiert. Die Enzymproben aus Bahn 2 und 3 gehören einer Elutionsfraktion an. Auffällig ist das leichte Schmieren zwischen den beiden Proteinbanden in Bahn 2, obwohl die beiden Banden distinkt zu erkennen sind. Ursache hierfür könnte entweder eine Glykosylierung einer oder beider Protein in den entsprechenden Banden oder ein zu hoher Salzgehalt der Proben sein.

Dieser Unterschied im Laufverhalten der nicht reduzierten, denaturierten Proteinprobe zur reduzierten, denaturierten *CPCR*-Fraktion, dargestellt in Abbildung 10 b), wurde wiederholt in der SDS-PAGE beobachtet. Es wurden wiederholt Affinitätschromatographien mit 5' AMP-Sepahrose 4b zur Isolierung der *CPCR* durchgeführt, die alle zum selben Ergebnis führten. Es wurde sowohl bei der Coomassie- wie auch bei der sensitiveren Silberfärbung im nicht reduzierten Zustand der Proben eine distinkte Bande bei ca. 36 kDa und im reduzierten Zustand zwei Proteinbanden bei ca. 36 und 40 kDa detektiert. Folglich schien das Molekulargewicht des Monomers der *CPCR* in einem anderen Bereich zu liegen bzw. es stellte sich die Frage, ob es sich bei den Proteinbanden um zwei unterschiedliche Proteine handelte.

Bei der Annahme des Vorhandenseins von zwei Proteinen entgegen der ursprünglichen Überlegung, dass nach dem vierstufigen Aufreinigungsschemata der Biokatalysator homogen vorliegen sollte, mußte geklärt werden, ob die bekannten Daten zur Enzymfunktion des Biokatalysators von der von *Peters et al.*, 1995 gescreenten Carbonylreduktase stammten oder durch die Anwesenheit eines potentiellen zweiten Enzyms verfälscht wurden. Um dies zu klären, wurde eine native Gelelektrophorese mit den Elutionsfraktionen durchgeführt. Dies sollte weitere Informationen über das Laufverhalten der Proteinfraktion liefern (Abbildung 11 a, b). Hierbei wurde die Auftrennung der Proteine einmal nach 2 h, ein weiterer Ansatz nach 4 h gestoppt und die nativen Polyacrylamidgele einer Silberfärbung unterzogen. Zusätzlich wurde bei einer native PAGE eine Aktivitätsfärbung im Gel durchgeführt. Es zeigte sich weder im silbergefärbten Gel noch bei der Aktivfärbung eine eindeutige Detektion der *CPCR*. In Abbildung 11 a) sind in dem Gel, welches nach 2 h abgestoppt worden ist, zwei unscharfe Spots zu erkennen; in den nach 4 h abgestoppten Ansätzen des in Abbildung 11 b) dargestellten Versuchs ließ sich allerdings nur noch ein Spot detektieren. Dementsprechend konnte keine eindeutige Information über die Zusammen-

---

setzung der beiden vorliegenden Proteinbanden aus dem nativen Laufverhalten der aufgetragenen Proteinfractionen erzielt werden.



---

**Abbildung 11:**

**Native PAGE der Elutionsfraktionen aus der Affinitätschromatographie.**

a) Bahn 1,2: Affinitätschromatographieproben/Parallelansätze, Abstoppen der nativen PAGE nach 2 h

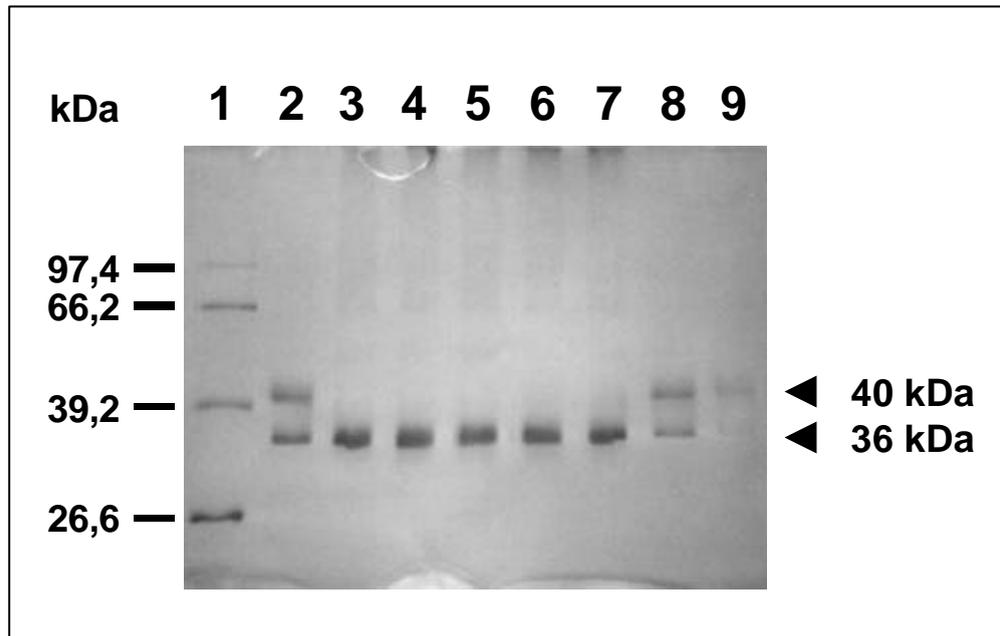
b) Bahn 1,2: Affinitätschromatographieproben/Parallelansätze, Abstoppen der nativen PAGE nach 4 h

### **3.3 Denaturierung und Reduktion der Proteinmischfraktion aus der Affinitätschromatographie**

Zur weiteren Analyse des Laufverhaltens der in unterschiedlichen Banden beobachteten Proteine und deren weiteren Charakterisierung wurden Reduktions- und Denaturierungsversuche durchgeführt. Durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung wie z. B.  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) werden vorhandene inter- und intramolekulare Disulfidbrücken aufgespalten. Ein Aufkochen des Proteins bewirkt eine vollständige Denaturierung des Proteins und damit einen Verlust seiner nativen, chemischen und physikalische Eigenschaften. Um dieses Verhalten näher zu beschreiben, wurden *CPCR*-haltige Enzymfraktionen, die aus einer Affinitätschromatographie erhalten wurden, in mehreren Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen wahlweise mit  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT reduziert und ohne Denaturierungsschritt in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im Vergleich dazu wurden Proben

---

nicht reduziert, jedoch verschieden lang bei 95 °C denaturiert. Abbildung 12 zeigt eine Zusammenfassung der Studien. Das SDS-Gel wurde silbergefärbt.



---

**Abbildung 12:**

**Überprüfung der Reduktions- und Denaturierungsbedingungen**

Bahn 1: Protein-Standardmarker; Bahn 2: 10 % DTT, 2 min, 95 °C, Bahn 3 - 7: kein Zusatz von Reduktionsmittel, die Proben wurden unterschiedlich lang bei 95 °C denaturiert; Bahn 3: 2 min; Bahn 4: 4 min, Bahn 5: 6 min, Bahn 6: 8 min, Bahn 7: 10 min; Bahn 8, 9: Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol, keine Denaturierung; Bahn 8: 8 %  $\beta$ -Mercaptoethanol; Bahn 9: 3 %  $\beta$ -Mercaptoethanol.

In der in Bahn 2 gezeigten Kontrolle (2 min denaturiert, Zusatz von 3 % DTT) sind die Proteinbanden von 36 und 40 kDa aus den Elutionsfraktionen der finalen Affinitätschromatographie wieder zu beobachten. In den Bahnen 3 – 7 wurde durch die exemplarisch im gezeigten Gel aufgetragenen Proben ohne Reduktionsmittel bei verschiedenen Denaturierungszeiten jeweils nur eine Bande von 36 kDa detektiert. Der Zusatz an  $\beta$ -Mercaptoethanol in Konzentrationen von 3 - 8 % in Bahn 8 und 9 zeigte allerdings eine Veränderung des Laufverhaltens der Proben. Offensichtlich hatte die Länge der Denaturierungszeit  $\geq 2$  min der Proben keinen detektierbaren Einfluß auf deren Laufverhalten in der SDS-PAGE. Durch die Steigerung der Konzentration des  $\beta$ -Mercaptoethanol auf bis zu final 8 % bei gleichen Auftrag der Proteinkonzentrationen von 20  $\mu$ g pro Bahn konnte immer deutlicher gezeigt werden, dass die beiden distinkten Banden zwei unterschiedliche Proteine darstellen. Würde es sich nur um ein Protein handeln, welches im nicht reduzierten Zustand als

---

Homodimer im SDS-Gel detektiert wird, so könnte die Aufspaltung von inter- bzw. intramolekularen Disulfidbrücken durch Reduzierung der Proben nicht zur Detektion von zwei Proteinbanden mit unterschiedlicher Größe führen. Sowohl für ein Homodimer als auch für ein Heterodimer muss die Summe der Molekulargewichte der Monomere zu einem Molekulargewicht in der Größenordnung des Dimers liegen. Diese Bedingung wird von den beiden identifizierten Proteinen nicht erfüllt.

### 3.4 N-terminale Proteinsequenzierung der „CPCR“

Zur Identifizierung der beiden detektierten Proteinbanden in den durch Affinitätschromatographie aufgereinigten Proben wurden die Proteine erneut in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit jeder geblotteten Amidoschwarz gefärbten Proteinbande eine automatisierte Edman-Sequenzierung durchgeführt [Edman, 1956; Baumann, 1990]. Bei beiden analysierten Proteinen konnten jeweils die ersten 26 Aminosäuren identifiziert werden. Allerdings konnte die erste Aminosäure des Proteins der 36 kDa Bande und die 15. Aminosäure des Proteins der 40 kDa Bande wegen störender Salze nicht eindeutig bestimmt werden. Abbildung 13 zeigt den jeweils identifizierten N-Terminus des Proteins der 36 kDa und der 40 kDa Bande.

---

-X-Lys-Val-Ala-Val-Leu-Gly-Ala-Ala-Gly-Gly-Ile-Gly-Gln-Pro-Leu-Ser-Leu-Leu-Thr-Lys  
K V A V L G A A G G I G Q P L S L L T K  
-Leu-Asn-Pro-Asn-Val  
L N P N V Protein der **36 kDa** Bande

---

-Pro-Glu-Ile-Pro-Lys-Thr-Gln-Lys-Ala-Val-Val-Phe-Glu-Thr-X-Gly-Gly-Lys-Leu-Glu-Tyr-  
P E I P K T Q K A V V F E T X G G K L E Y  
-Lys -Asp-Ile-Pro-Val  
K D I P V Protein der **40 kDa** Bande

---

Abbildung 13:

#### N-terminale Proteinsequenzierung der Proteine der 36 und 40 kDa Bande

Die Proteinsequenz der 36 kDa Bande wurde bereits im Rahmen der Dissertation von *Zelinski* [1995] als N-Terminus der *CPCR* beschrieben. Eine Eingabe der gefundenen Proteinsequenz in die Protein-Datenbank/Brookhaven, USA, ergab

---

allerdings für das Protein der 36 kDa Bande, dass diese Proteinsequenz bereits von verschiedenen Organismen als N-Terminus von bestimmten Malatdehydrogenasen unter der EC-Nummer 1.1.1.37 seit Mitte der 80'er Jahre in der Datenbank eingetragen ist. Der Unterschied zu den bereits von *Zelinski* aufgestellten N-terminalen Sequenzdaten kann dadurch erklärt werden, dass die 1995 von *Zelinski* nach der Affinitätschromatographie homogen aufgereinigt wirkende *CPCR* als Flüssigprobe ansequenziert wurde und dadurch das Vorhandensein eines Zweitproteins nicht beobachtet werden konnte. *Zelinski* fand 1995 unter den damaligen Möglichkeiten der Datenbankrecherche keinerlei Homologien zu bekannten Proteinen und postulierte folglich die gefundene N-terminale Sequenz als Teil der *CPCR*-Sequenz. Der erneute Sequenzvergleich in der Datenbank ergab neben 75 % Homologien zu mitochondrialen Malatdehydrogenasen z.B. aus Eukalyptus [*Poeydomege et al.*, 1995] oder aus Wassermelonen [*Gietl et al.*, 1990; *Gietl et al.*, 1986] auch eine 80-85 %ige Homologie zu einer peroxisomalen Malatdehydrogenase aus Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* bzw. aus *E.coli* [*Steffan & McAlister-Henn*, 1992; *Steffan et al.*, 1992], (Abbildung 14 a).

---

1 )	KVAVLGAAGGIGQPLSLLTKLNPNV	„CPCR“ [ <i>Zelinski</i> , 1995], 36 kDa Bande
	KVAVLGA-GGIGQPLSLL-K--P-V	Homologie zwischen 1) und 2)
2 )	KVAVLGASGGIGQPLSLLLKNSPLV	MDH (EC. 1.1.1.37), Brookhaven, z.B. aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

---

**Abbildung 14 a**

**Homologievergleiche des Proteins der 36 kDa Bande mit ähnlichen Proteinen (Datenbank Brookhaven)**

a) Vergleich der N-terminalen Proteinsequenz des Proteins der 36 kDa Bande mit einer Malatdehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Die Sequenz des Proteins der 40 kDa Bande weist dagegen eine 80 %ige Homologie zu einer ADH 1 aus *Candida albicans* (Abbildung 14 b) bzw. eine 73,4 %ige Homologie zu einer sekundären Alkoholdehydrogenase aus *Klyveromyces marxianus* und eine 60 %ige Homologie zu einer ADH 3 als auch einer ADH 2 aus *Saccharomyces cerevisiae* auf [*Altschul*, 2001].

- 
- 3) PEIPKTQKAVVFETXGGKLEYKDIPV 40 kDa Bande  
 IPKTQKAVVF-T-GG-L-YKD-PV Homologie zwischen 3) und 4)
- 4) EQIPKTQKAVVFDTNGGQLVYKDYYPV ADH 1 (EC 1.1.1.1) aus *C. albicans*
- 

#### Abbildung 14 b

Homologievergleiche des Proteins der 40 kDa Bande mit ähnlichen Proteinen (Datenbank Brookhaven, USA)

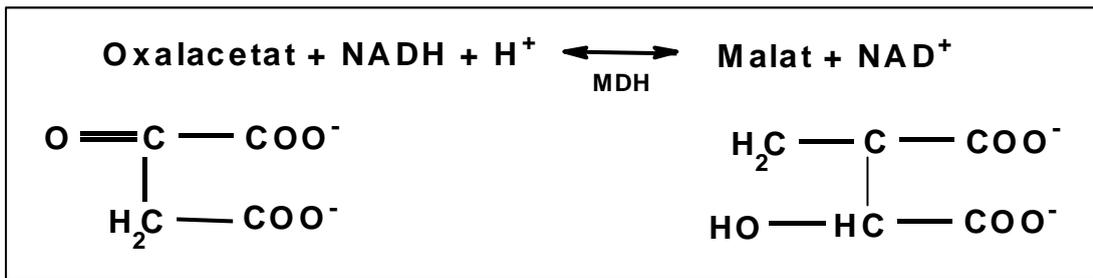
b) Vergleich der N-terminalen Proteinsequenz des Proteins der 40 kDa Bande mit der ADH I aus *Candida albicans*.

**I**: markiert die homologen Aminosäuren zwischen den einzelnen N-Termini der Vergleichsenzyme.

**E**: gibt jeweils die nicht homologen Aminosäuren der N-Termini der Vergleichsenzyme an.

### 3.6 Identifikation des 36 kDa Proteins der „CPCR-Elutionsfraktion“ als eine Malatdehydrogenase

Die zum Protein der 36 kDa Bande homologe Malatdehydrogenase gehört zur sogenannten Superfamilie von Oxidoreduktasen, die in die Isozyme MDH 1, MDH 2 und MDH 3 unterteilt wird [Bell *et al.*, 2001; Banaszak, 1966]. Als MDH1 bezeichnet man die mitochondrialen MDHs, als MDH 2 die cytoplasmatischen und als MDH3 die peroxisomalen Malatdehydrogenasen. MDHs der Klasse 1 und 2 können NADPH- oder NADH-abhängig sein. Enzyme der Klasse 3 sind immer NADH-abhängig. Die NADH-abhängigen Dehydrogenasen liegen als Homodimere vor und besitzen nativ ein Molekulargewicht von 60 - 70 kDa. Nach Denaturierung und Reduktion der vorhandenen Disulfidbrücke weisen diese ein Molekulargewicht von 30–35 kDa auf [Goward & Nicholls, 1994]. Abgesehen von der reversiblen Umsetzung von Oxalacetat zu L-Malat (Abbildung 15) sind nur sehr wenige weitere Substrate, wie z.B. 2-Oxobutyrat [Oshima *et al.*, 1986] oder L-(-)-2-Oxoglutarat [You & Kaplan, 1975] bekannt. Oxalacetat spielt eine wesentliche Rolle u.a. im Citratzyklus, bei der Aminosäuresynthese oder Glukoneogenese. Die Malatdehydrogenasen der Klasse 3 unterliegen der Glucoserepression. Die peroxisomale Malatdehydrogenase, die eine 80 %ige Homologie zu dem Protein der 36 kDa Bande zeigt, wurde bereits eingehend beschrieben und untersucht [Steffan *et al.*, 1992].



**Abbildung 15**

**Katalysierte Reaktion von Malatdehydrogenasen**

Umsetzung von Oxalacetat zu L-Malat unter Oxidation des Cofaktors NADH und umgekehrt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Enzymtests mit Enzymfraktionen aus der Affinitätschromatographie und Oxalacetat als Substrat durchgeführt. In diesen Tests wurde die Enzymaktivität der *CPCR* mit der Enzymaktivität einer cytoplasmatischen NADH-abhängigen MDH (Roche Diagnostics, Mannheim) aus Schweineherz verglichen. Es zeigte sich, dass die affinitätschromatographisch aufgereinigte Mischfraktion, die die Proteine der 36 und der 40 kDa Bande enthielt, neben dem Standardsubstrat ABEE der „*CPCR*“ auch Oxalacetat umsetzte. Pyruvat hingegen, das in diesen Tests als Negativkontrolle für die Umsetzungen der MDH diente, wurde von keinem der beiden Enzyme der Mischfraktion erwartungsgemäß umgesetzt. In der Literatur wird Oxalacetat als das einzig bekannte Substrat von Malatdehydrogenasen beschrieben [Birktoft, et al., 1989]. Die Tatsache, dass die kommerziell erhältliche MDH aus Schweineherz im Gegensatz zu der affinitätschromatographisch gereinigten Mischfraktion, die die Proteine der 36 und 40 kDa Bande enthält, Acetylbuttersäureethylester (ABEE) nicht umsetzt, wurde so interpretiert, dass für die Carbonylreduktaseaktivität das Protein der 40 kDa Bande verantwortlich sein könnte. Um diese Überlegungen zu bestätigen, mußte das Protein der 40 kDa Bande näher untersucht werden, d.h. die beiden Proteine mußten getrennt werden.

**3.7 Das 40 kDa Protein ist mit Alkoholdehydrogenasen verwandt**

Das Protein der 40 kDa Bande weist eine Homologie zu verschiedenen Alkoholdehydrogenasen auf. Die Alkoholdehydrogenasen werden wie die Malatdehydrogenasen ebenfalls in drei Gruppen eingeteilt [Jörnvall et al., 1987]. Als *medium chain* Dehydrogenasen werden zinkabhängige ADHs mit großen Untereinheiten von ca.

---

350 Aminosäuren bezeichnet. Die zweite Gruppe umfasst die *short chain* Dehydrogenasen. Diese sind zinkunabhängig und besitzen Untereinheiten von ca. 250 AS. Die *long chain* Dehydrogenasen sind eisenabhängig und besitzen über 380 AS große Untereinheiten. Während die letztgenannte Gruppe in der Enzymtechnik bisher keine Verwendung findet, gehören vor allem die *medium chain* Dehydrogenasen zu den industriell bedeutsamen Enzymen der Alkoholdehydrogenasen [Kula & Kragl, 2000; Hummel, 1999]. Mit Hilfe dieser Enzyme können chirale Alkohole hergestellt werden, die Ausgangsstoffe für die Produktion von Herbiziden und Pharmaka sind. Die hierbei in hoher Ausbeute isolierten Alkoholdehydrogenasen zeichnen sich durch hohe Stabilität, breite Substratspektren und durch Enantioselektivität der Reaktionen aus. Kommerziell erhältliche Alkoholdehydrogenasen sind z. B. die Pferdeleber-ADH (HL-ADH), die ADH I aus *Saccharomyces cerevisiae* [Klinman, 1972], eine thermostabile ADH aus *Thermoanaerobium brockii* [Lamed & Zeikus, 1981] sowie (S)-ADH aus *Rhodococcus erythropolis* [Hummel, 1997].

Durch die bereits beschriebene Breite des Substratspektrums der CPCR, deren Enantioselektivität, wie auch die Metallkationenabhängigkeit des katalytischen Zentrums [Peters et al., 1993], kann diese Carbonylreduktase in die Gruppe der *medium chain* Dehydrogenasen eingestuft werden. Auch die Größe dieser ADHs mit Untereinheiten von ca. 350 AS deckt sich mit der Größe des Proteins der 40 kDa Bande. Das homologe Enzym ADH 1 aus *Candida albicans* ist ein NADH-abhängiges, 80 kDa großes Homodimer, das aus Untereinheiten von ca. 40 kDa besteht [Shen et al., 1991].

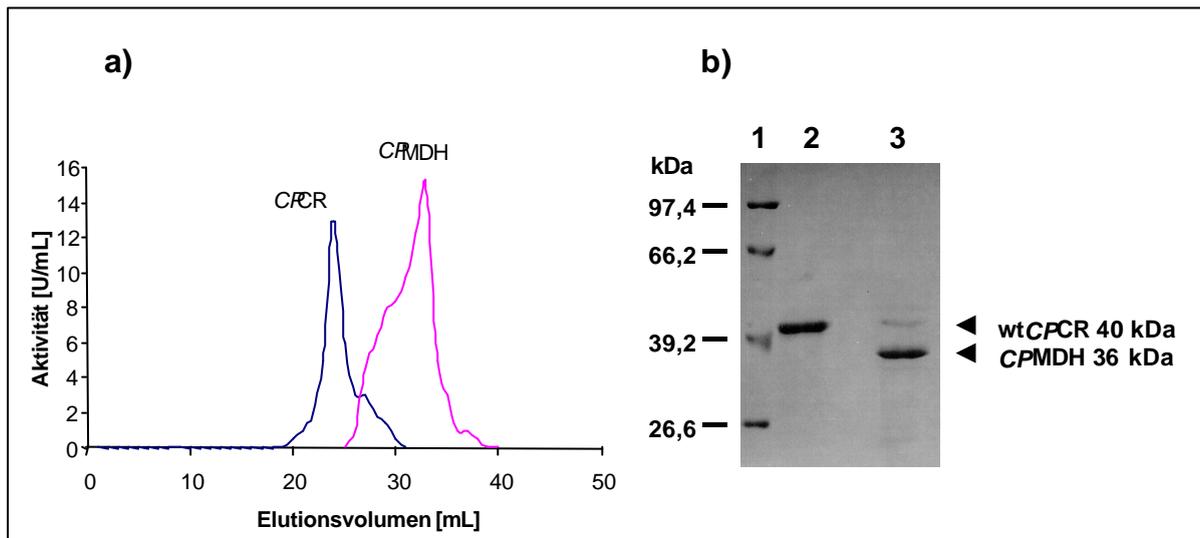
Um das Protein der 40 kDa Bande eindeutig als eine *medium chain* Dehydrogenase zu identifizieren, musste die Malatdehydrogenase von dem Protein der 40 kDa Bande getrennt werden.

### **3.8 Gelfiltration**

Um einerseits abschließend zu klären, ob es sich bei den aus Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinen um ein Enzym mit Carbonylreduktase- und Malatdehydrogenasefunktion handelt oder andererseits um zwei verschiedene Dehydrogenasen, wurde eine Gelfiltration an Superdex G75 mit 50 cm Laufstrecke zur möglichen Trennung der Mischfraktion durchgeführt. Mit Hilfe dieser Gelfiltration konnten die Proteine getrennt werden; die Auftrennung gelang allerdings nur mit geringer Ausbeute. Bei einem Auftrag von 5 mg Proteinfraction / mL konnten durchschnittlich

nur 100 - 500 µg reine Proteinfraktionen gewonnen werden, da sich neben den homogenen Fraktionen weiterhin Mischfraktionen ergaben. Abbildung 16 a, b zeigen den Gelfiltrationsverlauf und die Auftrennung der Elutionsfraktionen im Coomassie gefärbten SDS-Gel.

In Abb. 16 a) ist der Verlauf einer solchen Gelfiltration dargestellt. Im gezeigten Chromatogramm ist das Elutionsvolumen gegen die Enzymaktivität bei den Umsetzungen der Malatdehydrogenase und der Carbonylreduktase aufgetragen.



**Abbildung 16**

Abtrennung der 36 kDa und 40 kDa Fraktion

**a)** Auftrennung der Proteine der beiden Proteinbanden von 36 und 40 kDa durch Gelfiltration G 75.

**b)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen, Coomassie gefärbt.

Bahn 1: Protein-Standardmarker; Bahn 2: 40 kDa Bande, Bahn 3: 36 kDa Bande Die Proben aus Bahn 2 bzw. 3 wurden 2 min bei 95 °C denaturiert und durch Zugabe von 3 % β-Mercaptoethanol reduziert. Es wurden Elutionsfraktion bei einem Elutionsvolumen bei a) von 22 mL und b) von 28 mL verwendet.

Es sind zwei deutliche Peaks zu erkennen. Fraktionen dieser Peaks wurden in einer SDS-PAGE analysiert. Die in Abbildung 16 b dargestellte Coomassiefärbung des SDS-Gels zeigt, dass die Fraktion des Proteins der 40 kDa Bande nur ein Protein von dieser Größe enthält. Ebenso ist in der Fraktion der Proteine der 36kDa Fraktion ein Protein von 36 kDa das deutlich angereicherte Protein. Die Tatsache, dass sich die beiden Proteine mit Hilfe einer Gelfiltration trennen ließen, zeigte, dass es sich bei der Mischfraktion nicht um ein Heterodimer einer ADH und einer MDH Untereinheit handelte. Die beiden Proteine stellen zwei unterschiedliche Enzyme dar,

---

die bisher nicht vollständig gereinigt wurden. Das Protein der 40 kDa Bande, entspricht der *CPCR*. Für das vollständig gereinigte 40 kDa Protein wurde eine spezifische Carbonylreduktaseaktivität von 1432 U/mg bestimmt. Die Gesamtausbeute lag bei 10 %. Dies entspricht einem Aufreinigungsfaktor von 4475. Dementsprechend liegt der Aufreinigungsfaktor höher verglichen mit den von *Peters et al.*, 1993 veröffentlichten Daten. Die spezifische Aktivität des homogen vorliegenden Enzyms war um den Faktor 0,3 geringer. Da die Carbonylreduktase sich stabil in diesen Werten (Lagerung, 28 Tage bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 25 % Glycerin) zeigte, kann dieser Unterschied auf die Proteinbestimmungen zurückgeführt werden. Die Grundaktivität des aufgeschlossenen zellfreien Rohextrakts von 0,6 U/mg in den von *Peters et al.*, 1993 beschriebenen Daten lag im Vergleich mit einer in dieser Arbeit beschriebenen Rohextraktaktivität von 0,32 U/mg höher.

Das 36 kDa Protein ist nach dieser Analyse als eine Malatdehydrogenase der *Candida parapsilosis* (*CPMDH*) anzusehen.

Trotz des hohen Ausbeuteverlustes durch die Methode der Größenausschlusschromatographie wiesen weitere getestete Aufreinigungsmethoden wie eine erneute Ionenaustauscherchromatographie jedoch noch größere Nachteile auf. Dazu zählt der große Zeitaufwand dieser Chromatographiemethode und die Tatsache, dass die 36 kDa Bande vermutlich nicht von der 40 kDa getrennt worden wäre, da das peroxisomale MDH-Homologieenzym ebenfalls von Ionenaustauschern bei einem linearen Salzgradienten bei 100 mM NaCl eluiert werden kann [*Breiter et al.*, 1984]. Darüber hinaus wurden im Vorfeld Aufreinigungen mittels hydrophober Interaktions-Chromatographie wie auch Metallchelate-Affinitätschromatographie durchgeführt, die zu geringen Ausbeuten und erhöhten Aktivitätsverlust von bis zu 50 % führten.

## **3.9 Identifizierung des 40 kDa Proteins als *CPCR***

### **3.9.1 Substratspektrum**

Um das 40 kDa Protein weiter zu charakterisieren, wurde das von *Peters et al.*, 1993 angegebene Substratspektrum der *CPCR* auszugsweise überprüft. In den Tabellen 10 und 11 sind die Analysen mit Substraten für die Reduktions- und für die Oxidationsreaktionen dargestellt und mit den jeweiligen relativen Umsetzungen des 36 kDa Proteins (*CPMDH*) wie auch mit der kommerziell erhältlichen Malatdehydrogenase (Roche Diagnostics, Mannheim) aus Schweineherz verglichen. Es wurden nur

vollständig aufgereinigte Proteinfractionen nach der Gelfiltration für die Enzymtests verwendet.

**Tabelle 70:** Überprüfung des Substratspektrums der *CPCR* anhand der Reduktionsreaktion, gemessen in relativen Aktivitäten (%), bezogen auf 100 % Umsetzung von ABEE für die Carbonylreduktase und 100 % Umsetzung von Oxalacetat für die MDH.

Substrat	40 kDa Bande <i>CPCR</i>	36 kDa Bande <i>CPMDH</i>	MDH (Roche Diagnostics, Mannheim)
ABEE	100 %	-	-
Oxalacetat	-	100 %	100 %
2,5 Hexandion	126 %	-	-
MDA	40,8 %	-	-
Acetaldehyd	150 %	-	-
5-Oxohexansäureethylester	100 %	-	-

Tabelle 10: Reduktionsreaktion: 8 mM Substrat, 0,2 mM NADH, 100 mM TEA/NaOH, pH 7,0

Die Beobachtung, dass Oxalacetat sowohl von dem Protein der 36 kDa Bande wie auch von der kommerziell erhältlichen MDH umgesetzt, bestätigte die Annahme, dass das Protein der 36 kDa Bande als *wtCPCR* ausgeschlossen werden kann. Das Protein kann hingegen über die beobachtete Reaktion eindeutig als Malatdehydrogenase aus *C. parapsilosis* beschrieben werden. Das Protein der Fraktion der 40 kDa Bande setzte alle Substrate der *CPCR* in den entsprechenden Oxidations- und Reduktionsreaktionen um. Die detektierten Umsetzungen der Substrate ergaben abgesehen von leichten Meßschwankungen, die bereits bekannten Daten [Peters et al., 1993]. Das identifizierte 40 kDa Protein zeigte also das charakteristische Substratspektrum der Carbonylreduktase.

**Tabelle 11:** Überprüfung des Substratspektrums der *CPCR* anhand der Oxidationsreaktion, gemessen in relativen Aktivitäten (%), bezogen auf HHEE als Absolutumsatzwert.

Substrat	40 kDa Bande CPCR	36 kDa Bande CPMDH	MDH (Roche Diagnostics, Mannheim)
HHEE	100 %	-	-
(2S,5S) Hexandiol	57 %	-	-
Ethanol	10 %	-	-
Methanol	-	-	-
2-Propanol	40 %	-	-

Oxidationsreaktion: 8 mM Substrat, 0,5 mM NAD, 100 mM TEA/NaOH, pH 7,0

Die Umsetzung von ABEE wurde für die Reduktionsreaktion und die HHEE für Oxidationsreaktion auf 100 % gesetzt. Standardbedingungen: T=37 °C,  $\lambda=340$  nm.

### 3.9.2 Temperatur- und pH-Optimum

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Reduktionsreaktion der CPCR ausgerichtet war, wurde das pH- und Temperaturoptimum des Enzyms für die Reduktion von ABEE als Substrat mit einem quantitativen Enzymtest überprüft (Abbildung 17 a, b).

Die in Abbildungen 17 a) und b) bestimmten Meßwerte entsprachen den Beobachtungen von *Peters et al.*, 1993 der für die CPCR ein pH-Optimum bei pH 7,8 und ein Temperaturoptimum bei ca. 37 °C bestimmt hatte [*Peters et al.*, 1993].

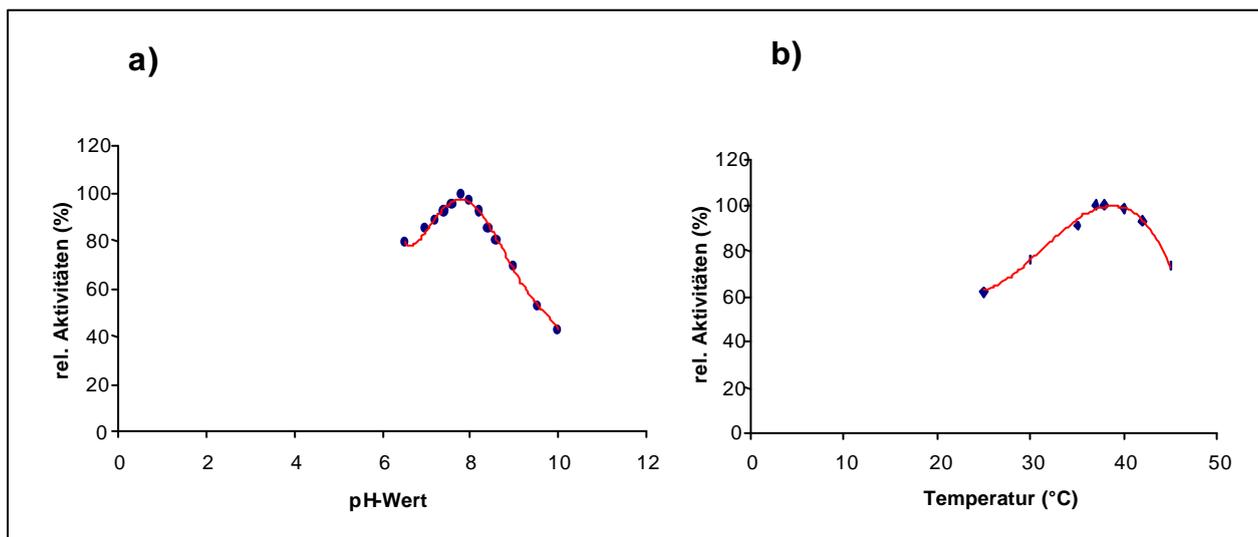


Abbildung 17

Temperatur- und pH-Optimum der 40 kDa Proteinfraction.

---

a) Überprüfung des pH-Optimums der 40 kDa Proteinfraktion.

Es wurden pH-Werte zwischen 6,5 - 10 unter Standardbedingungen getestet.

b) Überprüfung des Temperaturoptimum der 40 kDa Proteinfraktion.

Der Reaktionsansatz wurde auf Temperaturen zwischen 25 – 45 °C inkubiert und unter Standardbedingungen getestet.

### 3.9.3 Isoelektrischer Punkt

In einer zweidimensionalen Gelelektrophorese wurde der isoelektrische Punkt (pI) des 40 kDa Proteins bei 6,8 detektiert. Dieser Wert korrelierte mit den bereits für die *CPCR* beschriebenen Werten [*Peters et al.*, 1993].

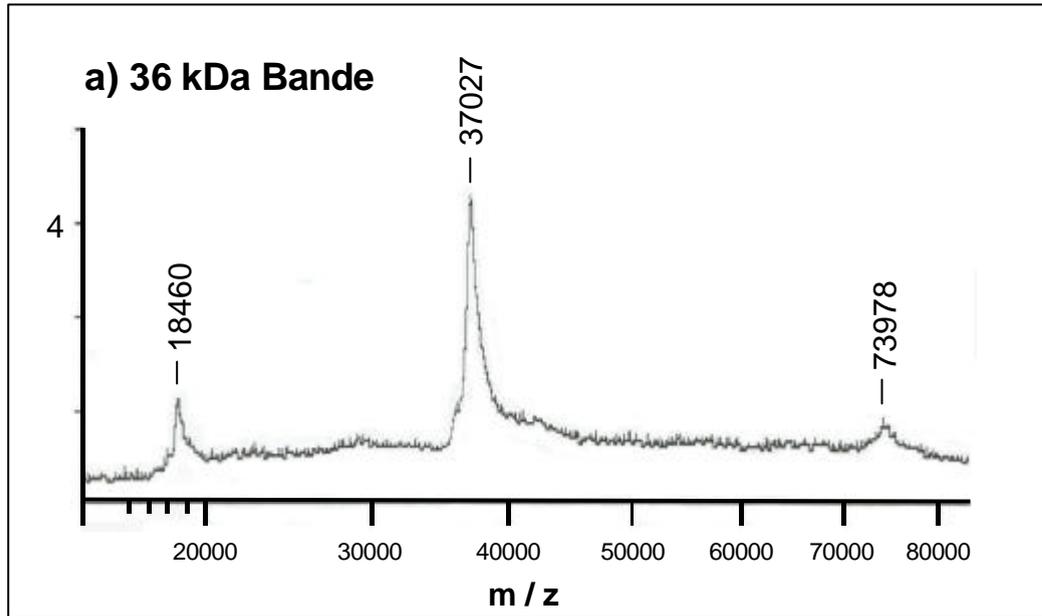
### 3.9.4 Bestimmung des Molekulargewichts

In einer weiteren Versuchsreihe wurde im Rahmen dieser Arbeit das Molekulargewicht der Proteine der 40 kDa Fraktion aus *Candida parapsilosis* durch weitere Methoden bestimmt. Die Größenausschluß-Gelfiltrationschromatographie mit Ausschlußgrößen bis zu 200 kDa stellt hierbei ein weiteres Verfahren zur Charakterisierung des Molekulargewichts im nativen Zustand dar. Das Molekulargewicht wurde hierbei über das hydrodynamische Volumen des Proteins durch einen Vergleich mit verschiedenen Eichproteinen bestimmt. Mit Hilfe einer Analyse an G-200 wurde das native Molekulargewicht der *CPCR* mit 79 kDa als Dimer ermittelt.

Als denaturierende Absolutmethode wurde eine massenspektrometrische Messung des Molekulargewichts angewendet. Dadurch wurde ein Molekulargewicht für die *CPMDH* von 37 kDa bestimmt (Abbildung 18 a). Für die 40 kDa Bande wurde mit dem MALDI-TOF-MS ein Molekulargewicht von 39,9 kDa ermittelt (Abbildung 18 b).

Die bestimmte molekulare Masse für die *CPCR* liegt nahe an dem Wert von 39 – 40 kDa, der durch SDS-PAGE bzw. Gelfiltration gefunden wurde. Die Massenspektromettermethode gilt mit Abweichungen von 0,5 - 1 % als sehr genaues Analyseverfahren. Bei einer SDS-Gelelektrophorese kann indes eine Standardabweichung bis zu 10 % auftreten. Dies gilt auch für die Gelfiltrationsmethode. Die molekulare Masse des Monomers der Malatdehydrogenase wurde mit Hilfe der MALDI-TOF-MS Analytik mit einem Molekulargewicht von 37 kDa gemessen. Dies entspricht den Größenbereich von beschriebenen Literaturwerten für peroxisomale Malatdehydrogenasen. Diese Ergebnisse bestätigten erneut, dass das vormals als *wtCPCR* beschriebene 36 kDa Protein [*Zelinski*, 1996] eine peroxisomale NADH-abhängige Malatdehydro-

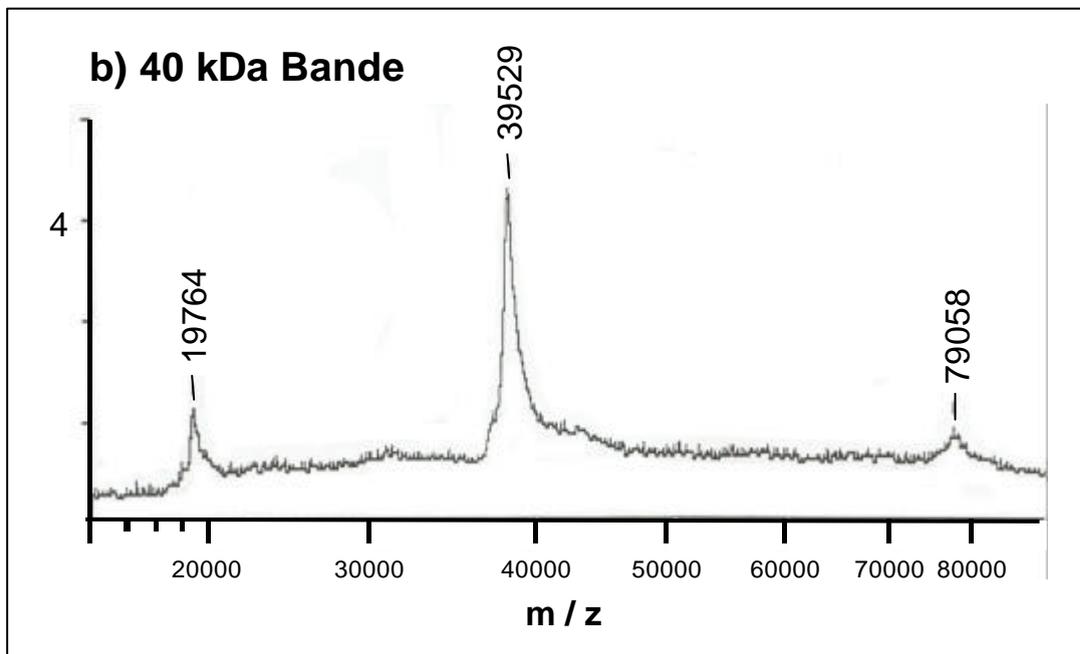
genase ist. Das identifizierte 40 kDa Protein entspricht diesen Ergebnissen zu Folge der Carbonylreduktase, die *Peters et al.*, beschrieben hatten [*Peters et al.*, 1993].



**Abbildung 18**

a) MALDI-TOF-MS der CPMDH

Massenspektrum der 36 kDa Bande



**Abbildung 18**

b) MALDI-TOF-MS der CPCR

Massenspektrum der 40 kDa Bande

### 3.9.5 Bestimmung des $K_M$ -Werts

Zur weiteren Identifizierung des Proteins der 40 kDa als *CPCR* wurden die kinetischen Parameter  $K_M$  und  $V_{max}$  der Reduktion von Acetylbuttersäureethylester in dem in Abbildung 19 dargestellten Versuch überprüft. ABEE ist als Standardsubstrat im „Screening“ bei der Umsetzung von Ketoestern verwendet worden und führte zur Entdeckung der *CPCR*. Die Enzymreaktion kann in einem wäßrigen System durchgeführt werden, da ABEE mäßig in Wasser löslich ist. Die Auswertung erfolgte mit Excel „Solver Routine“ von Microsoft durch nicht lineare Regression.

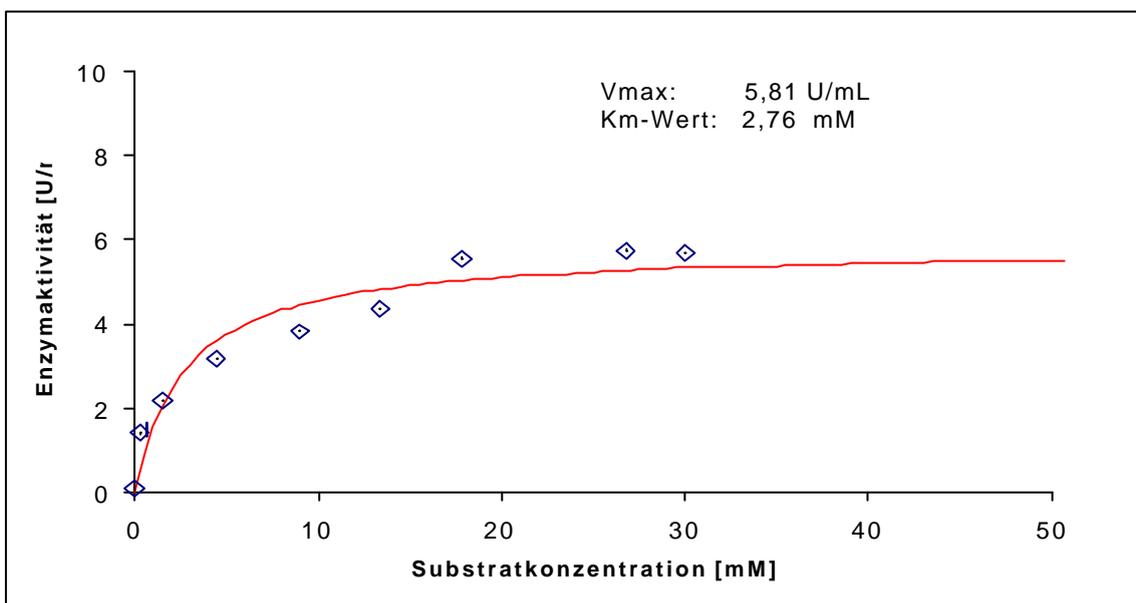


Abbildung 19

#### Enzymkinetik des 40 kDa-Proteins (0,2 mg/mL) für die Umsetzung von ABEE

$V_{max}$  und  $K_M$  wurden durch die Messung der Anfangsgeschwindigkeiten  $v$  bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt.

### 3.9.6 Einfluß verschiedener Agentien auf die Enzymaktivität

Um die Identifizierung des 40 kDa-Proteins als *CPCR* abzuschließen, wurden Inhibitionsstudien mit verschiedenen Reagenzien durchgeführt. Intensiv wurde der Einfluß von Zinkionen auf die Aktivität des 40 kDa Proteins untersucht, da es durch den Homologievergleich mit der ADH 1 aus *Candida albicans* den zinkabhängigen Alkoholdehydrogenasen zugeordnet werden könnte [Jörnvall et al., 1987]. Peters et al., 1993 untersuchten bereits den Einfluß von Zink auf die Carbonylreduktase und stellte fest, dass bei Zusatz von 0,1 mM  $Zn^{2+}$  nach 30 min nur noch 24 % und bei Zusatz

von 1 mM Zinkionen keine Aktivität im Vergleich zu der Aktivität, die ohne Zinkzugabe mit ABEE als Substrat im Standardenzymtest zu finden war [Peters et al., 1993]. Da  $ZnCl_2$  viel reaktiver durch die nach der Bindung von Zink freigesetzten Chloridionen wird, welches eine desaktivierende Wirkung auf das Enzym verursachen kann, wurden die Zinkstudien mit  $ZnSO_4$  wiederholt.  $ZnSO_4$  wirkt schonender, da sich das Sulfat nach Abspaltung neutral verhält. Es wurden Aktivitätstest mit verschiedenen  $ZnSO_4$ -Lösungen bei 4 °C und 25 °C in Dreifachansätzen mit den aufgereinigten 40 kDa Proteinfractionen durchgeführt. Die Aktivität wurde nach 15 und 45 min bestimmt (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Einfluß von Zinkionen auf die Restenzymaktivität der wtCPCR

Standardenzymtests wurden in 100 mM TEA/NaOH bei pH 7,0 und 8 mM ABEE wie 0,2 mM NADH bei 37 °C durchgeführt und die Substratumsetzung bei Einfluß von Zinkionen bei 340 nm gemessen.

Zinkkonzentration	25 µM	125 µM	250 µM	500 µM	1 mM	5 mM
15 min, 25 °C	98 %	97 %	96 %	94 %	90 %	88 %
15 min, 4 °C	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	95 %
45 min, 25 °C	90 %	88 %	87 %	85 %	83 %	78 %
45 min, 4 °C	92 %	91 %	90 %	90 %	87 %	82 %

Diese Messungen ergaben bei den verschiedenen Konzentrationen von Zinkionen keine Inaktivierung der Enzymaktivität. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von Peters et al., 1993, deckte sich aber mit der Zinkabhängigkeit von *medium chain* Alkoholdehydrogenasen. Der Rückgang der relativen Aktivitäten sowohl bei 15 min als auch 45 min bei einer Temperatur 25 °C war im Vergleich zu den Werten bei 4 °C eher auf die Inkubationstemperatur als auf den Einfluß der Zinkionen zurückzuführen. Die niedrigsten Aktivitäten wurden mit 5 mM  $ZnSO_4$  ermittelt. Diese Beobachtung war am deutlichsten bei einer Inkubation von 45 min bei 25 °C. Neben der langen Inkubation bei Raumtemperatur, konnte durch die hohen Konzentration von 5 mM eine Inhibierung durch den Zinküberschuß erzielt werden.

---

Zink, das im Periodensystem zu den Nebengruppen gehört, verfügt über freie d-Orbitale, die es dem Zinkion ermöglicht eine Vielzahl an Reaktionsmöglichkeiten einzugehen. Durch  $sp^3$  Hybridisierungen bildet Zink mit seinen Reaktionspartner eine klassische tetragonale Anordnung, obwohl für Enzyme eine verzerrte tetragonale Form beschrieben wurde [Robson & Garnier, 1988]. Die eingehend untersuchte HL-ADH besitzt eine solche verzerrte tetragonale Form [Eklund et al., 1976]. Im katalytischen Zentrum wird das katalytische Zinkion dieser Alkoholdehydrogenase durch einen Histidinrest, zwei Cysteinreste und  $H_2O$  koordiniert [Bränden et al., 1975]. Für die Interaktion von Metallkationen und Aminosäuren sind die Elektronendonorrreste der Aminosäuren die entscheidenden Metalliganden. Zink, das als starke Lewisäure reagiert und sowohl Carboxyl- wie auch Sulfhydrylgruppen als Liganden akzeptieren kann, wird bei den meisten zinkhaltigen Enzymen entweder wie bei der HL-ADH über zwei Cysteinreste mit einem Histidinrest [Bränden et al., 1975] oder über zwei Histidinreste mit einer sauren Aminosäure koordiniert [Cunningham et al., 1990]. Als vierter Ligand bindet immer  $H_2O$  [Vallee & Auld, 1990].

Für die *CPCR* ist ein geordneter *Bi-Bi*-Reaktionsmechanismus wie für die zinkabhängige HL-ADH bestimmt worden [Peters et al., 1993].

Neben dem Einfluß von Zinkionen wurde auch der Einfluß von  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und  $Fe^{3+}$  wie auch der Chelatbildner EDTA und o-Phenanthrolin, des Salzes KCN und des Sulfhydryl-Schutz-Reagenzes DTT bei den Konzentrationen von 0,1 und 1 mM bei 15 und 30 min, bei einer Temperatur von 25 °C in Dreifachansätzen untersucht (Tabelle 13, nächste Seite). Diese Analyse wurde mit Hilfe des Standardenzymtests mit ABEE als Substrat (100 % relative Aktivität) durchgeführt.

Diese Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse für das im Rahmen dieser Arbeit isolierte 40 kDa Protein im Vergleich zu den bereits publizierten Inhibitionsstudien der beschriebenen Enzymmischung der *CPCR* [Peters et al., 1993]. Das 40 kDa Protein wie auch die nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht vollständig aufgereinigte *CPCR* werden durch  $Hg^{2+}$  und  $Ni^{2+}$  vollständig inhibiert. Quecksilberionen wirken schon in geringen Konzentrationen von weniger als 0,1 mM inaktivierend auf das Protein, Nickelionen erst in Konzentrationen über 0,1 mM.  $Fe^{3+}$ -Ionen zeigen einen geringeren Einfluß auf die Aktivität des Biokatalysators, bewirken aber bei längerer Inkubation von über 30 min bei 1 mM jedoch ebenfalls eine vollständige Inaktivierung des Proteins. KCN zeigte keinerlei Einfluß auf die Enzymaktivität. Der Che-

**Tabelle 13:** Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die Restaktivität der wtCPCR

<b>c (Inhibitor)</b> <b>Inhibitor</b>	<b>0,1 mM</b> <b>15 min, 25°C</b>	<b>1 mM</b> <b>15 min, 25°C</b>	<b>0,1 mM</b> <b>30 min, 25 °C</b>	<b>1 mM</b> <b>30 min, 25 °C</b>
<b>Hg<sup>2+</sup></b>	0 %	0 %	0 %	0 %
<b>Ni<sup>2+</sup></b>	50 %	0 %	12 %	0%
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	95 %	91 %	90 %	85 %
<b>EDTA</b>	100 %	87 %	100 %	82 %
<b>DTT</b>	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>o-Phenanthrolin</b>	40 %	10 %	26 %	0 %
<b>KCN</b>	100 %	100 %	100 %	100 %

lator EDTA, der neben Zn<sup>2+</sup> andere bivalente Ionen wie Mg<sup>2+</sup> oder Ca<sup>2+</sup> komplexiert, zeigte in der Konzentrationen 0,1 keinen Effekt auf die Aktivität des 40 kDa Proteins. Allerdings nahm die Aktivität ab einer EDTA-Konzentration von 1 mM durch die zunehmende Komplexierung des Zinks ab. Der stärkere Komplexbildner o-Phenanthrolin, der vorzugsweise Zn<sup>2+</sup>-Ionen bindet, bewirkte schon in minimale Konzentrationen eine vollständige Inaktivierung des Proteins. Wie bereits dargestellt, wurde durch die Sequenzierung des 40 kDa Proteins eine hohe Homologie zu verschiedenen zinkabhängigen *medium chain* Alkoholdehydrogenasen gefunden. Zusätzlich wurde für den Reaktionsmechanismus der CPCR ein geordneter *Bi-Bi*-Mechanismus, wie er bei zahlreichen zinkabhängigen Alkoholdehydrogenasen vorliegt, gefunden [Peters et al., 1993]. Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass o-Phenanthrolin katalytische Zinkionen vom aktiven Zentrum des Proteins komplexiert und dies zur vollständigen und schnellen Inaktivierung des Enzyms führt. Das Sulfhydryl-Schutz-Reagenz DTT bewirkt keine Inhibierung des Enzyms. Dieses Reduktionsmittel bzw. der Komplexbildner wird eingesetzt, um die Oxidation essentieller SH-Gruppen zu verhindern. Bereits in von Peters et al. 1993 beschriebenen Untersuchungen der CPCR hatte dieses Reagenz einen stabilitätssteigernden Effekt [Peters et al., 1993].

Die Verschiebung des apparenten Molekulargewichts unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel (Abbildung 9 b) zeigt eine Konformationsänderung an und

---

könnte mit dem Lösen einer S-S-Bindung erklärt werden. Allerdings lassen sich aus den Inhibitionsstudien der *CPCR* [Peters *et al.*, 1993] keine eindeutigen Rückschlüsse auf die tatsächliche Existenz oder die Lokalisation von solchen Disulfidbrücken bzw. auf die Art und Funktion eines katalytischen Metallion schließen. Zudem verfügt die zur *CPCR* homologe Alkoholdehydrogenase aus *C. albicans* über keine Disulfidbrücke. Ein weiteres Indiz für das Fehlen von Disulfidbrücken ist der Vergleich mit der HL-ADH. Durch Positionsvergleiche bzw. hypothetisches Modelln (Institut für Biochemie, RWTH-Aachen) der *CPCR*-Struktur analog der Pferdeleber-ADH, sollte aufgrund der in beiden Sequenzen vorkommenden konservierten Cysteine keine SH-Brücke in der *CPCR* vorhanden sein [Alignment HL-ADH/*CPCR*, Anhang].

### **3.9.7 Zusammenfassung der Daten**

Die zahlreichen Übereinstimmungen bzgl. des Substratspektrums, der biochemischen Eigenschaften wie pH- oder Temperaturoptimum, pI, und  $K_M$ -Wert und der Einfluß verschiedener Reagenzien auf die Enzymaktivität des 40 kDa Proteins zeigen eindeutig, dass dieses Enzym der bereits beschriebenen, aber bisher nicht rein dargestellten *CPCR* aus *Candida parapsilosis* entspricht. Dementsprechend wurde bei allen weiteren Untersuchungen das 40 kDa Protein als Wildtyp-*CPCR* oder *wtCPCR* bezeichnet.

### **3.10 Identifizierung der Proteinsequenz der *wtCPCR***

Nach der eindeutigen Identifizierung der *wtCPCR* und der homogenen Aufreinigung durch eine finale Gelfiltration an G75 wurde eine proteolytische Spaltung zur Analyse der Proteinsequenz der Carbonylreduktase durchgeführt. Durch die hohe Homologie des N-Terminus der *wtCPCR* zu der ADH1 aus *Candida albicans* lag der Schluß nahe, dass noch weitere Proteinabschnitte der ADH 1, insbesondere der C-Terminus, eine Übereinstimmung mit konservierten Sequenzbereichen der *wtCPCR* aufwiesen. Dies eröffnete die Möglichkeit einer Zuordnung der aus der proteolytischen Spaltung erhaltenen Fragmente. Abbildung 20 zeigt die erhaltenen Proteinsequenzfragmente der *wtCPCR* mit der entsprechenden Zuordnung zu dem homologen Enzym ADH1 aus *Candida albicans*. Nach der Isolierung und Bestätigung des N-Terminus konnten nun auch zahlreiche Proteinsequenzteilmereiche wie auch der C-Terminus des Enzyms durch Homologievergleich bestimmt werden. Bezogen auf das

homologe Enzym ADH1 aus *C. albicans*, das aus 350 Aminosäuren besteht, wurde ca. die Hälfte der Aminosäuren in Peptiden ermittelt. Die analysierten Proteinsequenzen zeigten eine 85,5 % ige Homologie zur ADH 1 aus *Candida albicans*, eine 70 %ige Übereinstimmung zu einer ADH 1 aus *Klyveromyces marxianus* und 65,7 %ige Homologie zu einer ADH 1 aus *Saccharomyces cerevisiae* [Genbank, 2001].

Die hohe Homologie zu der Alkoholdehydrogenase aus *Candida albicans* ließ erwarten, dass die noch fehlenden Teilbereiche der wtCPCR ebenfalls homolog zu der ADH 1 sein könnten. Eine erste Unsicherheit bei der Bestimmung der wtCPCR an Position Nr. 15 ließ sich bei der erneuten Sequenzierung der Peptidfragmente aus der proteolytischen Spaltung vollständig klären. Es konnte eindeutig ein Serin identifiziert werden. Der N-Terminus konnte durchgehend bis zu 52 Aminosäuren sequenziert werden. Das C-terminale Ende schließt nach dieser Analyse mit einem Glutamin. Nach den homologen Sequenzen der Vergleichsenzyme enden alle drei Alkoholdehydrogenasen mit einem Lysin. Es wurde angenommen, dass auch die wtCPCR mit dieser Aminosäure am C-Terminus endet.



**Abbildung 20**

**Teilsequenzbereiche der wtCPCR im Vergleich zur ADH 1 aus *Candida albicans***

■ Die blau markierten Aminosäuren zeigen die Homologie zwischen den einzelnen Sequenzfragmenten der wtCPCR und der ADH 1 aus *C. albicans*. Die blauen, kursiven Aminosäuren stellen dabei die Teilsequenzen der Carbonylreduktase dar. ■ Die rot markierten Aminosäuren zeigen die

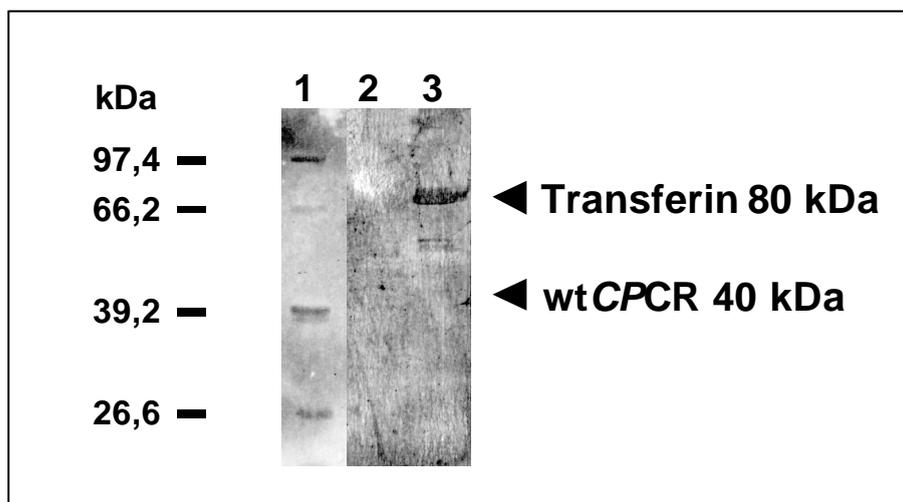
---

Unterschiede zwischen durchgehenden Homologiebereichen der wtCPCR und der ADH 1. : Die mit grün markierte AS Lysin stellt die hypothetische letzte AS des C-Terminus dar.

Vor allen Dingen durch die Identifizierung des N- und C-Terminus der Carbonylreduktase wurde ein essentieller Schritt zur Amplifizierung des wtCPCR-Gens und der daraus folgenden Gesamtproteinsequenz erreicht.

### 3.11 Analyse einer möglichen Glykosylierung der wtCPCR

Mit Hilfe eines Zuckertests sollte geklärt werden, ob die wtCPCR ein Glykoprotein ist. Glykosylierungen gehören zu den posttranslationalen Modifikationen, die ein Protein nach der Translation bis zum vollständigen nativen Zustand gegebenenfalls durchlaufen muß. Da ein Ziel dieser Arbeit die Klonierung und Expression der CPCR in einen *E.coli* Stamm war, *E.coli* Stämme als Prokaryonten allerdings nicht in der Lage sind diese für eukaryotische Proteine wichtige Modifikationen auszubilden, wäre bei Nachweis einer Glykosylierung der nativen CPCR eine rekombinante Expression eines aktiven Enzyms in *E.coli* nicht durchführbar gewesen. Es wurden 500 ng homogen aufgereinigte wtCPCR in einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und auf Glykoreste untersucht. Als Negativkontrolle wurde Creatinase, als Positivkontrolle Transferrin verwendet. Abbildung 21 stellt den Glykotest dar.



---

**Abbildung 21**  
**Test auf Glykolysierung der wtCPCR.**

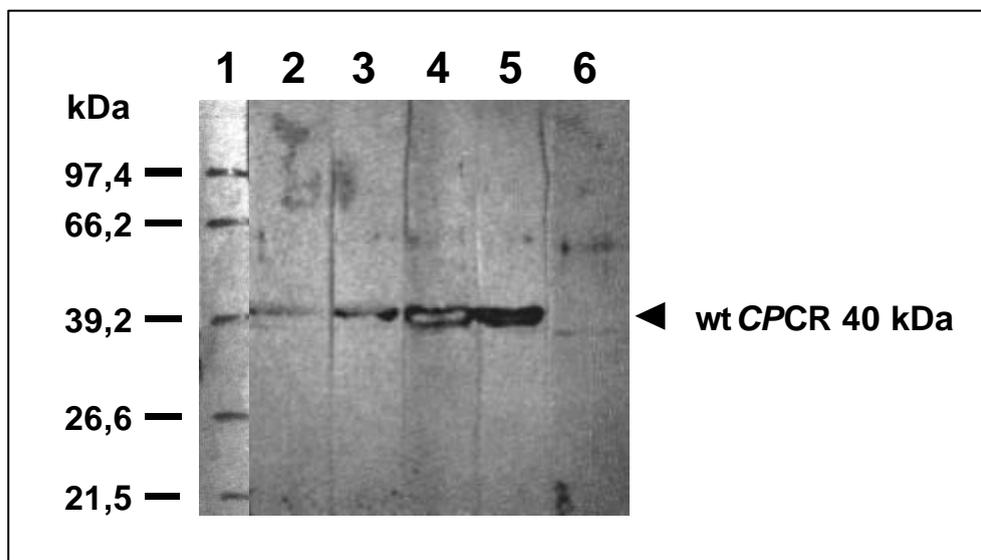
Bahn 1: Protein-Standardmarker, Bahn 2: 500 ng wt CPCR, Bahn 3: 500 ng Transferrin.

---

Es konnte kein Signal, dass eine Glykosylierung der wtCPCR aufgezeigt hätte, detektiert werden. Diesem Test zufolge besitzt die Carbonylreduktase keine Zuckerreste. Eine Klonierung und Expression der wtCPCR in *E.coli* wäre demnach möglich. Die Positivkontrolle Transferrin zur Überprüfung des Zuckertest zeigte hingegen ein deutliches, positives Signal. Die Negativkontrolle wurde nicht in Abbildung 21 aufgeführt.

### 3.12 Western Blot Analyse der wtCPCR mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers AKCPCR1

Für eine Detektion der Carbonylreduktase im Western Blot, insbesondere zum Screening positiver Klone nach einer Klonierung und Expression der rekombinanten CPCR, wurde gegen das Antigen wtCPCR ein polyklonaler Antikörper hergestellt. Die zu testenden Proben wurden vor der SDS-PAGE 2 min bei 99 °C denaturiert, mit 3 %  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert und anschließend auf Nitrocellulose geblottet. In Abbildung 22 ist die Detektion der wtCPCR mit Hilfe des Antikörpers AKCPCR1 im Western Blot dargestellt



**Abbildung 22**

**Immunoblotanalyse zur Detektion des Antigens CPCR durch den gegen die Carbonylreduktase gerichteten polyklonalen AKCPCR1.**

Bahn 1: Protein-Standardmarker, Bahn 2– 5: 1 µg Antigen wt CPCR + MDH, Bahn 2: 1:5000 AKCPCR1, Bahn 3: 1:3000 AKCPCR1, Bahn 4: 1:2500 AKCPCR1, Bahn 5: 1:1000 AKCPCR1, Bahn 6: 1 µg Antigen kommerzielle MDH, konjugiert mit 1:1000 AKCPCR1

---

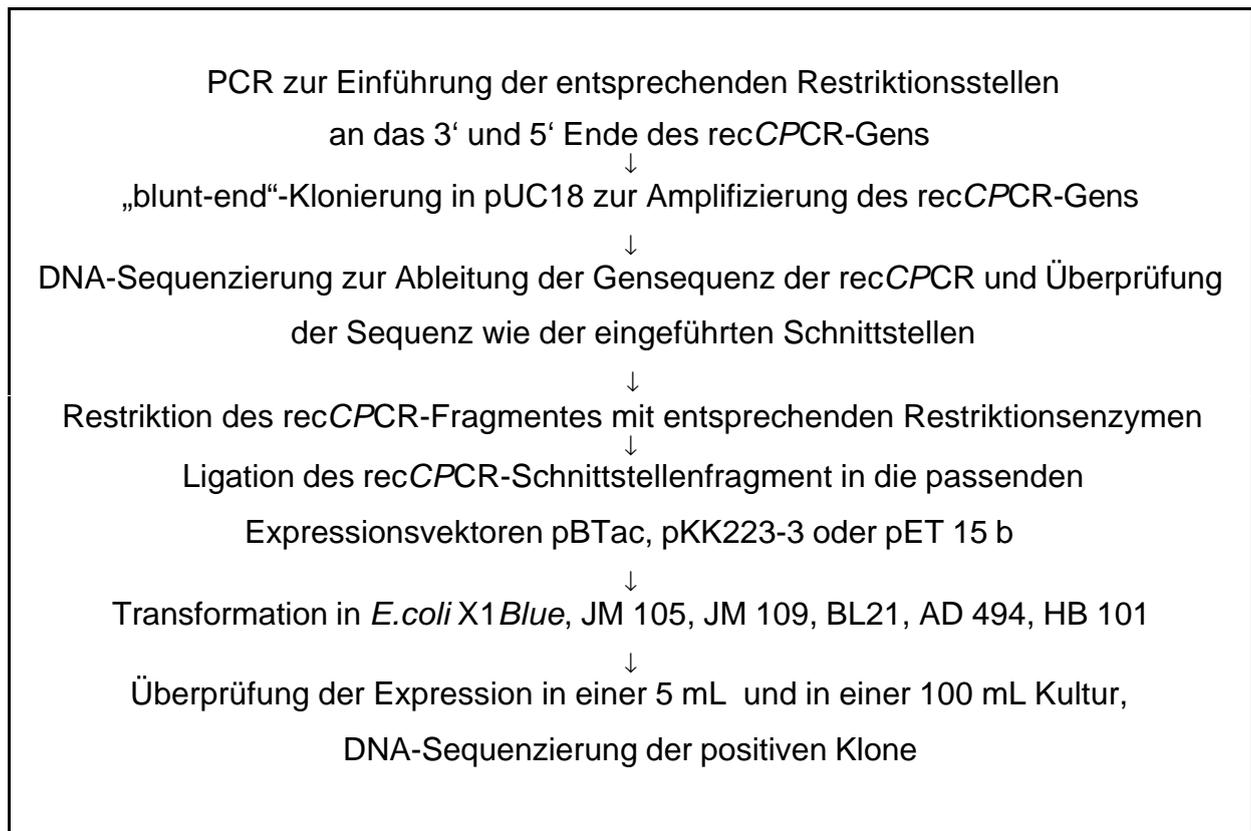
Neben dem Protein-Standardmarker in Bahn 1, wurden in den Bahnen 2 – 6 die Proteinmischfraktionen wtCPCR und CPMDH aus Affinitätschromatographieelutionsfraktionen aufgetragen. Es wurden 1 µg Proteinlösung pro Bahn verwendet. Bahn 2 zeigt den Antikörper AKCPCR1 mit einer Verdünnung von 1:5000 gegen die Mischfraktion der Affinitätschromatographie aus MDH und wtCPCR, Bahn 3 die Verdünnung des AKCPCR1 mit 1:3000, Bahn 4 mit 1: 2500, Bahn 5 mit 1:1000, Bahn 6 eine Verdünnung des AKCPCR 1 von 1:1000, gerichtet gegen eine gekaufte, aufgereinigte MDH aus Schweineherz (Roche Diagnostics, Mannheim). Wie man in Abbildung 22 in Bahn 2 – 5 erkennen kann, erkennt der AKCPCR1 die wtCPCR eindeutig. Die ebenfalls in der Fraktion enthaltene CPMDH wird bei keinem Ansatz mit jeweils unterschiedlichen Serumkonzentrationen erkannt. Bahn 5 zeigt die wtCPCR mit einer Antikörperverdünnung von 1:1000. Durch die geringe Verdünnung liegt hier das stärkste Signal im Vergleich zu Bahn 2, 3 und 4 vor. Bahn 2, 3, 4 und 5 zeigen deutlich die ansteigende Antikörperkonzentration von 1:5000 in Bahn 2 bis 1:1000 in Bahn 5. Bahn 6 zeigt mit der kommerziellen MDH eindeutig kein Signal bei einer Verdünnung von 1:1000. Dies bedeutet, dass der polyklonale Antikörper AKCPCR1 spezifisch für die wtCPCR ist und darüber hinaus keine Malatdehydrogenaseepitope erkennt.

## ***Herstellung einer rekombinanten CPCR***

Die Klonierung und Expression der recCPCR mit den dazugehörigen Schritten, die in den folgenden Kapiteln ausführlich behandelt werden, ist zur Übersicht schematisch in Abbildung 23 (siehe nächste Seite) vorweg dargestellt.

### **3.13 Präparation von genomischer DNA**

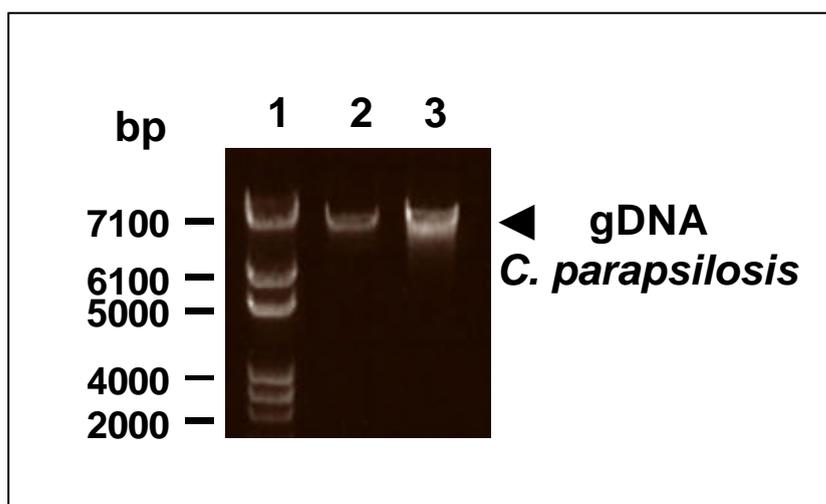
Nachdem, wie unter 3.10 beschrieben, die Aminosäuresequenz der wtCPCR teilweise bestimmt wurde, sollte ausgehend von den Proteinsequenzen des C- und N-Terminus des Enzyms das CPCR-Gen aus *Candida parapsilosis* mittels PCR kloniert werden. Für die PCR wurde genomische DNA aus *Candida parapsilosis* als Template verwendet. Die genomische DNA der Hefe wurde entsprechend eines Protokolls von *Ferbeyre et al.* isoliert [*Ferbeyre et al.*, 1993] und in einem Agarosegel auf ihre Intaktheit, Größe und Menge hin untersucht. In Abbildung 24 ist die elektro-



**Abbildung 23**

Fließdiagramm zur Klonierung des *recC*PCR-Gens in verschiedene Expressionsvektoren

phoretische Auftrennung der genomischen DNA (gDNA) in einem solchen Gel dargestellt.



**Abbildung 24**

Agarosegel (0,5 %) zur Analyse der isolierten genomischen DNA aus *Candida parapsilosis*.

---

Bahn 1. Kb-Leiter, Bahn 2: 750 ng genomische DNA aus *Candida parapsilosis*. Bahn 3: 1,5 µg genomische DNA aus *Candida parapsilosis*

In der Abbildung 24 ist zu erkennen, dass die präparierte genomische DNA hochmolekular und auch intakt war. Dadurch war die gDNA geeignet, um in einer PCR als Template zur Amplifizierung des *CPCR*-Gens eingesetzt zu werden.

### 3.14 Bestimmung der *CPCR*-Gensequenz

Aus der erfolgreichen Analyse der Aminosäuresequenz von Fragmenten (↳3.10) der *wtCPCR* ergaben sich für die Bestimmung der *wtCPCR*-Gensequenz zwei mögliche Vorgehensweisen. Zum einen war es durch die Vorarbeiten möglich mit Hilfe einer PCR das *CPCR*-Gen zu amplifizieren und das Produkt der Reaktion zu sequenzieren. Eine Alternative zu diesem Vorgehen stellt die Identifikation des *CPCR*-Gens innerhalb eines Genomabschnitts durch Hybridisieren mit einer genspezifischen Sonde dar, an die sich die Isolierung des identifizierten Fragments anschließt [Anhang]. Für beide Möglichkeiten gilt die Voraussetzung die identifizierten Aminosäuresequenzen unter Zuhilfenahme des genetischen Codes in DNA-Sequenzen zu übersetzen. Mit diesen Sequenzen können Oligonukleotide hergestellt werden, die dann entweder als genspezifische N- und C-terminale Primer für die Genamplifizierung eingesetzt werden oder als Primer zur Herstellung einer Sonde mittels PCR für die Hybridisierung dienen.

Für die Identifizierung der *wtCPCR*-Gensequenz wurde von der Prämisse ausgegangen, dass es sich bei den unter (↳3.10) beschriebenen C- und N-terminalen Aminosäuresequenzen um die vollständigen terminalen Sequenzen handelt. Aus diesen wurde durch einen Homologievergleich mit ADH's anderer Mikroorganismen, wie z.B. der *Candida albicans*, die in Abbildung 20 dargestellt ist, eine mögliche DNA-Sequenz der *CPCR* abgeleitet. Für die Konstruktion von C- und N-terminalen Primer wurden zusätzlich die Degenerierung des genetischen Codes sowie Erfahrungen aus der bei einer Rücktranskription von *Candida parapsilosis*-Proteine bekannten Bevorzugung bestimmter Codons bzw. das Spezies spezifische „Wobble“-Verhalten berücksichtigt („*Codon Usage*“, Anhang). Dabei wurden nach Möglichkeit die empirischen Regeln nach Rychlik und Rhoads eingehalten [Rychlik & Rhoads., 1989].

---

Die bereits ermittelte Proteinsequenz enthielt N-terminal kein Methionin. Aus diesem Grund wurde ein entsprechendes Methionin als Startcodon beim 5' Primer eingefügt. Dies sollte eine „*in-frame* Translation“ bei einer späteren Expression des isolierten *CPCR*-Gens in einen Vektor gewährleisten. Entsprechend wurde in den 3' Primer hinter die letzte Aminosäure des C-Terminus zwei Stopcodons, analog zu den Stopcodons der ADH 1 aus *Candida albicans* eingefügt, um eine effiziente Terminierung der Translation zu gewährleisten.

Die unter Berücksichtigung dieser Vorgaben ausgewählten Primersequenzen sind in Abbildung 25 dargestellt.

**5'Primer pUC18MBCPCR**

5' CCA GAG ATT CCA AAG ACT CAG AAG GCT GTT 3'

**3' Primer pUC18MBACPCR**

5' TTT TTG AGT ATC CAA AAC GTA TCT 3'

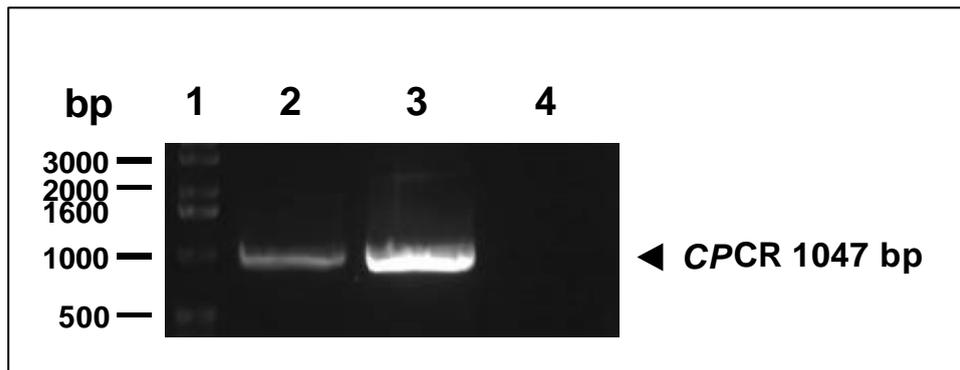
---

**Abbildung 25**

**Verwendetes Primerpaar zur Amplifizierung des *CPCR*-Gens**

Das Primerpaar pUC18MBCPCR + pUC18MBACPCR wurde unter Berücksichtigung des degenerierten, genetischen Codes ausgewählt und zur Amplifizierung der *CPCR* verwendet. Es diente zur Amplifikation eines PCR-Produkts aus dem Hilfsvektor pUC18. Die Primer wurden jeweils in einer Konzentration von 100 pmol/μL eingesetzt.

Durch Variation der PCR - Bedingungen wie Konzentrationen der genomischen DNA, der dNTP's [Saiki *et al.*, 1985], der Polymerase, der Zyklendauer konnte die optimale Amplifikationsreaktion für die *CPCR* entwickelt werden. Die Optimierung der PCR führte zu folgender Pufferzusammensetzung und Variablen: 750 ng gDNA als Matrix, eine Primerkonzentration von 100 pmol, 0,2 mM dNTP's, 3 U Polymerase (Vent/Biolabs) und 10 % (v/v) DMSO pro PCR-Ansatz. Für das Anlagern der Primer („*Annealing*“) in der PCR wurden Temperaturen zwischen 46 - 60 °C gewählt. Mit Hilfe des Primerpaars pUC18MBCPCR + pUC18MBACPCR konnte ein ca. 1 Kb großes Fragment amplifiziert werden und dieses PCR-Produkt wurde in den Vektor pUC18 kloniert. In Abbildung 26 ist die Auftrennung von Amplifikationsprodukten solcher PCR's in einem 0,8 % Agarosegel dargestellt.



**Abbildung 26**

**0,8 % iges Agarosegel zur Analyse der korrekten Amplifikation des CPCR-Gens**

Bahn 1: 1 Kb-Marker; Bahn 2: PCR mit 48 °C Annealing, Bahn 3: PCR mit 52 °C Annealing, Bahn 4: PCR mit 56 °C Annealing.

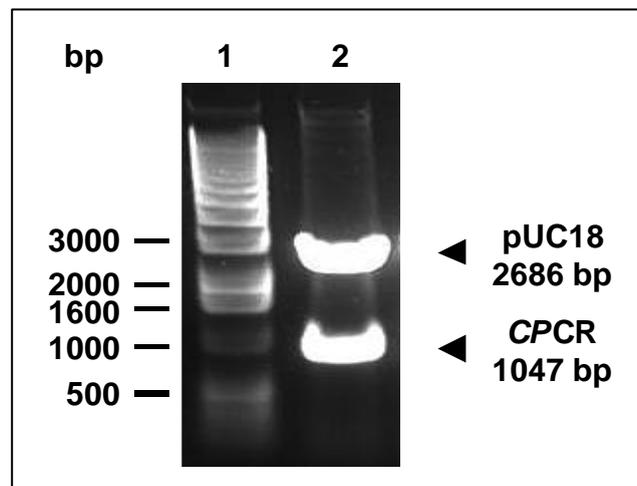
In Bahn 2 ist eine schwache Amplifikation zu beobachten, wohingegen der in Bahn 3 aufgetragene Ansatz eine deutliche Amplifikation zeigt. Die Reaktion mit einer Anlagerungstemperatur von 56 °C (Bahn 4) führte zu keiner darstellbaren Amplifikation. Deutlich sind die für die CPCR spezifischen Banden im Bereich von 1 kb zu erkennen. Die Banden entsprechen einem Fragment von 1047 Basenpaaren. Die Größe des amplifizierten Genfragments entspricht der erwarteten Größe des Gens für die Carbonylreduktase von ca. 40 kDa.

Das entsprechende PCR-Fragment aus Bahn 3 wurde aus dem Agarosegel eluiert und mit Hilfe des SureClone Kits „blunt-ended“, in den pUC18 Vektor kloniert. Den pUC18-Vektor zeichnen folgende Eigenschaften aus. Der Vektor enthält ein regulierbares Promotor/Operator Element, welches neben dem Promotor aus einer „lacZ“ genannten lac Operon Sequenz besteht, die das Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase komplementiert. Darüber hinaus verfügt der Vektor zum einen über das Gen der  $\beta$ -Lactamase. Dieses Gen verleiht dem plasmidtragenden Stamm eine Ampicillinresistenz. Zum anderen enthält er eine „multiple cloning site“, die das Einklonieren von Fremd-DNA, z.B. des CPCR-Gens, ermöglicht und den Replikationsursprung „ori“ (pMB1) des pBR322 Plasmids [Sutcliffe, 1979].

Der Erfolg der „blunt-end“-Klonierung des CPCR-Genfragments in den pUC18 Vektor wurde durch eine Restriktionsanalyse überprüft. In Abbildung 27 ist das Ergebnis eines pUC18recCPCR-Klons Restriktionsenzymen Eco RI und Xba 1 dargestellt.

---

Man kann in Abbildung 26 eindeutig ein DNA-Fragment der Größe von 2686 bp und ein DNA-Fragment der Größe 1047 bp erkennen.



---

**Abbildung 27**

**0,8 % iges Agarosegel zur Auftrennung der Restriktionsanalyse eines das *CPCR*-Gen enthaltenen pUC18 Klons**

Bahn 1: 1 Kb-Leiter; Bahn 2: 1 µg Restriktionsanalyse eines pUC18 Klons mit *Eco* RI und *Xba* I, 2 h bei 37 °C.

Die Restriktionsenzymen *Eco* RI und *Xba* I schneiden das Plasmid in der „*multiplen cloning Site*“. Das erhaltene Gen-Fragment von ca. 1047 Basenpaaren entspricht dem *CPCR*-Gen. Der pUC18 Vektor ist in dem gezeigten Gel durch das Fragment in der Größe von 2686 bp dargestellt [Sutcliffe, 1979]. Einige der durch die Restriktionsanalyse positiv rekombinant ermittelten Klone wurden exemplarisch sequenziert (Sequi Serve/Vaterstetten), um die komplette *CPCR*-DNA-Sequenz wie auch daraus folgend die Proteinsequenz des Enzyms zu erhalten.

In Abbildung 28 ist die ermittelte *CPCR*-Sequenz dieser Klone gezeigt. Die Sequenz der ADH 1 aus *Candida albicans* ist ebenfalls in Abbildung 28 dargestellt. In den ebenfalls gezeigten Proteinsequenzen sind die bereits durch die Sequenzanalyse der *CPCR* ermittelten Daten (↵3.10) rot markiert. Zusätzlich sind in der AS-Sequenz der ADH 1 aus *C. albicans* homologe Sequenzen blau dargestellt.

Aus den in Abbildung 28 gezeigten Sequenzen geht hervor, dass die Gensequenz der *CPCR* mit den aus der Proteinsequenzanalyse ermittelten Daten übereinstimmt. Dies bedeutet, dass die bereits bestimmten Genfragmente eindeutig erneut identifiziert werden konnten. Darüber hinaus liegt es nahe, dass bei den fehlenden Abschnitte ebenso eine Übereinstimmung vorliegt, d.h. die verwendeten

Polymerasen keine Mutationen in die Gensequenz der *CPCR* während der Polymerasenkettreaktion einbauten. Die DNA-Sequenz der *CPCR* umfaßt mit dem Startcodon Methionin 349 Aminosäuren bzw. 1047 Basenpaare. Daraus ergibt sich rechnerisch für das *CPCR*-Monomer ein Molekulargewicht von 39,5 kDa und für das Homodimer ein Molekulargewicht von 79 kDa. Diese Werte entsprechen den bereits in dieser Arbeit dargestellten, neuen proteinchemischen Daten der wt*CPCR*.

In der folgenden Tabelle 14 ist die Anzahl der einzelnen Aminosäuren aufgelistet, die aus der Sequenz berechnet wurden.

**Tabelle 14:** Aminosäurezusammensetzung der *CPCR*

Aminosäurerest	Anzahl	Angaben in [%]
Alanin (A)	34	9,74
Cystein (C)	8	2,29
Asparaginsäure (D)	17	4,87
Glutaminsäure (E)	24	6,87
Phenylalanin (F)	8	2,29
Glycin (G)	42	12,0
Histidin (H)	5	1,43
Isoleucin (I)	21	6,02
Lysin (K)	33	9,45
Leucin (L)	26	7,45
Methionin (M)	4	1,11
Asparagin (N)	12	3,43
Prolin (P)	16	4,58
Glutamin (Q)	10	2,86
Arginin (R)	6	1,72
Serin (S)	17	4,87
Threonin (T)	12	3,43
Valin (V)	36	10,3
Tryptophan (W)	5	1,43
Tyrosin (Y)	13	3,72

Aus der Tabelle 14 geht hervor, dass die *CPCR* zu 52,4 % aus Aminosäuren besteht, die eine reine Kohlenwasserstoff-Seitenkette tragen und dadurch mit Ausnahme von Glycin hydrophobe Bindungen ausbilden können und zusammen mit den aroma-

---

tischen Aminosäuren (8 %) die Hydrophobizität des Enzyms bedingen. Die kurzkettigen, hydrophoben Aminosäuren Alanin und Glycin ergeben zusammen bereits 21,7 % der Gesamtsequenz. Des Weiteren besteht der Biokatalysator zu einem Anteil aus 17,1 % an Aminosäuren, die nichtionisierte, aber polar wirkende Gruppen in der Seitenkette, besitzen. Dies gilt für Methionin, Tyrosin, Tryptophan, Serin, Threonin und Cystein. Die polar wirkenden Gruppen der Seitenketten beteiligen sich an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen verschiedenen Teilen der Peptidkette und stabilisieren auf diese Weise die *CPCR*. Saure und basische Aminosäuren gleichen sich bei jeweils ca. 12 % nahezu aus und geben dem Protein insgesamt eine eher neutrale Ladung, was dem Ergebnis der pI-Bestimmung von 6.8 entspricht. Mit einer Länge von 349 Aminosäuren und der hohen Homologie zu anderen ADH's kann die *CPCR* in die Gruppe der *medium chain* Dehydrogenasen eingeordnet werden, die im Allgemeinen zinkabhängig sind. Die Eigenschaften dieser Klasse von Dehydrogenasen werden aus den Beobachtungen, die für die am intensivsten untersuchte ADH, der Pferdeleber-ADH (HL-ADH), definiert [Jörnval et al., 1987; Persson et al., 1994].

Die HLADH wurde in vielen präparativen Anwendungen eingesetzt, und reduziert aliphatische und cyclische Ketone zu den entsprechenden (S)-Alkoholen [Davies & Jones, 1979; Dodds & Jones, 1988; Nakazaki et al., 1992]. Die Homologie der Bindungsmotiven der *CPCR* mit der HL-ADH, insbesondere die Übereinstimmung in den Motiven, die bei der HL-ADH als verantwortlich für die Substratumsetzung gelten, unterstützen erneut die Annahme, dass die *CPCR* zu den *medium chain* Dehydrogenasen gehört. Charakteristisch für diesen Reaktionsmechanismus ist z.B. ein Motiv der Zinkbindungsstelle, welches als Aminosäurefolge GHEGAGVVVGMGDNVK in der *CPCR*-Sequenz enthalten ist. Darüber hinaus ist das konservierte Motiv GAGGGLG mit den essentiellen Aminosäurepositionen für die Cofaktorbindungsstelle bei der *CPCR* analog zu den *medium chain* Alkoholdehydrogenasen vorhanden. Analog zur Pferdeleber-ADH [Jörnval et al., 1987, Magonet et al., 1992] bilden bei der Carbonylreduktase das Cystein an Position 45 zusammen mit dem Histidin 68 das katalytische Zentrum und die Cysteinreste der Positionen 99, 102, 105 und 113 binden das strukturelle Zinkatom [Bränden et al., 1975]. In Abbildung 28 sind diese konservierten Aminosäurepositionen rot markiert.

---

Bei dem *Bi-Bi*-Mechanismus bindet NADH an der bei Nicotinamid-abhängigen Enzymen konservierten Bindungsdomäne [Rossmann et al., 1975]. Im Falle der *CPCR* wird die Carbonylverbindung als zweites Substrat über das Sauerstoffatom am katalytischen Zink koordiniert. Die weiteren Liganden des Metallkations sind die zwei Thiolgruppen von Cystein an Position 45 bzw. Position 176 und ein Imidazolstickstoff des Histidins an Position 68. Das Zinkatom polarisiert die Carbonylgruppe, so dass das C-4 Wasserstoffatom des Nicotinamidringes als Hydrid zu dem sich in einer sterisch günstigen Lage angeordneten Carbonylkohlenstoffatom transferiert werden kann. Abbildung 28 zeigt eindeutig, dass alle wichtigen Aminosäuren analog zur HL-ADH sowohl für die *recCPCR* wie auch für die ADH 1 aus *C. albicans* gefunden werden. Dabei zeigt sich eine 100 % Übereinstimmung in den Aminosäuren, die verantwortlich sind für z.B. die Zinkbindungsstelle, für das Motiv der Cofaktorbindungsstelle wie auch für das katalytische Zentrum. Darüber hinaus kann auch eine Übereinstimmung in der Positionierung der Cysteine aufgezeigt werden, was die Annahme bestätigt, dass die *CPCR* analog zur ADH 1 bzw. HL-ADH 1 keine Disulfidbrücken enthält. Dies unterstützen ebenfalls Versuche zur Aufklärung der *CPCR*-Struktur, die durch gezieltes „Modelling“ am Institut für Biochemie der RWTH-Aachen von Hr. Prof. J. Grötzinger durchgeführt worden sind, die zeigte, dass alle in der HL-ADH-Sequenz konservierten Cysteine ebenfalls in der *CPCR*-Sequenz zu bestimmen waren. Aufgrund der Raumstruktur der HL-ADH wäre bei Übertragung der Daten auf eine hypothetische zur Pferdeleber-ADH analoge *CPCR*-Struktur die Ausbildung von Disulfiden nicht möglich [Anhang].

Die bereits bei der Bestimmung des N-Terminus der *wtCPCR* gefundene Homologie zu der intrazellulären ADH 1 aus *Candida albicans* bestätigte sich ebenfalls bei der Identifizierung der *CPCR*-Proteinsequenz. Die Proteinsequenz der *CPCR* ist zu 84, 5 % homolog zu der aus 350 Aminosäuren bestehende ADH 1 aus *C. albicans*, die von 1050 Basenpaaren kodiert wird [Bertram et al., 1996; Shen et al., 1991]. Die ADH 1 aus *Candida albicans* ist ein typisches Antigen dieser opportunistischen, pathogenen Hefe [Shen et al., 1991]. Für die ADH 1 aus *Candida albicans* wurden folgende Charakteristika beschrieben: Das Gen dieser ca. 80 kDa großen Alkoholdehydrogenase enthält keine Introns. Das Enzym ist ein Homodimer, welches nachweislich keine Disulfidbrücken enthält und nicht glykosyliert ist. Die ADH 1 zeigt ebenso wie die *CPCR* ähnliche Proteinsequenzübereinstimmungen von 84 % zur ADH 1, ADH 2 und ADH 3 aus *Saccharomyces cerevisiae* wie auch zu KLADH's aus *Klyveromyces*

---

*lactis*. Zu den ADH's aus *Schizosaccharomyces pombe* wurden geringere Übereinstimmungen von ca. 70,5 % gefunden [Bertram et al., 1996]. Die zur *CPCR* homologe ADH 1 aus *C. albicans* zeigt im Vergleich mit anderen ADH 1 aus anderen *C. albicans* Stämmen [ATCC 10261, Smith et al., 1992 und B311: Clonotech Laboratories] zwei Unterschiede in der Aminosäuresequenz. Die Position 140, Threonin, ist gegen Alanin und die Position 227 Alanin gegen Asparagin ausgetauscht. Allerdings führen diese AS-Austausche zu keiner signifikanten Veränderung des Enzyms. Dadurch erhält das Enzym eine noch größere Ähnlichkeit in der AS-Sequenz zur ADH 1 aus *Saccharomyces cerevisiae* [Shen et al., 1991]. Anhand der Abbildung 28 kann man erkennen, dass die *CPCR* ebenfalls über diese Austausche verfügt. Des Weiteren wurde beobachtet, dass bei Proteinen aus *Candida albicans* auf Translationsebene für das Triplet CTG statt eines Leucin ein Serin eingebaut werden kann [Suzuki et al., 1993; Santos et al., 1993]. Diese Abweichung vom universellen genetischen Code bzw. diese nicht standardisierten Translationsereignisse können zur Veränderung der Enzymeigenschaften bzw. zur Verschiebung des Leserasters führen. Ein entsprechendes Triplet wurde in der ermittelten Sequenz der *recCPCR* nicht gefunden.

Die *wtCPCR* zeigt eine 80 % Homologie zu Alkoholdehydrogenasen aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Klyveromyces marxianus/lactis* wie auch eine 70 % Übereinstimmung zu *Schizosaccharomyces pombe* [Anhang]. Diese Alkoholdehydrogenasen kommen in der eukaryotischen Zelle häufig in zahlreichen Isoformen vor. *Saccharomyces cerevisiae* verfügt z.B. über drei verschiedene, *Klyveromyces lactis* über vier verschiedene Gruppen von ADH 1-Isoenzyme. Man unterscheidet hierbei die mitochondriale und die cytoplasmatische Gruppe von ADH 1's. Die mitochondrialen Isoenzyme zeichnen sich durch ein ca. 27 AS langes Signalpeptid aus, das für den Export der Enzyme aus dem Cytoplasma in die mitochondriale Matrix zuständig ist. Dieses „*Matrix Targeting Signal*“ (MTS) wird in der mitochondriale Matrix von der sogenannten „*Matrix Processing Peptidase*“ (MPP) abgespalten. Die MPP (EC 3.4.24.64) wurde 1980 erstmals erwähnt als Bestandteil des mitochondrialen Targetingapparates [Böhni et al., 1980] und wurde einige Jahre später charakterisiert und aufgereinigt [Hawlitschek et al., 1988]. Die MPP ist ein lösliches Heterodimer und ist bis auf die Ausnahme von Pflanzen immer in der mitochondrialen Matrix lokalisiert [Braun et al., 1992; Geli, 1993]. Aufgrund ihres Vorhandenseins in der mitochondrialen Matrix setzte sich Anfang der 90er Jahre der Name

„Mitochondrial Processing Peptidase“ anstelle „Matrix Processing Peptidase“ durch [Emmermann et al., 1993]. Im Gegensatz zu den homologen Enzymen aus z.B. *Saccharomyces cerevisiae* [Yang et al., 1988] verfügt die ADH 1 aus *C. albicans* nicht über eine solche N-terminale mitochondriale Zielsequenz (MTS) [Bertram et al., 1996]. Dementsprechend ist die ADH 1 aus *C. albicans* aufgrund der fehlenden Signalsequenz im Cytoplasma und nicht in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Die hohe Homologie zwischen der *CPCR* und der ADH 1 führte zu der Frage, ob die Oxidoreduktase ebenfalls nicht über ein MTS verfügt und somit analog zur ADH 1 aus *C. albicans* ebenfalls im Cytoplasma lokalisiert oder entgegen dieser Annahmen doch in der mitochondrialen Matrix zu finden ist.

Die N-terminale Proteinsequenz der *CPCR* beginnt anstelle eines Methionin mit einem Prolin. Um eine Expression des *CPCR*-Gens zu erhalten, wurde aufgrund der Homologie zur Sequenz der ADH 1 aus *C. albicans*, welche ebenfalls mit einem Methionin als Startcodon beginnt, dieses AS-Triplett in die DNA- und Proteinsequenz der *CPCR* eingeführt. So wurde das *CPCR*-Gen mit einem potentiellen Startcodon, welches für die Transkription essentiell ist, ausgestattet. Abbildung 29 stellt einen Sequenz-Vergleich zwischen der *CPCR*, der ADH 1 aus *C. albicans* und anderen homologen Alkoholdehydrogenasen der cytoplasmatischen bzw. mitochondrialen Gruppe ADH 1 dar.

N-Terminus / cytoplasmatische ADH 1		C-Terminus / cytoplasmatische ADH 1	
<i>CPCR</i>	PEIPKTQKA	MEEGKILGRYVLDTQK	
<i>CaADH1</i>	MSEQIPKTQKA	MEEGKILGRYVLDTSK	
<i>ScADH1</i>	MSIPETQKA	MEKGQIVGRYVVDTSK	
<i>ScADH2</i>	MSIPETQKA	MEKGQIAGRYVVDTSK	
N-Terminus / mitochondriale ADH 1			
<i>CPCR</i>		PEIPKTQKA	
<i>ScADH3</i>	MLRTSTLFTRRVQPSLFSRNILRLQST	-AAIPKTQKG	
<i>KIADH3</i>	MLRLTSARSIVSPLRKGAFGSIRTLA	-TSVPETQKG	
<i>KIADH4</i>	MFRLARAQTALANKASVSRSFRLNNS	-FAIPETQKG	
C-Terminus / mitochondriale ADH 1			
<i>CPCR</i>	MEEGKILGRYVLDTQK		
<i>ScADH3</i>	MEKGKILGRYVVDTSK		
<i>KIADH3</i>	MEQGKILGRYVVDTSN		
<i>KIADH4</i>	MEQGKILGRFVVDTYK		

Abbildung 29

---

### Sequenz-Alignment zwischen der *CPCR* und cytoplasmatischen bzw. mitochondrialen ADH 1

█ kennzeichnet alle Aminosäuren, die homolog zu der Proteinsequenz der *CPCR* sind; █: markiert die N-terminale Zielsequenz (MTS) der mitochondrialen ADH 1 Gruppe.; *Ca*: *Candida albicans*; *Kl*: *Kluyveromyces lactis*, *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*; █: kennzeichnet die letzte hypothetisch angenommene AS des C-Terminus.

Der Sequenzanfang mit Prolin könnte bedeuten, dass es sich um eine am N-Terminus entweder spezifisch oder unspezifisch prozessierte Form des Biokatalysators handelt. Die dargestellten Sequenzvergleiche mit mitochondrialen Gruppe ADH 1 unterstützen diese Annahme, wenn man davon ausgeht, dass bei der *CPCR* nur deshalb kein Methionin als Startcodon identifiziert wurde, da sie über eine MTS verfügt, welche von der MPP abgespalten worden ist. Das N-terminale Prolin befindet sich genau an der Position des Startcodons Methionin der meisten cytoplasmatischen ADHs. Dementsprechend könnte es sich um die reife Form einer mitochondrialen Gruppe ADH 1 handeln. Andererseits konnte man ebenfalls durch die hohe Homologie zur ADH 1 aus *C. albicans* darauf schließen, dass es sich um eine cytoplasmatische Alkoholdehydrogenase der Gruppe ADH 1 handelt. Das Abspalten des Startcodons bei eukaryotischen Proteinen ist dazu kein unbekanntes Phänomen [Wilcox & Studnicka, 1988]. Darüber hinaus enthält die ADH 1 aus *Candida albicans* weder Introns noch Disulfidbrücken, ist nicht glykosyliert, ist ein Homodimer und ist in ihrem postulierten Leserahmen von 1050 Basenpaaren vollständig funktionell und wird den *medium chain* Dehydrogenasen zugerechnet [Bertram et al., 1996]. Darüber hinaus konnte im Gegensatz zu den Alkoholdehydrogenasen keine Existenz verschiedener ADH-Isoenzymen für die ADH 1 in *C.albicans* nachgewiesen werden [Bertram et al., 1996]. Aufgrund der hohen Homologie und der Übereinstimmung der bereits aufgestellten Proteindaten der *wtCPCR*, wurde angenommen, dass diese Ergebnisse auch für die Funktionalität und für die Eigenschaften der *CPCR* zutrafen.

### 3.15 Voraussetzungen für die rekombinante Expression von Genen

Das oberste Ziel einer Genklonierung für biotechnologische Anwendungen ist die Expression des klonierten Gens in einem ausgewählten Wirtsorganismus, so dass das Zielprotein für den kommerziellen Einsatz in ausreichend großen Mengen pro-

---

duziert wird. Verschiedene molekularbiologische Eigenschaften werden zur Regulierung der Genexpression eingesetzt.

1. Die Beschaffenheit der erforderlichen Promotor- und Terminatorsequenzen für die Transkription.
2. Die Stärke der Ribosomenbindungsstelle zur Initiation der Translation.
3. Die Kopienzahl der klonierten Gene im Wirtsorganismus und ob ein Gen auf einem Plasmid oder ins Wirtsgenom integriert ist.
4. Die endgültige zelluläre Position des synthetisierten Fremdproteins.
5. Der Wirkungsgrad der Translation im Wirtsorganismus.
6. die intrinsische Stabilität des codierten Proteins in der Wirtszelle [Glick, 1987; Otha, 1993].

Darüber hinaus sind Überlegungen zu Glykolysierung oder Translokation bzw. zu Aufreinigungsmöglichkeiten des Fremdproteins einzubeziehen. Die Beschaffenheit der biologischen Systeme ist den Kultivierungsmöglichkeiten, wie z.B. der Hochzell-dichtefermentation (HZD-Fermentation), und den technischen Parametern eines industriellen Produktionsverfahren anzugleichen, da die primären Ziele hohe Produktausbeuten, Stabilitäten und Wirtschaftlichkeit sind.

Wie stark ein Fremdgen exprimiert wird, hängt auch von den Eigenarten des Wirtsorganismus ab. Obwohl viele prokaryotische und eukaryotische Organismen fremde Gene exprimieren können, verwendet man für die meisten kommerziell wichtigen, gentechnisch hergestellten Proteine, zur Zeit *Escherichia coli*. Die Verwendung wird bevorzugt, da durch umfangreichen Forschungsarbeiten die Genetik, Molekularbiologie, Biochemie und Physiologie für diesen Organismus detailliert bekannt sind. Ein weiterer Grund ist, dass man diese Gram-negativen Bakterien im Gegensatz zu anderen Mikroorganismen mit einfachen Medien im großen Maßstab produzieren kann. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass man mit *E.coli* viele Proteine schnell und kostengünstig exprimieren kann. Als alternative Wirtssysteme werden *Bacillus subtilis*, heterologe Genexpression in Eukaryonten wie verschiedenen Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* oder *Pichia pastoris*) oder auch Tier-, Pflanzen-, und Insektenzellen verwendet [Wilcox & Studnicka, 1988]. In Tabelle 15 (folgende Seite) sind die besonderen Merkmale verschiedener Wirtstypen vergleichend dargestellt.

Die Expression eines Fremdproteins kann zum einen durch plasmidkodierte Systeme, zum anderen durch chromosomale Integration ins Wirtsgenom erreicht wer-

den. Letzteres gewährleistet eine größere Segregationsstabilität und bedarf keiner Selektionsmarker. Plasmidvektoren ermöglichen hingegen höhere Produktausbeuten. Für die rekombinante Produktion eines Proteins muß das klonierte Gen richtig transkribiert und die mRNA translatiert werden. Plasmide für die Expression rekombinanter Proteine besitzen dafür eine Promotor-Region, damit die Transkription des Gens am richtigen Nukleotid effizient initiiert wird. Eine Terminatorsequenz dient dem Transkriptionsstopp am Ende der Gensequenz.

**Tabelle 15:** Eignung verschiedener Organismen zur Expression von Fremdprotein

Eigenschaften Wirtsorganismus	<i>E.coli</i>	Hefen	Tierische Zellen
Expressionsraten	++	+	+
Zellvermehrung	++	++	+
Medienkosten	++	++	-
Proteinfaltung	+	++	++
Sezernierung	+	++	++
Glykosylierung	-	+	++
HZD-Technologie	++	+++	+

++ drückt sehr günstige, - ungünstige Merkmale aus [Habermann, 1994].

Expressionsplasmide enthalten zusätzlich meist mindestens einen Selektionsmarker. Ein *origin of Replication* (ori), gewährleistet, dass ein Plasmid unabhängig vom Bakterienchromosom vervielfältigt wird [Dale, 1994]. Zahlreiche Systeme besitzen zusätzliche DNA-Sequenzen, die z.B. Probleme wie mRNA - oder Plasmidstabilität, vorzeitige Transkriptionstermination oder eine ineffektive Translationsinitiation verringern sollen [Balbas & Bolivar, 1990].

### 3.16 Klonierung und Expression der recCPCR

Für Expression des recCPCR-Gens in *E.coli* wurde das Gen in drei verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Dies waren pBTac2, pKK-223-3 und pET15B, die folgende Strukturelemente enthalten.

1. Ein regulierbares Promotorelement, der zur Expression des Zielgens mit IPTG ( $\beta$ -D-Isopropylthiogalaktosid) induziert wird.

2. Die *lacZ* Ribosomenbindungsstelle auf die ein ATG-Startcodon folgt.
3. Eine „*multiple cloning site*“, die eine Insertion von Fremd-DNA in das *lacZ*-Gen des Vektors ermöglicht. Dadurch wird das *lacZ*-Gen inaktiviert und eine Blau-Weiß-Selektion rekombinanter Klone ist möglich.
4. Einen starken Transkriptionsterminator, wie z.B. *rrnB* (pKK-223-3 bzw. EcoRGNB (pBTac2), am Ende der „*multiple cloning site*“.
5. Einen Replikationsursprung (*ori*) und das  $\beta$ -Lactamasegen. Dieses Gen ermöglicht eine Selektion rekombinanter Bakterienklone über die Ampicillinresistenz [Sutcliffe, 1979].

Damit das *recCPCR*-Gen in der richtigen Orientierung in einen Expressionsvektor kloniert werden konnte, wurden entsprechende Restriktionsschnittstellen an beiden Enden des Gens eingeführt. Neben der gewünschten Orientierung des Gens konnte dadurch ein geeigneter Abstand des Startcodons Methionin (ATG) zum Promotor und somit auch zur Ribosomenbindungsstelle auf dem Plasmid eingehalten werden. Die verwendeten Expressionsvektoren pBTac2, und pKK223-3 tragen jeweils eine *Eco* RI Schnittstelle vor dem *lacZ*-Gen; der pET15B Vektor eine *Nde* I Schnittstelle. An das 3' Ende des Gens wurde für die beiden erstgenannten Vektoren eine *Pst* I -, für den pET-15B Vektor eine *Xho* I Schnittstelle sowie für alle ein Stopcodon TAA eingeführt. In Abbildung 30 ist die Restriktionskarte des *recCPCR*-Gens ausschnittsweise dargestellt. Mit Hilfe dieser Karte ist ersichtlich, welche Restriktionsenzyme generell bei einer Klonierung der *CPCR* nicht verwendet werden können, da sie Schnittstellen im Gen verursachen und dieses fragmentieren.

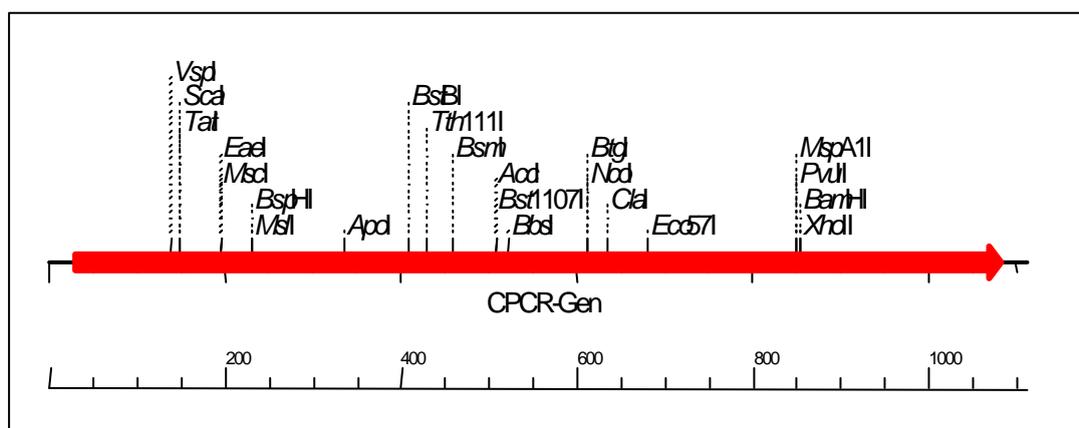


Abbildung 30

Ausschnitt der schematische Restriktionskarte des *CPCR*-Gens aus *Candida parapsilosis*

---

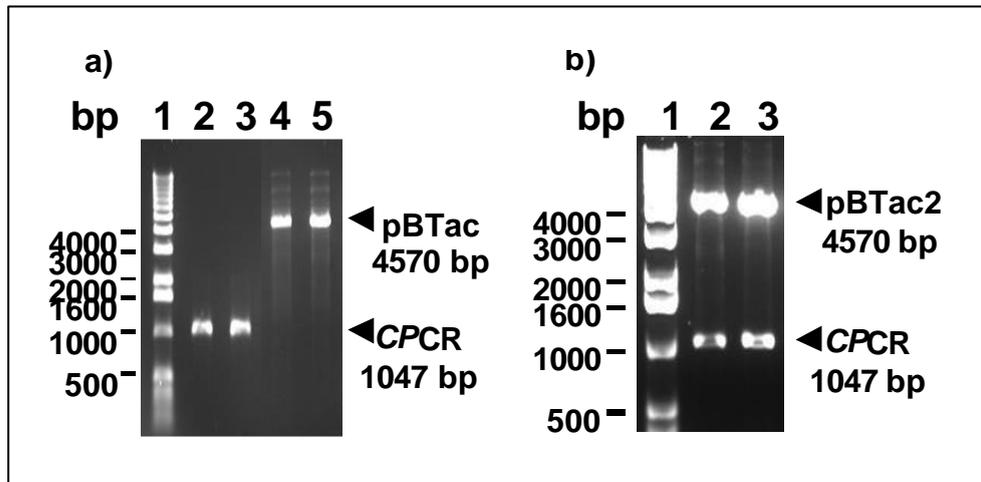
■: markiert das *CPCR*-Gen. Die entsprechenden Restriktionsstellen sind entlang des *CPCR*-Gens angefügt. Die Zahlen entsprechen der Anzahl der Basenpaare im *CPCR*-Gen.

Zur Klonierung der *recCPCR* ist neben dem Einfügen von Schnittstellen eine fehlerfreie Amplifizierung der PCR-Produkte notwendig. Das Auftreten zufälliger Mutationen im Verlauf der Amplifizierung kann zu einer inaktiven *recCPCR* führen. Da für die vorhergegangenen Amplifizierungen u.a. eine Taq-Polymerase verwendet worden ist, die keine „*Proofreading*“-Aktivität besitzt [Flaman *et al.*, 1994], konnte das Auftreten von Mutationen nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden für die Amplifikation der PCR-Produkte für die Klonierung in die Expressionsvektoren, nur die thermostabilen Polymerasen „Vent“ oder „Pfu“ verwendet [Lundberg *et al.*, 1991]. Diese Polymerasen verfügen über eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, die fehlerhaft eingebaute Nukleotide ersetzt und besitzen so eine 10-fach höhere Genauigkeit beim Einbau von Nukleotiden als die „Taq-Polymerase [Nielson *et al.*, 1995; Cline, 1996]. Eine Zwischenklonierung des *recCPCR*-Gens in den pUC18 [Vieira & Messing, 1992] ermöglicht eine hohe Amplifizierung des Gens in den *E.coli*-Zellen, da diese Klonierungsvektoren im Gegensatz zu den Expressionsvektoren sogenannte „*high copy*“ Plasmide sind. Darüber hinaus lassen sich klonierte Fragmente aus solchen Vektoren besser herausschneiden.

Die mit „*proof-reading*“-Polymerasen amplifizierten *CPCR*-Fragmente und die jeweiligen Expressionsvektoren wurden nach einer Restriktionsanalyse ligiert und in kompetente, bakterielle Expressionsstämme transformiert.

In Abbildung 31 a) ist ein Agarosegel dargestellt, in dem jeweils für sich das geschnittene *CPCR*-PCR-Produkt und der Expressionsvektor pBTac2 nach Inkubation mit *Eco* RI und *Pst* I aufgetrennt wurden. Abbildung 31 b) zeigt ein Agarosegel, in dem Plasmide, die aus transformierten Bakterien isoliert wurden dargestellt werden. Die Plasmide wurden, wie in diesem exemplarischen Ansatz, zur Kontrolle der erfolgreichen Ligation ebenfalls mit den Restriktionsenzymen verdaut und anschließend in Agarosegelen aufgetrennt. Positive Klone konnten dadurch so wie die in Abbildung 31 b) gezeigten Plasmide, isoliert werden. Abschließend wurde die in der Restriktionsanalyse positiv getesteten Klone vor der weiteren Verwendung sequenziert um die Vollständigkeit und Richtigkeit des *CPCR*-Gens auf molekularer Ebene zu bestätigen und Fehler wie Punktmutationen etc. auszuschließen. Die als positive Klone identifizierten Plasmide wurden nach ihrer Transformation in verschiedene *E.coli*-Wirtstämme sowohl im 5 mL wie auch im 100 mL Maßstab angezogen. Zellfreie Rohextrakte dieser Stämme wurden auf spezifische Aktivität der rekomb-

binant exprimierten *CPCR* untersucht. Entscheidende Ergebnisse sind in Tabelle 16 (siehe nächste Tabelle) exemplarisch zusammengefaßt.



**Abbildung 31**

**a) Restriktion eines *CPCR*-Genprodukts aus einer PCR und eines Expressionsvektors**

Bahn 1: Kb-Leiter; Bahn 2: mit *Eco* RI und *Pst* I restringiertes *CPCR*-Fragment, 2 h, 37 ° C; Bahn 3: mit *Eco* RI und *Pst* I restringiertes *CPCR*-Fragment, 2 h, 37 ° C; Bahn 4: mit *Eco* RI und *Pst* I restringierter pBTac-Vektor, 2 h, 37 ° C; Bahn 5: mit *Eco* RI und *Pst* I restringierter pBTac-Vektor, 2 h, 37 ° C.

**b) Restriktion eines *CPCR*-Genprodukts und eines Expressionsvektors nach erfolgreicher Ligaton und Klonierung**

Bahn 1: Kb-Leiter; Bahn 2: mit *Eco* RI und *Pst* I restringiertes pBTacrec*CPCR*-Konstrukt, 2 h, 37 ° C; Bahn 3: mit *Eco* RI und *Pst* I restringiertes pBTacrec *CPCR*-Konstrukt, 2 h, 37 ° C.

**Tabelle 16:** Spezifische rec*CPCR*-Aktivitäten in zellfreien Rohextrakten verschiedener Expressionssysteme und des Hilfsstamms *E.coli* XL1 *Blue*

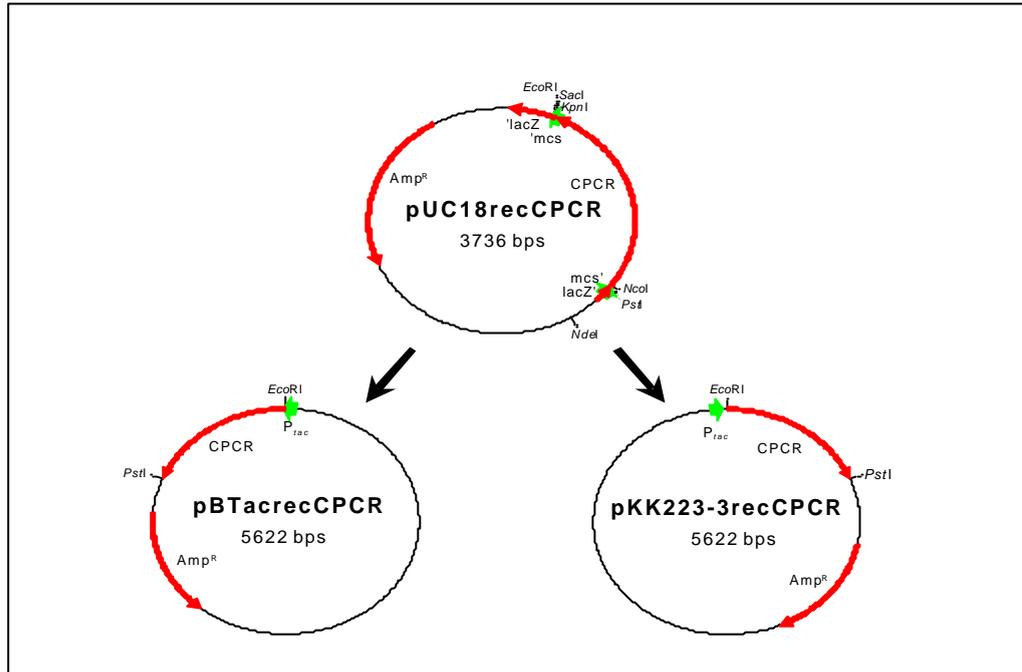
<i>E.coli</i> Wirtsstamm	pBTac-rec <i>CPCR</i> (U/mg)	pKK223-3-rec <i>CPCR</i> (U/mg)	pET15B-rec <i>CPCR</i> (U/mg)
XL 1 Blue	0,04	0,025	n.d.
JM 105	1,5	-	-
JM 109	-	-	-
HB 101	-	0,3	-
BL 21	-	-	-
AD 494	-	-	-

---

n.d.: nicht detektiert. Die Transformation der Expressionsvektoren in *E.coli* XL1Blue diente der Zwischenlagerung.

Aus den Ergebnisse in Tabelle 16 der 100 mL Schüttelkulturversuchen wird ersichtlich, dass das Konstrukt pBTacrecCPCR mit dem Expressionsstamm JM 105 und das Konstrukt pKK223-3recCPCR in dem Wirtstamm HB101 eine Expression der NADH-abhängigen Carbonylreduktase aus *C. parapsilosis* in aktiver Form zulässt. Dabei ist die gemessene Enzymaktivität der recCPCR mit dem pBTac-Plasmid / JM105 um ein 6 - 8 faches höher als im pKK223-3/HB101. Darüber hinaus zeigte ein Aktivitätsvergleich mit wtCPCR-Rohextrakt, dass der pBTacrecCPCR-Klon eine ca. 4,7 fache erhöhte spezifische Aktivität aufweist. Die spezifische Aktivität des pKK223-3recCPCR-Klons wies ungefähr die gleiche spezifische Aktivität von 0,3 U/mg wie das Wildtypenzym auf. Mit *E.coli* XL1 Blue konnte eine spezifische Aktivität der NADH-abhängigen Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* von 0,04 U/mg für das pBTac-System und von 0,025 U/mg für das pKK223-3 recCPCR-Konstrukt bestimmt werden, die aufgrund des niedrigen Wertes vernachlässigbar ist. In allen übrigen Transformationsansätze konnte keine CPCR-Aktivität nachgewiesen werden. In den löslichen Rohextrakten der Zellaufschlüsse der aktiven CPCR-Klone pBTac und pKK223-3 konnte weder Protease- noch NADH-Oxidase-Aktivitäten festgestellt werden. In Enzympräparaten sind diese Enzyme unerwünscht, da sie zum einen den Abbau des rekombinanten Proteins und zum anderen den vorzeitigen Umsatz des kostspieligen Cofaktors NADH verursachen. Zusätzlich konnte in den Sedimenten der aufgeschlossenen Zellen, in dem sich die lösliche recCPCR nicht befinden sollte, bei alleiniger Zugabe von NADH eine Umsetzung eine deutliche Extinktionsänderung beobachtet werden.

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse wurde das pBTac/JM 105 Wirtssystem für alle weiteren Untersuchungen der recCPCR verwendet. Die entstandenen Expressionsplasmide werden als pBTacrecCPCR, pKK223-3recCPCR und pETrecCPCR bezeichnet. Abbildung 32 zeigt einen Überblick über die Vektorkarten dieser aktiven Expressionsplasmide.



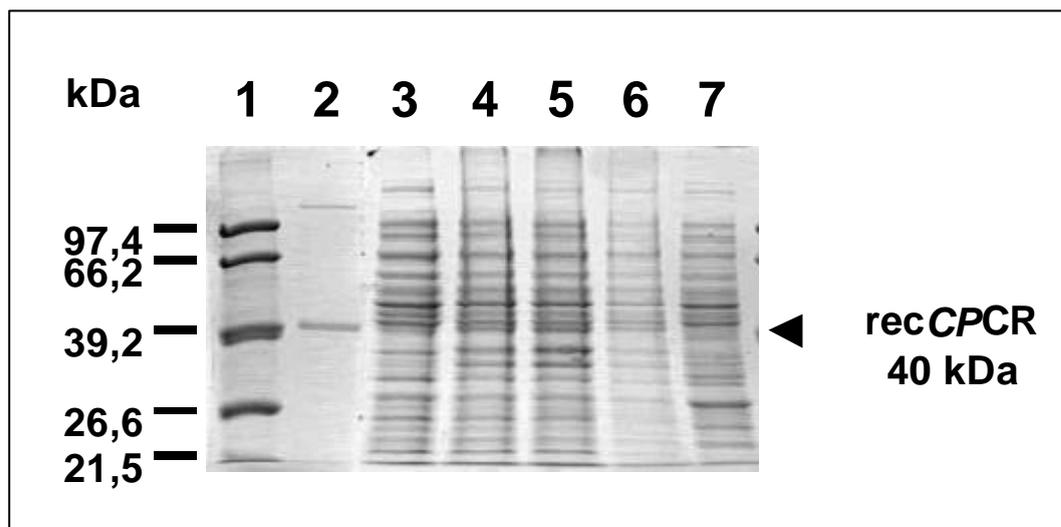
**Abbildung 32**  
**Vektorkarten der aktiven Expressionsplasmide**

Die jeweiligen Vektorkarten zeigen rot markiert die Integration des *CPCR*-Gens in den Plasmidvektor an den entsprechenden Schnittstellen. Darüber hinaus werden so die Selektionsmarkerregionen hervorgehoben. ■: alle Promotorlokalisationen auf dem Plasmid. Der pUC18-Vektor erhält durch die Integration des ca. 1047 Bp großen *recCPCR*-Gens eine Gesamtgröße von 3738 Bp, das pBTac-Plasmid von 5622 und der pKK223-3 Vektor ebenfalls von 5622 Basenpaaren.

In Abbildung 33 (nächste Seite) wird die Expression der *CPCR* von dem pBTacrec *CPCR*-Konstrukt im SDS-Gel dargestellt. Die jeweiligen Ansätze wurden mit verschiedenen Konzentrationen von IPTG induziert, um die optimale Induktorkonzentration zu bestimmen. Die Bakterienzellen wurden bei 37 °C und 180 UPM im 100 mL Schüttelkolben kultiviert. In Bahn 2 wurden 2 µg Protein, in Bahn 3 – 7 je 6 µg Protein aufgetragen.

In Abbildung 33 kann in dem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel die Expression der *recCPCR* in den Bahnen 4, 5, 6 gezeigt werden. Dabei wurde die stärkste Expression in den Bahnen 4 und 5 mit 1,2 und 1,5 U/mg detektiert. Die in diesen Bahnen aufgetragenen Proteinproben wurden während der Kultivierung mit jeweils 0,5 und 0,75 mM IPTG induziert. In Bahn 7 wurde eine Negativkontrolle aufgetragen, die den Expressionsvektor ohne *CPCR*-Insert darstellt und somit keine 40 kDa Bande aufwies. Bahn 2 zeigt die aufgereinigte *wtCPCR* als Vergleichskontrolle zur exprimierten

recCPCR. Bahn 3 zeigt einen positiven pBTacrecCPCR-Klon ohne Zugabe von IPTG. Man kann eine sehr schwache Bande auf der Höhe der erwarteten CPCR-Bande bzw. im Vergleich zu den induzierten Proben erkennen. Dies bedeutet, dass der Promotor bereits rekombinante CPCR produziert und vor der IPTG-Induktion nicht komplett ausgeschaltet ist. Dieses Verhalten wird gerade bei sehr starken Promotoren, wie es der *tac* Promotor ist, beobachtet [deBoer et al., 1983]. Die in Bahn 3 aufgetrennte Komtrollexpression ohne IPTG ergab trotz detektierbarer Proteinbande nur eine geringe CPCR-Aktivität von 0,02 U/mg im Rohextrakt, die der



**Abbildung 33**

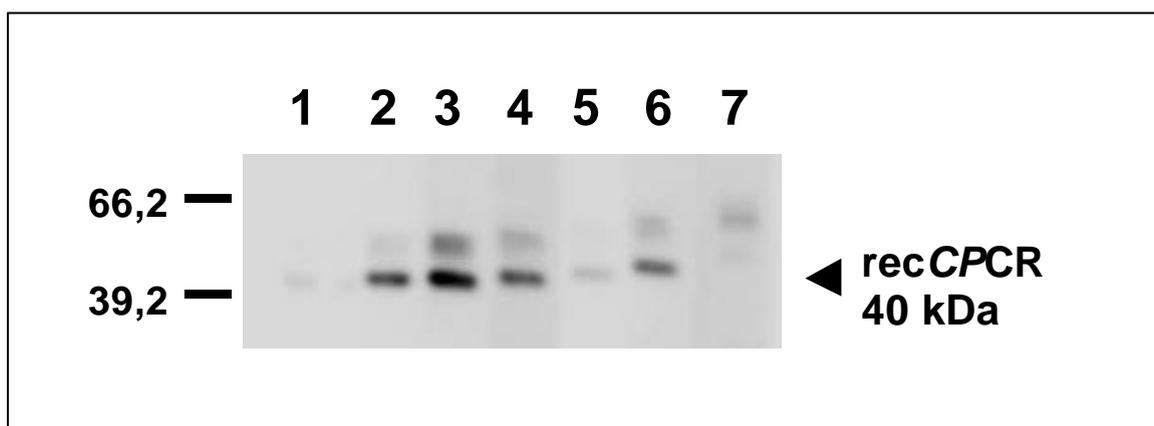
**Expression der recCPCR nach Induktion mit IPTG, dargestellt im Coomassie gefärbten SDS-Gel.**

Bahn 1: SDS-Proteinstandardmarker; Bahn 2: Positivkontrolle *w*CPCR; Bahn 3: pBTacrecCPCR-löslicher Rohextrakt, induziert mit 0 mM IPTG; Bahn 4: pBTacrecCPCR-löslicher Rohextrakt, induziert mit 0,5 mM IPTG; Bahn 5: pBTacrecCPCR-löslicher Rohextrakt, induziert mit 0,75 mM IPTG; Bahn 6: pBTacrecCPCR-löslicher Rohextrakt, induziert mit 1 mM IPTG; Bahn 7: Negativkontrolle, Leervektor pBTac2 ohne recCPCR-Insert. Die Proben wurden für die elektrophoretische Auftrennung 4 min bei 95 °C denaturiert und mit 3 %  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert.

Hintergrundaktivität in den *E.coli* Zellen ohne recCPCR entspricht. Daraus konnte geschlußfolgert werden, dass der *lac*-I-Repressor die Expression des CPCR-Gens im nicht induzierten Zustand fast vollständig unterdrückt. Dies ist insofern als Vorteil zu betrachten, dass die Expression des Fremdproteins in aller erster Linie eine Belastung des Zellstoffwechsels mit sich bringt und eine konstitutive Expression Zellen, die sich in der *lag*-Phase befinden, im Wachstum hemmen würde. Dies könn-

te zu einem erheblichen Aktivitätsverlust wie auch zu einer geringerer Zellausbeute führen.

In Abbildung 34 wird der Immunoblot zu dem in Abbildung 33 gezeigten Versuch zur Bestimmung der optimalen IPTG-Induktorkonzentration dargestellt. Lösliche, die *recCPCR* enthaltene Rohextrakte wurden zum spezifischen Nachweis der exprimierten Carbonylreduktase mit dem gegen die Epitope der *CPCR* gerichteten Antikörperserum *AKCPCR1* inkubiert. In Bahn 1 wurde eine Kontrollprobe des pBTac *recCPCR*-Klons aufgetragen, der nicht mit IPTG induziert wurde. Neben der Positivkontrolle der *wtCPCR* in Bahn 5 wurden Vergleichsproben des pKK223-3*recCPCR*-Klon, der die *recCPCR* ebenfalls schwach aktiv exprimiert, in den Bahnen 6 und 7 aufgetragen. Bahn 7 stellt eine Induktionskontrolle für das pKK223-3*recCPCR*-Konstrukt dar. Bei dieser Probe wurde ebenfalls kein Induktor hinzugegeben. Es wurden gleiche Proteinmengen als Antigene verwendet. Die Antikörpersignale wurden mit Hilfe des ECL-Systems aufgenommen.



**Abbildung 34**

**Immunoblot der exprimierten *recCPCR***

Bahn 1: pBTac/JM105 mit *recCPCR*-Insert, keine IPTG-Zugabe; Bahn 2: pBTac*recCPCR*JM105, induziert mit 0,5 mM IPTG; Bahn 3: pBTac*recCPCR*JM105, induziert mit 0,75 mM IPTG; Bahn 4: pBTac*recCPCR*JM105, induziert mit 1 mM IPTG; Bahn 5: *wtCPCR*, löslicher Rohextrakt; Bahn 6: pKK223-3*recCPCR* in HB101, induziert mit 1 mM IPTG; Bahn 7: pKK223-3 mit *recCPCR*-Insert, keine IPTG-Zugabe.

In Abbildung 34 kann man in den Bahnen 2, 3 und 4 die *recCPCR* mit Hilfe des spezifischen Antikörpers *AKCPCR1* detektieren. Bahn 2 und 4 zeigen mit gleichen Expressionsraten von 1,2 U/mg ein vergleichbares Antikörpersignal. In Bahn 3 erkennt man bei einer Induktion von 0,75 mM IPTG und einer spezifische Aktivität von 1,5 U/mg das stärkste Antikörpersignal und somit die höchste Expression. In Bahn 1 wird

---

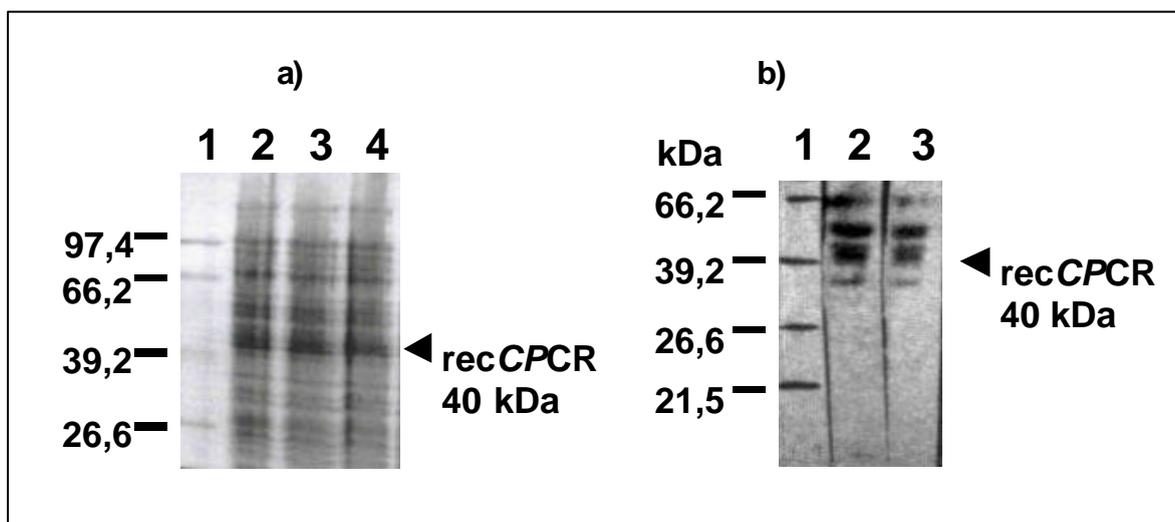
der pBTacrecCPCR-Klon ohne IPTG-Zugabe gezeigt, bei dem im 40 kDa Bereich ebenfalls eine schwache Bande zu detektieren ist. Wie bereits in Abbildung 35 gezeigt, ist der Promotor nicht vollständig vor Zugabe von IPTG reprimiert. Bahn 6 zeigt den Vergleich der Antikörperdetektion des pKK223-3recCPCRHB101-Konstrukt, welches, induziert mit 1 mM IPTG ebenfalls ein Antikörpersignal aufweist. Diesem Signal entspricht eine spezifische Aktivität von 0,3 U/mg. Bahn 7 zeigt den das Expressionskonstrukt pKK223-3 mit recCPCR-Insert. Bei diesem Vektor zeigt sich ebenfalls eine schwache Detektion im 40 kDa Bereich. Offensichtlich ist auch hier die Expression der recCPCR bereits angeschaltet bevor Induktor zugegeben wird. Mit Ausnahme von Bahn 5, in der die wtCPCR aufgetragen ist, wird in allen anderen Bahnen oberhalb der CPCR-Bande zusätzlich eine weitere Bande von ca. 50 kDa von dem AKCPCR1 Antikörper erkannt. Dieses Protein ist ein *E.coli* Protein, da Immunoblots mit einem JM105 Leerstamm ohne Plasmid ebenfalls Signale im Bereich von 50 kDa aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Bei einem polyklonalen Antikörperserum treten häufig Kreuzreaktionen auf. Da allerdings keine weitere Kreuzreaktion des Anti7körpers vorhanden ist und die obere Bande ebenfalls distinkt zu erkennen ist, könnte somit z.B. noch eine weitere Alkoholdehydrogenase detektiert worden sein, die gleiche oder ähnliche Antigenerkennungsstellen besitzt wie die CPCR und die offensichtlich mit zunehmender IPTG-Konzentration stärker vom Organismus gebildet wird. Zusätzlich kann man im Vergleich pBTac und pKK223-3 eine deutlich stärkeres Signal bei gleicher Induktorkonzentration bei dem pBTac-System erkennen.

### **3.17 „Inclusion Bodies“**

Bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in Mikroorganismen wird häufig nicht die natürliche, biologisch aktive Proteinstruktur ausgebildet. Statt dessen findet man in den Wirtsorganismen unlösliche, inaktive Proteinaggregate, sogenannte „*Inclusion Bodies*“ [Rudolph & Lilie, 1997]. Die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung dieser Proteinaggregate bei Überexpression rekombinanter Gene ergibt sich aus einer Verschiebung bei den kinetisch konkurrierenden Vorgängen der Faltung und Aggregation [Kiefhaber et al., 1991]. Dagegen korrelieren molekulare Charakteristika wie Größe der Polypeptidkette, Untereinheitenstruktur oder die relative Hydrophobizität des rekombinanten Proteins bei cytosolischer Expression rekombinanter Proteine nicht mit der Ausbildung von „*Inclusion Bodies*“ [Rudolph & Lilie, 1996]. Durch An

zucht der Bakterienzellen bei niedriger Temperatur und damit geringerer Expressionsrate oder durch limitierte Induktion kann es gelingen die Bildung von „*Inclusion Bodies*“ zu unterdrücken und die Ausbeute an nativen, löslichen Proteinen zu erhöhen [Kopetzki *et al.*, 1989]. Die Resolubilisierung im Zuge der Aufarbeitung von den in „*Inclusion Bodies*“ enthaltenen Fremdproteinen ist durch den Einsatz stark denaturierender Lösungsmittel möglich. Die intrazelluläre Produktion disulfidverbrückter Proteine führt selten zum Erfolg, da im reduzierenden Cytosol die Oxidation zur Ausbildung der nativen Disulfidbrücken kaum möglich ist [Creighton, 1996].

Um die Bildung von unlöslicher, in Form von „*Inclusion Bodies*“ vorliegender *recCPCR* zu überprüfen, wurden die unlöslichen Bestandteile des aufgeschlossenen Rohextraktes der *recCPCR* (Pellets) mittels SDS-Gelelektrophorese elektrophoretisch aufgetrennt. In dem in Abbildung 35 a) exemplarisch gezeigten Versuch werden die Pellets der Rohextrakte von pBTac*recCPCR*-Kulturen, die entweder bei 30 °C oder bei 37 °C kultiviert wurden, dargestellt. Die Spezifität der Banden wurden in einem Immunoblot analysiert, der in Abbildung 35 b) dargestellt ist. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen.



**Abbildung 35**

**a)** Coomassie gefärbtes SDS-Gel von Zellpellets des aufgeschlossenen Rohextrakt von pBTac*recCPCR*-Klonen

Bahn 1: Proteinstandardmarker; Bahn 2: pBTac*recCPCR*-Pelletfraktion, 37 °C; Bahn 3: pBTac*recCPCR*-Pelletfraktion, 34 °C; Bahn 4: pBTac*recCPCR*-Pelletfraktion, 30 °C.

**b)** Immunoblot der Zellpelletfraktionen des Aufschlusses von pBTac*recCPCR*-Klonen

Bahn 1: Proteinstandardmarker; Bahn 2: pBTac*recCPCR*-Zellpellet, 30 °C; pBTac*recCPCR*-Zellpellet, 37 °C.

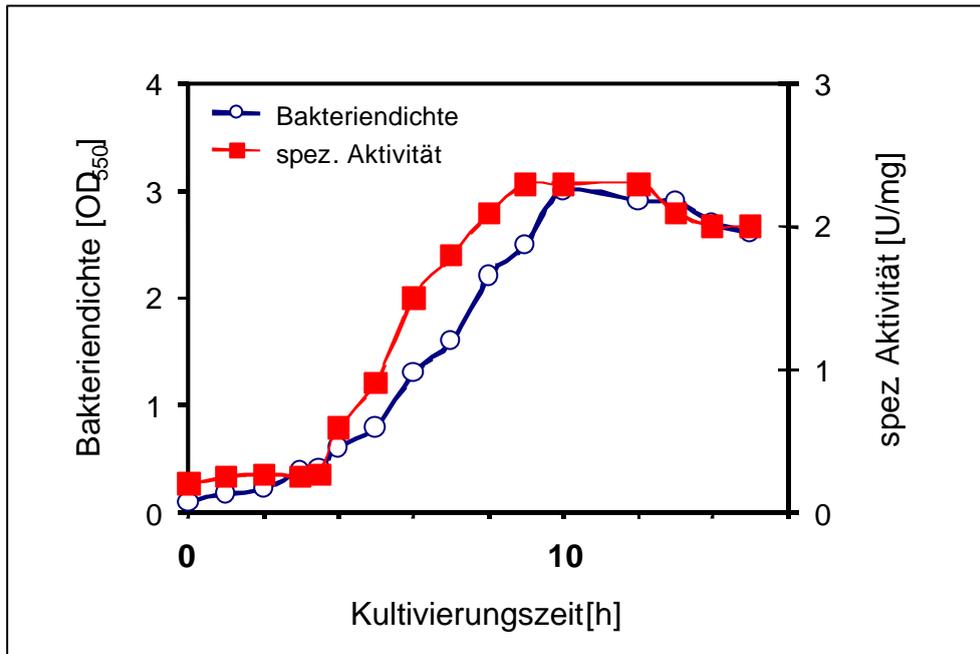
---

In allen Ansätzen in Abbildung 35 a) ist etwas oberhalb der 39 kDa Proteinmarkerbande eine Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 40 kDa zu erkennen, deren Größe mit jener der *CPCR* korrespondiert. Diese Banden entsprechen in den jeweiligen Ansätzen einem Anteil von ca. 5 % Protein an der Gesamtproteinmenge und sind alle, unabhängig von der Kultivierungstemperatur, gleich stark in den Proteinproben vorhanden. Der Immunoblot der Zellpellets, der in Abbildung 35 b) dargestellt ist, zeigt, dass die im Coomassie gefärbten Gel hervorgehobenen Banden von dem polyklonalen AK*CPCR*1-Serum erkannt werden. Dies bedeutet, dass im Zellpellet ein unlöslicher Anteil an *recCPCR* vorliegt, d.h. Proteinaggregate gebildet wurden. Darüber hinaus sind in diesen Ansätzen starke Kreuzreaktionen des Antikörpers AK*CPCR*1 mit anderen Proteinen, die in den Proben enthalten sind, zu erkennen. Diese Kreuzreaktionen treten auch in Negativkontrollen auf, die nur den Wirtstamm enthalten, aber kein *CPCR*-Gen tragen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Antikörper häufig unspezifisch mit DNA interagieren [Burton, 1993]. Ebenso können in der Pelletfraktion enthaltene zur *CPCR* nahe verwandte Proteine detektiert worden sein.

Die oben gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die *recCPCR* teilweise in der Fraktion der unlöslichen Bestandteile des Rohextrakts enthalten ist. Die Bildung von „*Inclusion Bodies*“ kann dadurch erklärt werden, dass die *recCPCR* toxisch auf den Wirtsorganismus wirkt und die Expression des rekombinanten Proteins zu einem selektionierenden Merkmal wird.

Diese Hypothese wurde in einem in Abbildung 36 dargestellten Versuch überprüft. Die Abbildung zeigt die Wachstumskurve einer pBTac*recCPCR*-Kultur. Es ist die Bakteriendichte  $OD_{550}$  und die spezifische Aktivität U/mg der löslichen Rohextrakte gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen.

Diese Untersuchung zeigte, dass entgegen der Annahme, dass das pBTac*recCPCR*-Konstrukts toxisch für die JM105 Bakterienzellen, dies nicht der Fall ist. Die höchste spezifische Enzymaktivität konnte erwartungsgemäß beim Übergang der Kultur von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase gemessen werden



**Abbildung 36**

**Wachstumskurve von pBTacrecCPCR**

Der Ansatz wurde bei einer  $OD_{550}=0,4$  mit 0,75 mM IPTG induziert und bei 30 °C und 180 UPM kultiviert.

Um der Bildung von „*Inclusion Bodies*“ vorzubeugen, wurde die optimale Kultivierungstemperatur getestet. In Abbildung 37 (nächste Seite) sind exemplarisch die Expressionsraten der recCPCR in Korrelation zur jeweiligen Kultivierungstemperatur dargestellt. Für diese Analysen wurden alle 100 mL *E.coli*-Schüttelkulturen bei einer  $OD_{550}=0,4$  mit 0,75 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden unabhängig von ihrer Kultivierungstemperatur nach 6 h geerntet und die jeweilige recCPCR-Aktivität bestimmt.

Die Versuche zur Bestimmung der optimalen Kultivierungstemperatur der recCPCR wurden bei Temperaturen zwischen 25 und 40 °C durchgeführt. Die höchste Ausbeute an aktiver recCPCR wurde bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C und 0,75 mM IPTG von 2,1 U/mg beobachtet. Obwohl die optimale Wachstumstemperatur von *E.coli* bei 37 °C liegt, konnte unter diesen Bedingungen nur eine Aktivität von 1,5 U/mg detektiert werden. In den ebenfalls recCPCR enthaltenen Kontrollansätzen ohne IPTG- Zugabe ergaben sich sowohl für 30 °C wie auch für 37 °C nur sehr geringe CPCR-Aktivitäten von 0,02 U/mg im Rohextrakt. Diese Aktivität entspricht der Hintergrundaktivität in den Bakterienzellen ohne exprimierte rec

CPCR. In einer weiteren Serie von Versuchen wurde auch der Induktionszeitpunkt variiert.

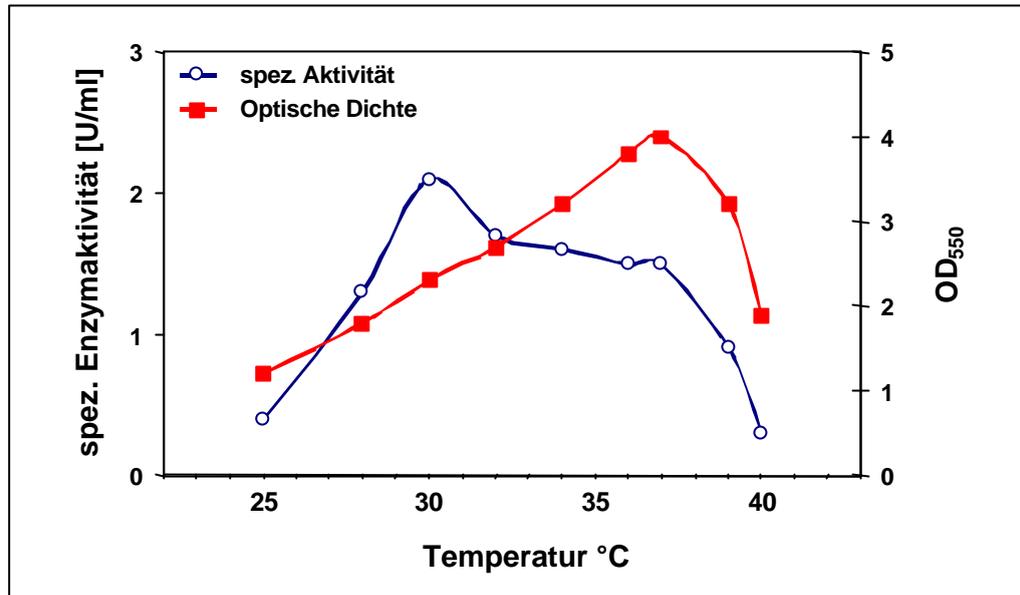


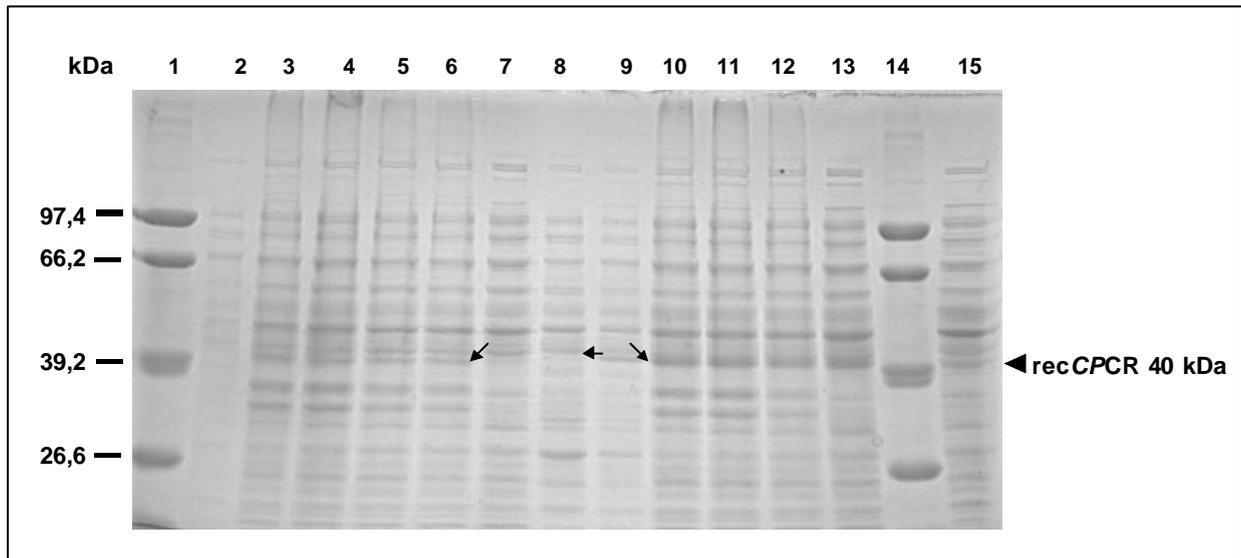
Abbildung 37

Kultivierung von pBTacrecCPCR zur Bestimmung der optimalen Kultivierungstemperatur

■ markiert die optische Dichte; ● die spezifische Aktivität der recCPCR.

Dies hatte allerdings keinen Einfluß auf die beobachteten Aktivitäten von 100 mL Kulturen; es wurde keine Aktivitätssteigerung beobachtet. In dem in Abbildung 37 dargestellten Graph ist zu erkennen, dass bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C die höchste Expressionsrate nachgewiesen werden konnte. Diese lag bei 2,1 U/mg. Bei den übrigen, getesteten Temperaturen wurde eine niedrigere spezifische Aktivität gemessen. Bei Temperaturen oberhalb der optimalen Kultivierungstemperatur von 37 °C (1,5 U/mg) für *E.coli* [Dale, 1994], wurde ein deutlicher Abfall der spezifischen Aktivität beobachtet. Die höchste Biomasse wurde erwartungsgemäß durch eine Inkubation bei 37 °C, der optimalen Kultivierungstemperatur von *E.coli*, erhalten. Kultivierte man pBTacrecCPCR-Klone bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C bis zu einer OD<sub>550</sub> = 4 kultiviert, so konnte die spezifische Aktivität der löslichen Rohextrakte auf 2,3 U/mg gesteigert werden. Die in dem in Abbildung 37 dargestellten Versuch analysierten löslichen Überstände des pBTacrecCPCR-Klons, wurden darüber hinaus in einer SDS-Gelelektrophorese untersucht. Hierbei sollte geprüft werden, ob durch die Intensität der entsprechenden Proteinbanden eine erhöhte Expression auch auf Proteinlevel zwischen der Kultivierung bei 30 °C und bei 37 °C bei gleichen aufgetragenen Mengen zu detektieren war. Darüber hinaus

sollte die optimale Induktorkonzentration zwischen 0 und 2 mM IPTG bei einem konstanten Induktionszeitpunkt von  $OD_{550} = 0,4$  ermittelt werden. In Abbildung 38 sind die Ergebnisse zusammenfassend in einem SDS-Gel dargestellt.



**Abbildung 38**

**SDS-PAGE zur Überprüfung der löslichen recCPCR-Fractionen nach einer Anzucht bei 30 °C und 37 °C mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen.** Alle Versuche wurden, wenn nicht explizit erwähnt, mit dem Expressionsstamm pBTacrecCPCRJM105 durchgeführt.

Bahn 1: SDS-Standardmarker; Bahn 2: JM105 Leerstamm, induziert mit 0,75 mM IPTG, 37 °C; Bahn 3: + 1 mM IPTG, 37 °C; Bahn 4: + 0,75 mM IPTG, 37 °C; Bahn 5: 0,5 mM IPTG, 37 °C; Bahn 6: +0,25 mM IPTG, 37 °C; Bahn 7: + 0 mM IPTG, 37 °C; Bahn 8: JM105 Stamm + pBTac-Vektor ohne CPCR-Geninsertion, 0 mM IPTG, 30 °C; Bahn 9: + 0 mM IPTG, 30 °C; Bahn 10 + 11: + 0,25 mM IPTG, 30 °C, Bahn 12: 0,5 mM IPTG, 30 °C, Bahn 13: 0,75 mM IPTG, 30 °C; Bahn 14: SDS-Standardmarker; Bahn 15: + 1 mM IPTG, 30 °C.

Das Ergebnis dieser SDS-PAGE war, dass ein deutlicher Unterschied zwischen den Proteinbanden der 30 °C und 37 °C Kultivierungsansätzen existiert, der sich im Aktivitätsunterschiedes widerspiegelte. Darüber hinaus wird durch die dargestellten Versuche deutlich, dass durch das Absenken der Kultivierungstemperatur die spezifische Aktivität von 1,5 U/mg in Bahn 4 (37 °C) auf 2,3 U/mg (30 °C), dargestellt in Bahn 13, gesteigert werden konnte. Dieser Wert entspricht dem 10-fachen des für die wtCPCR in löslichen Rohextrakten aus *Candida parapsilosis* bestimmten Werten. Dennoch ist der abgeschätzte Proteinanteil der recCPCR in pBTacrecCPCR von unter 5 % am Gesamtproteingehalt relativ gering. Die als starke Expressionssysteme

---

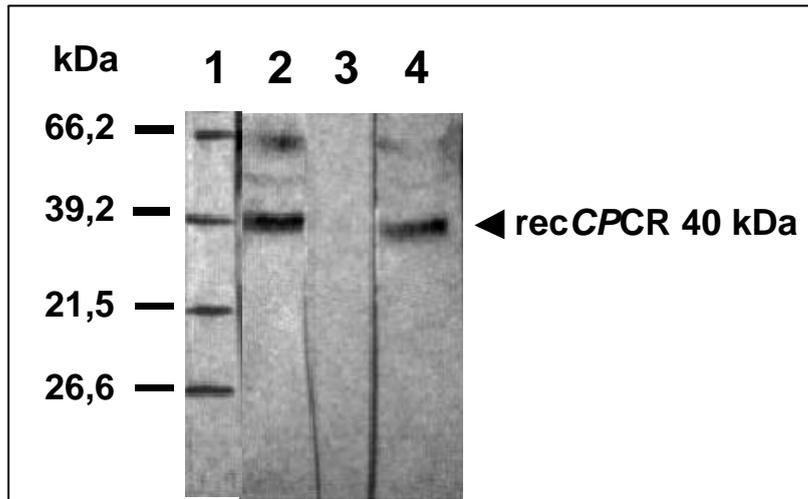
geltenden pBTac2 und pKK223-3 Vektoren können Anteile an rekombinanten Proteinen von über 10 % am Gesamtprotein erzielen [deBoer, 1983].

Für die Steigerung und damit für eine Optimierung der Expression der recCPCR wie auch für eine Reduzierung der „Inclusion Body“-Bildung sind neben der Auswahl eines geeigneten Vektor-Wirt-Systems die Induktionsbedingungen variiert worden, um eine maximale Proteinexpression zu erzielen. Diese Untersuchung ergab, dass mit einer IPTG-Konzentration von 0,75 mM eine Enzymaktivität von 1,5 U/mg bei 37 °C und 2,3 U/mg bei 30 °C für das pBTacrecCPCR-System erreicht werden kann.

### **3.18 Renaturierungsversuche zur Auflösung von „Inclusion Bodies“**

Wie bereits in Abbildung 35 a) und b) dargestellt, liegt ein Teil der recCPCR offenbar in Form von unlöslichen Proteinaggregaten vor. Um dies zu überprüfen bzw. um den Anteil an löslicher Carbonylreduktase zu erhöhen, wurden Renaturierungsversuche durchgeführt. In Abbildung 37 und 38 wurde bereits die Kultivierungstemperatur als kritischer Faktor bei der Produktion der recCPCR beschrieben. Die exprimierte Menge wird deutlich von diesem Parameter beeinflusst. Durch die Senkung der Kultivierungstemperatur und den damit verlangsamten Stoffwechsel bzw. der Wachstumsrate, wird die aus der Überexpression resultierende kinetische Konkurrenz zwischen Faltung und Aggregation [Kiefhaber et al., 1991] in Richtung der Ausbildung der korrekt gefalteten recCPCR verschoben.

Mit Hilfe denaturierender Substanzen wie 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidinium-HCl oder 30 mM KOH konnten die die recCPCR enthaltenen „Inclusion Bodies“ in Lösung gebracht werden, d.h. eine Resolubilisierung der recCPCR erzielt werden. Es konnte nach der Resolubilisierung durch diese Agenzien rekombinante CPCR im löslichen Überstand mit Hilfe des polyklonalen AKCPCR1-Serum im Immunoblot detektiert werden; allerdings konnte in den renaturierten Proteinfractionen nach den Renaturierungsversuchen keine Aktivität der recCPCR gemessen werden. Das potentielle Vorhandensein resolubilisierter, aber nicht renaturierter recCPCR wird in Abbildung 39 durch einen Immunoblot gezeigt. Als Negativkontrolle wurde löslicher pBTac recCPCR-Überstand ohne Zweitantikörperkonjugat eingesetzt. Der AKCPCR 1 wurde mit einer Konzentration 1:1000 verwendet.



**Abbildung 39**

**Immunoblot von resolubilisierter *recCPCR***

Bahn 1: Proteinstandardmarker; Bahn 2: *recCPCR*-Pellet, resolubilisiert in 8 M Harnstoff, renaturiert in 100 mM TRIS-Puffer, pH 7,5 + 0,5 M Arginin; Bahn 3: Negativkontrolle, *AKCPCR1* ohne den 2. Antikörper; Bahn 4: *recCPCR*-Pellet, resolubilisiert in 6 M Guanidin-HCl, renaturiert in 100 mM TRIS-Puffer, pH 7,5 + 0,5 M Arginin

Es können sowohl in Bahn 2 wie auch in Bahn 4 deutliche Banden im Bereich von 40 kDa detektiert werden, d.h. hierbei handelt es sich um resolubilisierte *recCPCR*. Zudem sind unspezifische Kreuzreaktionen kaum zu detektieren. Dennoch konnte keine *recCPCR*-Aktivität gefunden werden, d.h. es wurde kein natives Protein zurückgefaltet. Die renaturierten Fraktionen wurden u.a. mit quantitativen Enzymtests und mit einer Western Blot Analyse untersucht.

Auch der Zusatz von Arginin, Zinksulfat oder dem die Ausbildung von potentiellen Disulfidbrücken unterstützenden red./ox. Glutathionsystem konnten diese Ergebnisse nicht verbessern. Nach Coomassie und Silberfärbung der Gele konnte keine signifikante *CPCR*-Bande im Bereich von 40 kDa detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch die Variationen der Renaturierungsversuche, wie längere Renaturierungszeiten, höhere Verdünnungen des resolubilisierten Proteins beim Renaturierungsvorgang und Variation der Additivkonzentration, konnten das als „*Inclusion Bodies*“ vorliegende Protein nicht in die aktive Form überführen. Ebenso hatte die Verwendung anderer Expressionsvektoren wie z.B. pTrc 99 (Amersham Pharmacia-Biotech) wie auch die Transformation in andere Expressionsstämme wie AD494 (siehe Tabelle 16) keine positiven Veränderungen zur Folge.

---

Die Renaturierungsversuche zeigten, dass das aktive, native Protein nicht erhalten werden konnte.

### 3.19 Plasmidinstabilitäten

Neben der Bildung von „*Inclusion Bodies*“ wurde auch die Plasmidstabilität der *recCPCR* getestet.

Die Instabilität von plasmidkodierten Expressionskonstrukten ist ein wesentlicher Faktor bei der großtechnischen Produktion von Proteinen, die sich zum einen auf die Struktur des Expressionssystems, zum anderen durch den Verlust des Plasmids in der Generationsfolge auswirken kann.

Die Abwesenheit von Deletionen, DNA-Umgruppierungen oder Insertionen in Plasmiden oder in einem Wirtschromosom während der Kultivierung zeichnet die strukturelle Stabilität aus. Diese kann vor allen Dingen durch das Vorhandensein von DNA-Sequenzen mit intramolekularen Homologien beeinträchtigt werden. Eine solche homologe Rekombination kann durch die Verwendung rekombinationsdefizienter Wirtsstämme (z.B. *rec A<sup>-</sup>*) vermieden werden. Starke Promotoren können sich ebenfalls negativ auf die strukturelle Stabilität eines Plasmids auswirken [Stader, 1995].

Segregationsinstabilitäten des Fremdgens oder Plasmids treten auf, wenn die genetischen Informationen an die Folgegeneration innerhalb einer wachsenden Population nicht weitergegeben werden. Segregationsstabilitäten können durch mehrere Faktoren gefördert werden [Balbas & Bolivar, 1990]. Sie werden u.a. durch Selektionsmarker erzielt. Antibiotika begünstigen als Selektionsmarker das Wachstum von Wirtsorganismen unter definierten Kultivierungsbedingungen, die unter Wildtyp-Bedingungen bakteriostatische oder bakterizide Wirkungen hätten.

Einen entscheidenden Einfluß auf die Stabilität wird durch die Transkriptionsaktivität eines Fremdgens [Stader, 1995], durch die Zusammensetzung des Kulturmediums und durch die Plasmidkopienzahl ausgeübt. Die Entstehung plasmidfreier Zellen kann dadurch ausgelöst werden, dass durch unzureichende Repression die Expression rekombinanter Gene die Wachstumsrate plasmidhaltiger Zellen um ca. 30 % verringert [Caulcott et al., 1985]. Ein Plasmidverlust kann ebenfalls die Folge einer Fortsetzung der Transkription in über das Fremdgen hinausgehende Bereiche sein [Stueber & Bujard, 1982]. Da gerade Bakterien mit hohem Plasmidgehalt einen gesteigerten Energieverbrauch aufweisen, müssen die Wachstumsbedingungen so

---

gewählt werden, dass Glucose-, Phosphat- und Magnesium-Limitierungen sowie O<sub>2</sub>-Mangel vermieden werden [Stader, 1995].

Die Kopienzahl eines Plasmids ist abhängig von Wirtstamm und Wachstumsbedingungen. In der exponentiellen Wachstumsphase liegen Plasmide in definierter Kopienzahl vor. Diese werden mittels eines negativ regulatorischen Kreislaufs unter Mitwirkung eines Repressorproteins, einer Antisense-RNA oder direkter DNA-„Repeats“ kontrolliert.

Der Ausgangsvektor der meisten *E.coli* Expressionssysteme leitet sich vom *high-copy*-Plasmid pBR322 ab [Bolivar et al., 1977]. Die Kopienzahlen dieser Vektoren liegen zwischen 20 und 700 pro Zelle, allerdings werden diese durch hohe Wachstumsraten verringert [Balbas & Bolivar, 1990].

Darüber hinaus kann die Nukleotidsequenz des Fremdgens auf dreierlei Weise verhindern, dass das fremde Gen in *E.coli* effizient exprimiert wird. Dies kann z.B. die Codonnutzung eines fremden Gens sein, dass sich unter Umständen nicht optimal für die Expression in *E.coli* eignet. Generell ist der genetische Code universell, dennoch werden bei jeder Organismenart bestimmte „Codons“ bevorzugt. In diesem Ungleichgewicht spiegelt sich die Tatsache wider, dass die verschiedenen tRNA-Moleküle die einzelnen Codons mit unterschiedlicher Effizienz erkennen. Enthält ein kloniertes Gen zahlreiche, ungünstige Codons, können die tRNA's der Wirtszelle diese Sequenzen nur geringfügig translatieren, so dass die Menge des synthetisierten Proteins sinkt.

### **3.20 Strukturelle Stabilität und Segregationsstabilität**

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde untersucht, ob die Transformation des *E.coli* Stamms JM 105 mit dem Plasmid pBTacrecCPCR zu stabilen Transformanten führt. Eine Plasmidinstabilität der recCPCR-Transformanten ist möglich, wenn das Produkt des transformierten CPCR-Gens eine Belastung für den Stoffwechselapparat des Wirtstammes JM105 darstellt. Um diese Fragen zu untersuchen, wurden zum einen die Bakterien Langzeit kultiviert: Zum anderen wurden Bakterien, die nach ihrer Erstkultivierung in Glycerinstocks gelagert wurden, erneut kultiviert.

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass die Wirtstämme entweder ihre Plasmidinsertionen verloren oder sich die Aktivität der recCPCR verringerte. Dies wurde in einer Größenordnung von über 70 %, d.h. von 2,3 U/mg auf ca. 0,7 U/mg beobachtet. Darüber hinaus wurden Fermentationen durchgeführt, um dem *E.coli* Wirtstamm

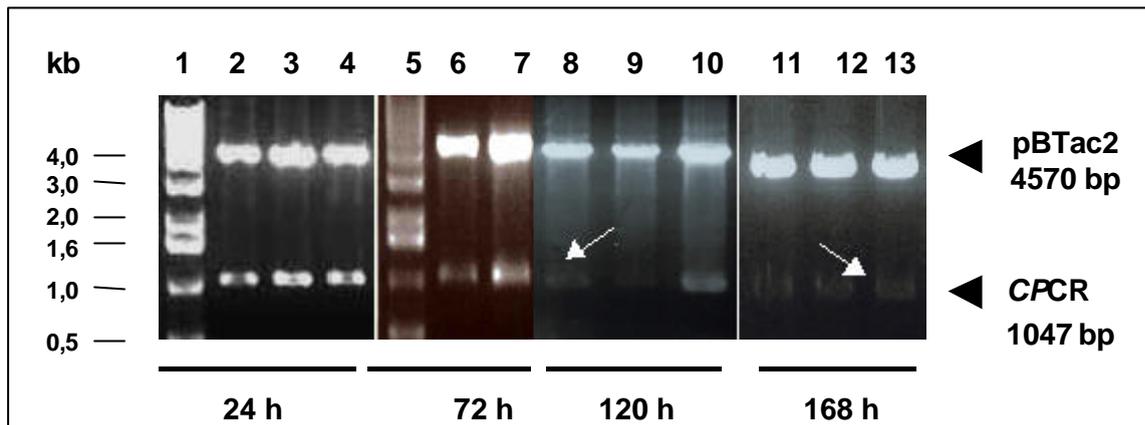
---

die optimalen Wachstumsbedingungen zu gewähren, die eine zusätzliche Plasmidstabilisierung bewirken sollten.

Es wurden über mehrere Tage aus Überständen von Schüttelkolbenkulturen, aber auch aus einer „Batch“-Fermentation bzw. einer Hochzellichtefermentation das Expressionsplasmid pBTacrecCPCR isoliert. Die Plasmidpräparationen wurden mit den Restriktionsenzymen *Eco* RI und *Pst* I geschnitten, um das recCPCR Insert aus dem Expressionsplasmid herauszulösen. Dadurch sollte die strukturelle Stabilität bzw. die Segregationstabilität des pBTacrecCPCR-Klons getestet werden. Sind diese Stabilitäten gegeben, sollte weder ein Unterschied in der Bandenhomogenität der in einem Agarosegel aufgetrennten Restriktionsverdau noch Plasmidverluste zu beobachten sein. Alle Kultivierungen fanden bei 30 °C statt. Die Schüttelkolbenkulturen wurden mit 0,75 mM IPTG, die Fermentationskulturen mit 1 mM IPTG induziert. Im Gegensatz zu den Fermentationen wurde ein Aliquot der Schüttelkultur alle 20 h in eine neue Schüttelkultur überimpft. Dieser Vorgang wurde insgesamt 10 d lang durchgeführt.

In den Abbildungen 40, 41 und 42 sind die untersuchten Plasmide dargestellt. Es wurden jeweils Doppel- bzw. Dreifachproben der jeweiligen Kulturentnahmen auf die Agarosegele aufgetragen. Zum Vergleich der Insertionsstärke des recCPCR-Gens ist in Bahn 14 der Abbildung 40 (nächste Seite) der Restriktionsverdau des Ausgangsvektors pUC18 mit dem geschnittenen recCPCR-Fragment als Positivkontrolle bzw. Selektionsmerkmal gezeigt

Auf den in Abbildung 40 dargestellten Agarosegelen ist zu erkennen, dass die Segregationsstabilität des pBTacrecCPCR-Konstrukts mit der Generationszeit abnimmt und damit die Plasmidkopienzahl des recCPCR-Gens in den Organismen sinkt bzw. die rekombinante Carbonylreduktase nur noch sehr schwach exprimiert wird.



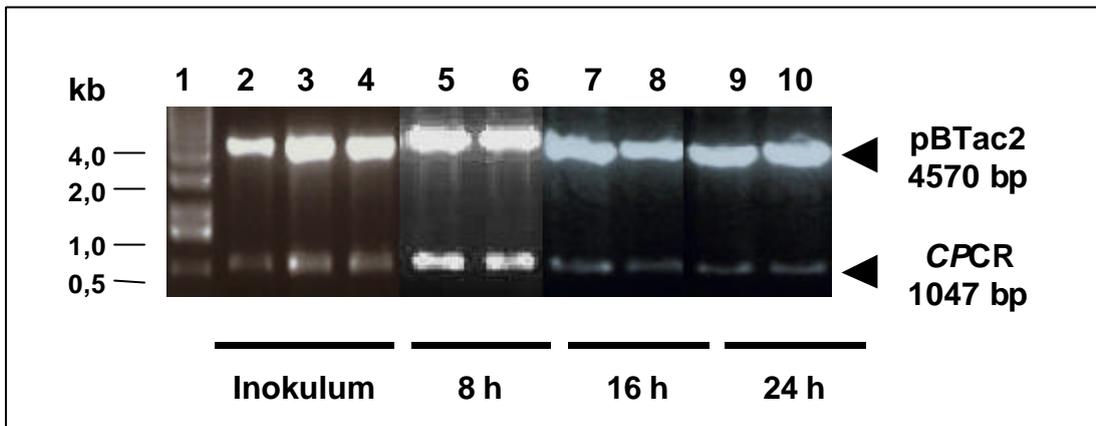
**Abbildung 40**

**Schüttelkolbenkultur/100 mL LB-Medium**

Bahn 1: 1Kb-Leiter; Bahn 2, 3, 4: Kulturüberstandentnahme von pBTacrecCPCR nach 24 h; Bahn 5: 1 Kb-Leiter, 6, 7: Kulturüberstandentnahme von pBTacrecCPCR nach 72 h; Bahn 8, 9, 10: Kulturüberstandentnahme von pBTacrecCPCR nach 120 h; Bahn 11, 12, 13: Kulturüberstandentnahme von pBTac recCPCR nach 168 h. Die weißen Pfeile sind zur Verdeutlichung des rec CPCR-Inserts bei ca 1 kb.

Entsprechend konnte bei der Expressionsanalyse nach 24 h eine spezifische Aktivität von 1,9 U/mg gemessen werden; nach 72 h nur noch eine spezifische Aktivität von 1,4 U/mg. Nach 120 Stunden wurden noch 0,7 U/mg gemessen und nach 168 h konnte keine signifikante Aktivität oberhalb der Hintergrundaktivität detektiert werden. Nach 180 h konnte weder das Expressionsplasmid noch das Insert detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Das Expressionsplasmid wurde demnach aus dem Wirtstamm ausgeschleust, da offenbar der Selektionsdruck, z.B. aufgrund des Abbaus des Antibiotikums Ampicillin durch die *E.coli* eigene  $\beta$ -Lactamase [Livermore & Brown, 2001, für die Zellen nicht aufrecht erhalten werden konnte. Mit der Abnahme der Plasmide in den transformierten Bakterien wurde gleichzeitig ein verlangsamtes Wachstum beobachtet. Dies konnte auch durch parallele Kulturen der als Inokulum für die jeweils nächste 20 h Kultur verwendeten Bakterien auf festen Medien (LB-Agarplatten) mit und ohne Antibiotikazusatz beobachtet werden. Entsprechend wuchsen die nach 180 h plasmidfreien *E.coli* Zellen weder im Ampicillinflüssigmedium noch auf den Antibiotika haltigen Festmedien an, da durch den Verlust des das Ampicillinresistenzgen tragende pBTac-Plasmid die Fähigkeit auf Antibiotika haltigen Medien zu wachsen, nicht mehr vorhanden war.

Die strukturelle Stabilität von pBTacrecCPCR wird jedoch nicht in der Langzeitkultivierung im 100 mL Kultivierungsansatz beeinflusst, da das Bandenmuster im Agarsegel generell identisch bleibt. Dies bedeutet, dass größere Insertionen, Deletionen oder Umgruppierungen nicht auftraten.



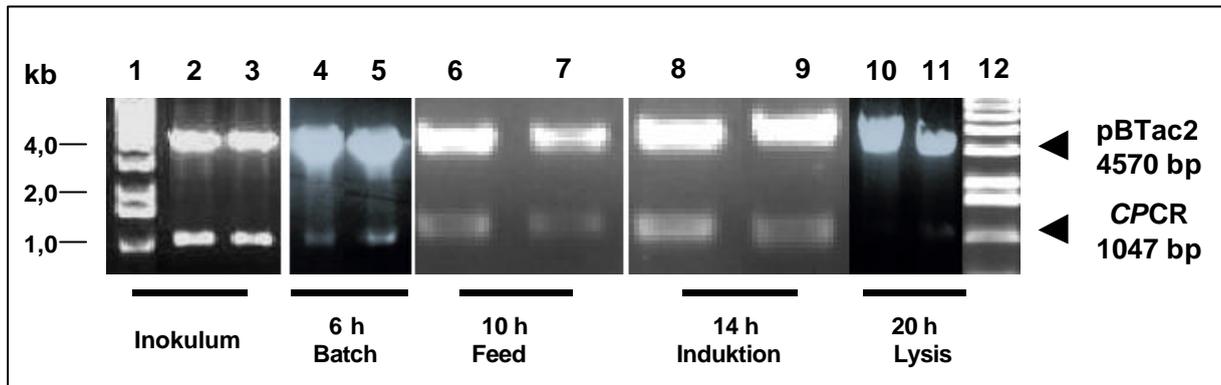
**Abbildung 41**

**Batchfermentation/20 L LB-Medium**

Bahn 1: 1 Kb-Leiter; Bahn 2, 3, 4: Inokulum der Batch-Fermentation; Bahn 5, 6: Kulturüberstandentnahme von pBTacrecCPCR nach 8 h; Bahn 7, 8: Kulturüberstandentnahme von pBTacrecCPCR nach 16 h; Bahn 9, 10: Kulturüberstandentnahme von pBTacrecCPCR nach 24 h

In den in Abbildung 41 dargestellten Versuch bleibt die Plasmidstabilität über den gesamten Zeitraum der Fermentation erhalten. Dies entspricht ebenfalls den Ergebnissen des in Abbildung 40 gezeigten Versuch im Zeitraum von 24 h. Das im Expressionsplasmid enthaltene Insert ist über die gesamten Fermentationsdauer deutlich zu detektieren. Die Expression der recCPCR wurde 2 h nach der ersten IPTG-Zugabe und somit nach insgesamt 7 Stunden Fermentationsdauer mit einer spezifischen Aktivität von 1,3 U/mg detektiert. Nach 12 h konnten 2,5 U/mg an spezifischer Aktivität nachgewiesen werden. Nach 20 h wurde eine spezifische Aktivität von 2,2 U/mg und nach 24 h von 1,8 U/mg gemessen, wobei die Bakterien zu diesem Zeitpunkt bereits von der stationären Phase langsam in die Absterbephase übergingen. Unter „Batch“-Fermentationsbedingungen konnte die recCPCR weitgehend stabil fermentiert werden. Die gute Durchmischung der Kultursuspension wie auch der kontinuierliche Sauerstoffeintrag in die Zellen begünstigten den optimalen Wachstum der Zellen und reduzierten das Auftreten von Belastungen des Zellstoffwechsels der *E.coli* Zellen in Form von Sauerstofflimitierung. Zudem wurde die Kultur 6 h nach der ersten Induktion erneut mit 1 mM IPTG versetzt.

Die strukturelle Stabilität war bei dieser Kultivierung prinzipiell gewährleistet, da ein homogenes Bandenmuster in den Agarosegelen demonstriert werden konnte.



**Abbildung 42**

**HZD-Fermentation/15 L Medium**

Bahn 1: 1 Kb-Leiter; Bahn 2, 3: Inokulum der HZD-Fermentation; Bahn 4, 5: Kulturüberstandentnahme von pBTacrecCPCR nach 6 h „Batch“; Bahn 6, 7: Kulturüberstandentnahme von pBTac recCPCR nach 10 h Feed; Bahn 8, 9: Kulturüberstandentnahme von pBTacrecCPCR nach 14 h/ Induktionszeitpunkt = Zugabe von 1 mM IPTG

Mit Hilfe der Hochzelldichtefermentation (HZD-Fermentation) konnte der eingesetzte Expressionsstamm zu hohen Biomassen fermentiert werden. Außer einer Hintergrundaktivität konnte nach der Induktion in diesen Ansätzen jedoch keine recCPCR-Aktivität gefunden werden. Zudem wurde nach 20 h Fermentation bei einer Zelldichte von  $OD_{550} = 200$  die Lyse der Bakterienzellen beobachtet. Diese kann z.B. durch eine Proteasenfreesetzung und einem dadurch verbundenen hohen Abbau des Zielproduktes erklärt werden. Auf molekularer Ebene ist dieses Ergebnis nicht mit einem erwarteten kompletten Plasmidverlust des JM105 Stammes verbunden. Man kann allerdings nach 20 h HZD-Fermentation das CPCR-Insert nur noch sehr schwach detektieren bzw. keinen Nachweis ermitteln, da die entsprechende Bande zu schwach ist. Dies wird besonders deutlich in den in den Bahnen 10 und 11 aufgetragenen Proben. Dies könnte an der besonderen Fermentationsart eines hintereinander geschalteten „Batch“ mit anschließendem „Fed-Batch“ in einem reichhaltigen Medium liegen, so dass der Zellstoffwechsel des pBTacrecCPCR Stammes nachhaltig gestört wird. Auch die strukturelle Stabilität scheint hier beeinträchtigt zu sein, da das Bandenmuster nicht homogen im Agarosegel erscheint und das Verhältnis der Vektorbande zum Insert sich deutlich verschiebt

---

Die Hochzell-dichtefermentation wurde ursprünglich zur Reduktion von Kulturvolumina, Produktions- und Investitionskosten, Abwassermengen wie zur Erleichterung der Produktaufarbeitung und zur Verbesserung der Produktivität mikrobieller Systeme entwickelt [Knorre et al., 1991; Riesenberg et al., 1990]. Nachteilig auf die HZD-Fermentation können sich Substratkonzentrationen oberhalb bestimmter Grenzwerte auswirken, die das Zellwachstum inhibieren. Für *E.coli* Stämme gelten folgende Konzentrationen als Grenzwerte: Ammonium  $>3 \text{ gL}^{-1}$ , Glukose  $>50 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{P}^{2+} >10 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{Mg}^{2+} >8,7 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{B}^{2+} >44 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $\text{Mo}^{2+} >0,8 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{Mn}^{2+} >68 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $\text{Cu}^{2+} >4,2 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $\text{Co}^{2+} >0,5 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $\text{Zn}^{2+} >38 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $\text{Fe}^{2+} >1,15 \text{ gL}^{-1}$ . Je größer der Bioreaktor, desto schlechter die Durchmischung der Zellen. Zellen, die sich nahe der Nährstoffinjektionsstelle befinden, sind erhöhten Nährstoffkonzentrationen ausgesetzt, während an anderer Stelle Nährstoffmangel herrschen kann. Gerade bei der häufigen Verwendung von Glucose als C-Quelle führt sowohl der Mangel als auch der Überschuß zu einer Verringerung der Zellausbeute [Neubauer et al., 1995]. Ein weiteres Problem der HZD-Fermentation stellt die Bildung von metabolischen Nebenprodukten dar. Beträgt die Dichte von *E.coli*-Kulturen über 30-40 g Biomasse/L Kulturmedium, akkumulieren die Bakterien Nebenprodukte wie Ethanol, Isobutyrat, Lactat, Pyruvat, Succinat, Propionat oder Acetat [Landwall & Holme, 1977]. Besonders Acetat inhibiert das Zellwachstum, so dass die Zellausbeute, die maximal erzielbare Zelldichte [Lee et al., 1999] und die Produktion des Fremdproteins vermindert werden [Jensen & Michelsen 1992].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Segregationsstabilität des die *recCPCR* enthaltenen Expressionsstamm pBTacJM105 unzureichend ist. Zum einen kann man dies über die Kultivierung vieler Generationen detektieren, zum anderen auch durch die Kultivierungsart. Die „Batch“-Fermentation ist offensichtlich die günstigste Kultivierungsart der *recCPCR*, um zum einen Biomasse mit einem stabilen Plasmid zu erhalten und zum anderen ausreichend Massen an *recCPCR* zu produzieren.

Die strukturelle Stabilität wurde nur bei den HZD-Fermentationen nachhaltig beeinträchtigt.

### **3.21 Weitere Untersuchungen zur Expressionsverbesserung**

Neben den Untersuchungen zur Stabilität und zur Renaturierung potentieller, unlöslicher *recCPCR*-Aggregate wurde der Expressionsvektor pBTac2 auf die unpro-

---

blematische Integration in den Wirtstamm JM105 überprüft. Das *CPCR*-Gen befindet sich unter der Kontrolle des starken *tac*-Promotors, der hohe Expressionsraten erzeugen kann. Die Repression des *tac*-Promotors erfolgt durch den Lac-Repressor *lacI*. Eine mutierte Form dieses Gens, das sogenannte *lacI<sup>Q</sup>*-Gen, sorgt für eine erhöhte Expressionsrate des Repressors und somit kann eine effektive Reprimierung des *tac*-Promotors gewährleistet werden [deBoer, 1983]. Die Möglichkeit zur Unterdrückung der Genexpression spielt insbesondere bei Genprodukten eine Rolle, die für *E.coli* toxisch sind. Das *lacI<sup>Q</sup>*-Gen befindet sich auf dem „*single copy*“-Plasmid F'. Dementsprechend kann das Expressionsplasmid pBTac nur in *E.coli* Stämmen verwendet werden, die das F'-Plasmid besitzen. Zu diesem gehört der verwendete Wirtstamm JM105. Ein Fehlen dieses F'-Plasmid führt zu Plasmidinstabilitäten, da sich die Expression der vermeintlich toxischen *recCPCR* nicht mehr ausreichend kontrollieren läßt. Es wurde überprüft, ob der JM105 Stamm noch über das F'-Plasmid verfügt. Dafür wurde ein als Dauerkultur gelagerter pBTac*recCPCR* Glycerinstock auf M9-Minimalmedium ausgestrichen und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Auf diesem M9-Minimalmedium können nur die das F'-Plasmid enthaltene *E.coli* Stämme wachsen.

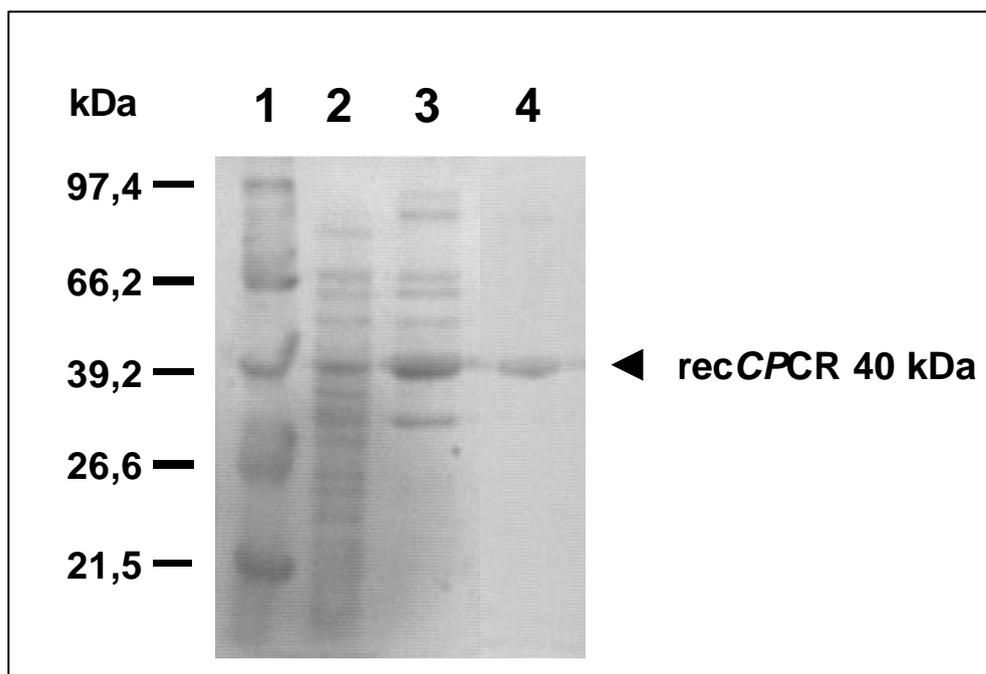
Es zeigte sich auf den ü/N kultivierten Agarplatten, dass nur ein Teil der kultivierten Klone auf diesem Medium wachsen konnten. Dies bedeutet, dass einige in Glycerin bei -80 °C gelagerte pBTac*recCPCR*-Klone bereits das für die Regulation der Expression wichtige F'-Plasmid verloren. Zur Vermeidung solcher Plasmidinstabilitäten mußten die pBTac*recCPCR* Konstrukte regelmäßig neu transformiert werden.

### **3.22      Aufreinigung der rekombinanten *CPCR***

Die löslichen Fraktionen von aufgeschlossenen *recCPCR*-Rohextrakten wurden entsprechend der oben beschriebenen Protokolle für die *wtCPCR* aufgereinigt. Als erster Schritt nach dem Zellaufschluß [Hummel & Kula, 1989b] wurde eine fraktionierte PEG<sub>4000</sub>-Fällung und anschließender Anionenaustauscherchromatographie mittels Q-Sepharose FF durchgeführt. Die Elution der *recCPCR* erfolgte bei 80 mM NaCl. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und einer Affinitätschromatographie an 5' AMP Sepharose 4b unterzogen. Die Elution erfolgte mit 3 mM NAD<sup>+</sup>. Nach diesem Aufreinigungsschritt lag die *recCPCR* homogen vor und konnte für weitere proteinchemische Untersuchungen verwendet werden. Die Elutionsfraktionen dieser Aufreinigungsschritte wurden in einer SDS-

---

Gelelektrophorese überprüft. In Abbildung 43 sind diese Ergebnisse in einem mit Coomassie gefärbten Gel dargestellt. Bereits nach der Anionenaustauscherchromatographie wurden nur noch wenige andere *E.coli* Proteine im SDS-Gel detektiert, so dass die *recCPCR* bereits ca. 50 % an der Gesamtproteinzusammensetzung dieser Elutionsfraktion ausmacht. Nach der Affinitätschromatographie lag die *recCPCR* homogen gereinigt vor. Dies bedeutete, dass im Vergleich zur *wtCPCR* die Aufreinigung der *recCPCR* eine Vereinfachung zur Herstellung von reinem Protein brachte, da der dritte Aufreinigungsschritt der *wtCPCR*, die Gelfiltration, nicht mehr durchgeführt werden mußte.



---

**Abbildung 43**  
**Elutionsfraktionen der *recCPCR***

Bahn 1: Proteinstandardmarker; Bahn 2: 2. PEG-Fällung der *recCPCR*, nach Resuspension in 20 mM TEA, NaOH, pH 7,5; Bahn 3: Elutionsfraktion der *recCPCR* nach Anionenaustauscherchromatographie an Sepharose Q FF, Bahn 4: Elutionsfraktion der *recCPCR* nach der Affinitätschromatographie an 5' AMP-Sepharose 4 b.

Tabelle 18 (nächste Seite) gibt einen Überblick über die spezifischen Aktivitäten, die nach den entsprechenden Aufreinigungsschritten gemessen worden sind.

Aus Tabelle 18 geht hervor, dass die homogen aufgereinigte *recCPCR* mit einer spezifischen Aktivität von 1199 U/mg gemessen wurde. Ausgehend vom löslichen Rohextrakt ergibt sich, bezogen auf die Gesamtausbeute an *recCPCR*, ein geringer

Proteinverlust von ca. 20 %. Die reine recCPCR entsprach einer 521fachen Anreicherung gegenüber dem Rohextrakt. Durch die zweite Chromatographie konnte die

**Tabelle 88:** Aufreinigungsdaten der recCPCR

Aufreinigungsschritt	Gesamtausbeute (%)	spez. Aktivität (U/mg)	Aufreinigungsfaktor
<b>Rohextrakt</b>	100	2,3	1
<b>1. PEG<sub>4000</sub>-Fällung</b>	94,2	2,6	1,1
<b>2. PEG<sub>4000</sub>-Fällung</b>	85,3	13,2	5,7
<b>Q-Sephrose FF</b>	80,5	32,1	13,9
<b>Ultrafiltration</b>	79,1	34,3	14,9
<b>5' AMP-Sephrose 4b</b>	78,2	1199	521

spezifische Aktivität von 32,1 U/mg auf 1199 U/mg gesteigert werden. Die homogen aufgereinigte recCPCR konnte bei einer Zugabe von 30 % (v/v) Glycerin bei -20 °C stabil gelagert werden.

Mit Hilfe des aufgereinigten Proteins konnten die Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung der recCPCR durchgeführt werden.

### 3.23 Biochemische Charakterisierung der recCPCR

Analog zu den Untersuchungen der wtCPCR wurden das Temperatur- und pH-Optimum, der  $K_M$ -Wert, der isoelektrische Punkt, die Masse per Massenspektrometer, sowie der Einfluß verschiedener Reagenzien auf die spezifische Aktivität des Enzyms wie auch das Substratspektrum überprüft. Darüber hinaus wurde eine N-terminale Sequenzierung des homogen aufgereinigten, rekombinanten Protein vorgenommen. Tabelle 19 faßt die Untersuchungen der recCPCR im Vergleich zur wtCPCR zusammen.

Tabelle 19 zeigt, dass bis auf das Substratspektrum die Charakteristika der recCPCR mit den bereits beschriebenen Daten der wtCPCR mit geringen Abweichungen übereinstimmt. Diese Abweichungen ergeben sich aber eher aus den Messungen, als aus signifikanten Änderungen im biochemischen Verhalten der rekombinanten Carbonylreduktase. Die Kultivierungen des pBTacrecCPCR-Klons im Batchverfahren ergaben höhere Ausbeuten an recCPCR als die HZD-Fermentation. Diese lieferte

zwar einerseits ein Vielfaches der Biomasse des JM105 Wirtsstamms, andererseits wurde jedoch keinerlei Aktivität in den Überständen der löslichen Rohextrakte detektiert.

**Tabelle 19:** Zusammenfassung der Charakteristika der recCPCR im Vergleich zur wtCPCR

1.2.1.1 Kriterium	recCPCR	wtCPCR
<b><u>Allgemeine Charakteristika</u></b>		
<b><u>Molekulargewicht</u></b>	79 kDa	79 kDa
<b><u>Untereinheiten</u></b>	39,5 kDa	39,5 kDa
<b><u>Isoelektrischer Punkt</u></b>	6,8	6,8
<b><u>Spezifische Aktivität</u></b>	1199 U/mg	1432 U/mg
<b><u>Reduktion (NADH)</u></b>		
<b><u>pH-Optimum</u></b>	7,9	7,8
<b><u>Temperaturoptimum</u></b>	37 °C	37 °C
<b><u>K<sub>M</sub>-Wert (ABEE)</u></b>	2,65 mM	2,76 mM
<b><u>Oxidation (NAD<sup>+</sup>)</u></b>		
<b><u>pH-Optimum</u></b>	9,4	9,5 [Peters, 1996]
Temperaturoptimum	52 °C	50 – 56 °C [Peters, 1996]
<b><u>Inhibitoren</u></b>		Hg <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup>
<b><u>Metallionen</u></b>	Hg <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup>	Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Sn <sup>2+</sup> [Peters, 1996]
<b><u>SH-Reagenzien</u></b>	Jodacetamid	Jodacetamid
<b><u>Chelatoren</u></b>	2,2 -Bipyridyl σ-Phenanthrolin	2,2 -Bipyridyl σ-Phenanthrolin
<b><u>Stabilität</u></b>		
ohne Zusätze	rel. instabil	rel. instabil
DTT-Zusatz	stabil	stabil
<b><u>Substratspektrum</u></b>		
Acetylbuttersäureethylester	ja	ja
2,5 Hexandion	ja	ja
MDA	ja	ja
Acetaldehyd	ja	ja
5-Oxohexansäureethylester	ja	ja
Acetophenon	nein	nein

2-Propanol Ethanol	ja ja	ja ja
<b><u>N-terminale Proteinsequenzierung</u></b>	MPEIPKTQKAVVFET SGGKLEYKDIPV	PEIPKTQKAVVFETSGGKLEYKDIPV
<b><u>Massenbestimmung</u></b>	39.536 / Monomer	39.529 / Monomer
<b><u>Stereospezifität</u></b>	(S)	(S)
<b><u>Glykosylierung</u></b>	negativ	negativ
<b><u>Gesamtzymausbeuten/ Fermentation Units/Biomasse Batch-Fermentation</u></b>  <b><u>HZD-Fermentation</u></b>	8 L: 2400 U/ 176 g Biomasse 20 L: 6856 U/ 510 g Biomasse  keine Aktivität/ 5,3 kg Biomasse	8 L: 600 U/150 g Biomasse 20 L: 1640 U/50 g Biomasse 200 L: 2740 U/6,7 kg Biomasse

Die dargestellten Analysen der recCPCR bestätigten die proteinbiochemischen Beobachtungen für die wtCPCR.

---

## 4. Schlußfolgerung und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene *CPCR* gehört zu den Biokatalysatoren, bei deren Synthesen die enzym- und substratgekoppelte Cofaktorregenerierung eingesetzt werden kann und somit eine kostengünstigere Umsetzung der Substrate gewährleistet wird. [Peters *et al*, 1993]. Aufgrund des breiten Substratspektrums der *CPCR*, ihrer Stereoselektivität wie auch die NADH-Abhängigkeit, ist die rekombinante Verfügbarkeit der in der Natur in der Hefe *Candida parapsilosis* vorkommenden Carbonylreduktase besonders interessant. Eine kommerzielle Nutzung des Enzyms wurde bisher ausgeschlossen, da das Protein nur zu 0,03 % in der Gesamtzellzusammensetzung vorkommt und unter wirtschaftlichen Aspekten nicht ausreichend zur Verfügung steht. Aus diesem Grund wurde eine Klonierung und Expression des Biokatalysators in *E.coli* angestrebt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die NADH-abhängige Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* erstmals bis zur Homogenität gereinigt und sowohl proteinchemisch als auch enzymologisch umfassend charakterisiert. Überraschender Weise war festgestellt worden, dass sich in der scharfen Bande nach der Affinitätschromatographie zwei Dehydrogenasen verbergen. Die verunreinigende Malatdehydrogenase konnte durch Gelfiltration abgetrennt werden. Durch Edman Abbau des N-Terminus im intakten Enzym wie durch eine proteolytische Spaltung und N-terminale Sequenzierung der aus dieser Spaltung erhaltenen Proteinfragmente wurden Proteinsequenzdaten erhalten, aus denen spezifische PCR-Primer abgeleitet wurden. Das *CPCR*-Gen aus *C. parapsilosis* wurde durch PCR mit genomischer DNA als Template amplifiziert, in *E.coli* kloniert, sequenziert und darüber hinaus aktiv exprimiert. Die aus dem Gen der rekombinanten Wildtyp-*CPCR* (*recCPCR*) abgeleitete Proteinsequenz konnte durch die ermittelten Proteinsequenzdaten verifiziert werden. Darüber hinaus ergab eine Gendatenbanksuche eine 85,7 % Homologie zu einer ADH I aus *Candida albicans*, die die internen Proteinsequenzen wie auch die DNA-Sequenz der *CPCR* bestätigten. Es konnte nicht eindeutig bestimmt werden, ob die *CPCR* zu den cytoplasmatischen oder zu den mitochondrialen Alkoholdehydrogenasen gehört. Entsprechend der Homologie zur ADH I aus *C. albicans* lag es nahe, dass die *CPCR* zur Klasse der cytoplasmatischen Alkoholdehydrogenasen gehört. Diese Annahme wird durch die vielen gemeinsamen Charakteristika der beiden Enzyme verstärkt. Allerdings konnte bei der Identifizierung der Proteinsequenz im

---

Gegensatz zur ADH I aus *C. albicans* kein Methionin am N-Terminus gefunden werden, so dass der Transkriptionsstart ATG (Methionin) bei der *CPCR* nicht ermittelt werden konnte. Der Grund hierfür kann zum einen eine unspezifische Prozessierung am N-terminalen Ende des Enzyms sein, die für die aktive Expression des Enzyms keine nachteilige Wirkung mit sich bringt. Weitere Homologien zu anderen ADH's der mitochondrialen Gruppe 1 machen es aber auch möglich, dass die *CPCR* ursprünglich in den Mitochondrien der Hefe lokalisiert ist und deshalb nicht über N-terminales Methionin verfügt. Das Methionin würde in diesem Fall zusammen mit einem Signalpeptid, dem sogenannten „*Matrix Targeting Signal*“ (MTS), von der „*Matrix Processing Peptidase*“ zur Translokation in das Mitochondrium vorweg abgespalten werden. Fehlt diese putative N-terminale „*Targeting*“-Sequenz, wird das Protein im Cytoplasma lokalisiert. Dies kann sich zum einen negativ auf den Stoffwechsel auswirken, zum anderen kann die Art der Expression auch zu einem höheren Expressionsniveau sowie zu einem einheitlicheren Produkt führen. Um dies zu klären, könnte das *CPCR*-Gen mit einer vorgeschalteten putativen N-terminalen Zielsequenz in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert und exprimiert werden oder mittels Southern Blot Analyse und geeigneter *CPCR*-Gensonde die komplette Gensequenz bestimmt werden. Letzteres wurde mittlerweile durchgeführt und ergab, dass die *CPCR* N-terminal mit einem Methionin beginnt und C-terminal auf Serin-Lysin (SK) endet [persönliche Mitteilung, Dr. A. Wynen]. Dies schließt aus, dass die Stabilitätsprobleme bzw. die „*Inclusion Bodies*“-Bildung von einer unvollständigen Gensequenz stammen. Allerdings ist zu beachten, dass in den Hybridisierungsversuchen als vorletzte C-terminale Aminosäure ein Serin anstelle eines durch die proteolytische Spaltung mit anschließender Sequenzierung bestimmtes Glutamin ermittelt worden ist. Dieses Serin deckt sich auch mit den homologen Sequenzen von *Saccharomyces cerevisiae* als auch mit der ADH 1 aus *C. albicans*. Das fehlerhafte Glutamin ist als Detektierschwankung bei der Edmansequenzierung zu betrachten und ist aufgrund seiner hypothetischen Position in der Struktur der *CPCR* ebenfalls nicht Auslöser der Stabilitätsproblematik.

Die *CPCR* wurde mit einer 10-fachen Steigerung der spezifischen Aktivität von 0,23 U/mg auf 2,3 U/mg im Rohextrakt mit Hilfe des Expressionsvektor pBTac2 in dem Wirtstamm *E.coli* JM 105 exprimiert. Allerdings wurden Plasmidinstabilitäten, die Bildung von „*Inclusion Bodies*“ wie auch ein Insertverlust beobachtet. In Optimierungsexperimenten wurde versucht diese negativen Effekte zu reduzieren. Hierbei

---

wurden die Kultivierungstemperatur, die Induktorkonzentration, der Induktionszeitpunkt, die Klonierung und Expression in andere Expressionssysteme wie auch verschiedene Renaturierungsbedingungen untersucht. Diese Experimente zeigten, dass für das untersuchte System die „Batch“-Kultivierung des pBTacrecCPCR-Klons bei 30 °C und einer Induktorkonzentration von 0,75 mM IPTG die am besten geeigneten Bedingungen sind.

Die Klonierung und Expression des CPCR-Gens in *E.coli* ermöglichte eine vereinfachte Reinigung des Enzyms. Die recCPCR konnte aus zellfreien Rohextrakten analog zu dem Reinigungsschemata der wtCPCR durch fraktionierte PEG<sub>4000</sub>-Fällung und anschließender Anionenaustauscher- bzw. Affinitätschromatographie gereinigt werden. Nach diesen Schritten lag die recCPCR bereits homogen vor, während für eine homogene Darstellung der wtCPCR noch ein weiterer Gelfiltrationsschritt notwendig war. Die Ausbeute an homogener recCPCR aus dem zellfreien Rohextrakt lag mit ca. 80 % über jener der wtCPCR.

Die recCPCR wurde ebenfalls ausführlich proteinchemisch und enzymologisch betrachtet und mit der wtCPCR verglichen. Bis auf Meßschwankungen bezüglich der spezifischen Aktivität (wtCPCR 1432 U/mg; recCPCR 1199 U/mg) deckten sich die proteinchemischen Daten der recCPCR mit den bereits aufgestellten Daten der Wildtypcarbonylreduktase.

Im Hinblick auf weiterführende Arbeiten steht die Optimierung der Expression für eine stabilere und aktivere recCPCR im Vordergrund und die Vermeidung der Bildung von „Inclusion Bodies“. Dies ist verbunden mit einer weiteren Auswahl von neuen Promotoren bzw. Vektorsystemen. Dabei sind vor allen Dingen solche Vektorsysteme interessant, die nicht durch IPTG induziert werden. Dazu zählt z.B. der pLEX-Expressionsvektor (Invitrogen), der den p<sub>L</sub>-Promotor enthält. Dieses Promotorelement wird durch den λ-cl-Repressor im nicht-induzierten Zustand reprimiert. Dabei steht die Expression des Repressors des *E.coli*-Wirts unter der Kontrolle des *trp*-Promotors. Die Induktion zur Expression des Zielprodukts wird über die Zugabe von Tryptophan zum Medium gesteuert, in dem die Transkription des Repressors durch Tryptophan reprimiert wird. Interessant sind auch sogenannte „Runaway-Replication“-Vektoren, bei denen die Replikation des Expressionsplasmids unter der Kontrolle eines thermoregulierbaren Promotorelements steht. Zum gewünschten Zeitpunkt kann jederzeit durch Hitzeschock die Replikation des Plasmids induziert werden. Die daraus resultierende erhöhte Kopienzahl bewirkt ohne Zugabe eines

---

Induktors wie z.B. IPTG, eine hohe Expression des Fremdgens [Kidwell, 1996]. Unter Verwendung solcher Vektorsysteme bestand z.B. bei der rekombinanten Expression einer L-Leucin-Dehydrogenase aus *Bacillus cereus* der Gesamtproteinanteil zu über 50 % aus dem Zielprotein. [Ansorge & Kula, 2000]. Darüber hinaus sind noch der durch Senkung des pH-Werts induzierbare Promotor  $P_{cadA}$  [Chou, 1995], die auf Phosphat- und/oder Glucosekonzentration des Mediums reagierenden Promotoren  $P_{phoA}$ ,  $P_{ugp}$ ,  $P_{mglB}$  und  $P_{araB}$  [Sawers & Jarsch, 1996], der von der NaCl-Konzentration abhängige Promotor  $P_{proU}$  [Sawers & Jarsch, 1996] sowie die durch Sauerstoffkonzentration des Mediums regulierten Promotoren  $P_{vnb}$  [Khosla et al, 1990],  $P_{nirB}$  [Sawers & Jarsch, 1996] und  $P_{nar}$  [Lee, 1996] zu erwähnen. Zudem ist eine Expression in eukaryotischen Expressionssystemen erstrebenswert. Vor allen Dingen eine Expression dieser ursprünglich aus einer Hefe stammenden Carbonylreduktase in einem Hefesystem ist eine naheliegende Alternative. Fakultativ methylo-trophe Hefen wie z.B. *Hansenula polymorpha* oder *Pichia pastoris* rückten in den letzten 10 Jahren immer mehr in den Vordergrund zur rekombinanten Expression von heterologen Proteinen [Faber et al., 1995; Gellissen & Veenhuis, 2001]. Mit Hilfe des *Hansenula polymorpha*-Expressionssystems konnten z.B. hohe Ausbeuten mit einem 97 %igen Anteil des Zielproteins an der Gesamtproteinzusammensetzung bei der Produktion von Phytase, einem wichtigen Enzym für die Futterindustrie, erzielt werden [Mayer et al., 1998].

Zur gezielten Verbesserung der Enzymeigenschaften, z.B. hinsichtlich der Aktivität, einer Thermo- und Lösungsmittelstabilität wird zunehmend die Methode des Protein-designs eingesetzt. In den vergangenen Jahren wurde hierfür die gerichtete Evolution („directed evolution“) als neuer kombinatorischer Ansatz beschrieben [Arnold, 1998]. Dabei werden durch molekularbiologische Methoden Enzybibliotheken erzeugt, die in Kombination mit einem Assaysystem die Identifizierung verbesserter Biokatalysatoren ermöglichen. Mit Hilfe dieser Methodik wäre eine Anpassung der recCPCR zu Umsetzungen in organischen Lösungsmitteln interessant und würde neue wirtschaftlich interessante Substratumsetzungen für die recCPCR Umsetzungen eröffnen. Darüber hinaus ist eine Kristallisierung der CPCR zur Aufklärung der Struktur und des Katalysemechanismus ein interessanter Aspekt für weiterführende Arbeiten.

---

## 5. Zusammenfassung

Dehydrogenasen stellen ideale Biokatalysatoren zur Synthese chiraler, enantiomerenreiner Substanzen aus prochiralen Vorstufen dar. Dazu gehört auch die 1992 erstmals beschriebene NADH-abhängige Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR). Wegen ihres breiten Substratspektrums, der Möglichkeit der Cofaktoregenerierung und der hohen Stereoselektivität ist die CPCR für die chemoenzymatische Synthese von Pharmaka und Agrochemikalien sehr interessant. Aufgrund des geringen Vorkommens in der Hefezelle war eine Klonierung und Expression dieses Enzyms zur schnelleren, und kostengünstigeren Verfügbarkeit unerlässlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wildtypenzym (wtCPCR) biochemisch charakterisiert und erstmals homogen dargestellt. Der N-Terminus des aufgereinigten Enzyms wurde durch Edman Abbau bestimmt und zeigte durch Datenbankvergleich eine ca. 87 % Homologie zu einer ADH 1 aus *Candida albicans*. Mit Hilfe von weiteren Peptiddaten, die aus einer proteolytischen Spaltung der wtCPCR stammen, konnten sowohl der C-Terminus als auch weitere interne Sequenzen des Biokatalysators bestimmt werden. Darüber hinaus wurde die Homologie zu der ADH I aus *C. albicans* weiter bestätigt. Mit Hilfe dieser Sequenzen konnte das recCPCR-Gen amplifiziert, sequenziert, kloniert und aktiv mit dem Expressionsvektor pBTac2 in dem Wirtstamm *E.coli* JM105 exprimiert werden. Die spezifische Aktivität des rekombinanten Enzyms steigerte sich um das 10fache im Vergleich zu der wtCPCR von ca. 0,23 U/mg auf 2,3 U/mg, gemessen im aufgeschlossenen Rohextrakt. Die weitere Charakterisierung zeigte, daß die CPCR den *medium chain* Dehydrogenasen zuzuordnen ist und analog der Pferdeleber-ADH dem *Bi-Bi*-Reaktionsmechanismus folgt. Das Enzym besitzt vermutlich keine Disulfidbrücken und ist nicht glykosyliert. Die rekombinante Form zeigt die gleichen biochemischen und enzymologischen Eigenschaften wie die wtCPCR. Es wurden Plasmidinstabilitäten der recCPCR-Klone in *E.coli* beobachtet. Durch verschiedene Optimierungen wie Überprüfung der Kulturbedingungen, Bestimmung der optimalen Induktorkonzentration des Expressionssystems wie Induktionszeitpunkt und Verwendung anderer Expressionssysteme bzw. Expressionsstämme, konnten diese Beeinträchtigungen nicht aufgehoben werden. Darüber hinaus liegt ein gewisser Anteil der recCPCR in Form von unlöslichen Proteinaggregaten, sogenannten „*Inclusion Bodies*“ vor, die trotz verschiedener Renaturierungsversuche nicht in ihre aktive Form zurückgeführt werden konnten. Durch Batch-Kultivierungen konnten pro 20 L Kultivierungsansatz ca. 350 U/L recCPCR erhalten werden. HZD-Fermentationen führten zu einem hohen Anteil an *E.coli*-Biomassen von 5,3 kg in einem 15 L Kultivierungsansatz. Allerdings konnte mit Hilfe dieser Kultivierungstechnik keine aktive recCPCR produziert werden.

---

## 6. Literatur

Aaij C. and Borst P. [1972]

The gel electrophoresis of DNA.

Biochem.Biophys.Acta, 269, 192-200

Ahnen DJ., Santiago NA., Cezard JP. and Gray GM. [1982]

Intestinal aminooligopeptidase. In vivo synthesis on intracellular membranes of rat jejunum.

J Biol Chem; 257, 20, 12129-35

Altschul SF, Bundschuh R, Olsen R, Hwa T [2001]

The estimation of statistical parameters for local alignment score distributions.

Nucleic Acids Res, 15; 29 (2):351-61

Ansorge MB. and Kula MR. [2000]

Production of recombinant L-leucine dehydrogenase from *Bacillus cereus* in pilot scale using the runaway replication system *E. coli*[pIET98].

Biotechnol Bioeng; 5;68(5):557-62

Arnold FH. [1998]

When blind is better: protein design by evolution.

Nat Biotechnol:16(7):617-8

Arnold LJ., You K., Allison WS. and Kaplan NO. [1976]

Determination of the hydride transfer stereospecificity of nicotinamide adenine dinucleotide linked oxidoreductases by proton magnetic resonance.

Biochemistry, 15: 4844-4849

Ashford, Langeron & Talice [1932]

in Barnett, JA., Payne, RW. and Yarrow D. [1979]

A guide to identifying and classifying yeasts.

Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne

Atha DH. and Ingham KC. [1981]

Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume.

J Biol Chem, 256,(23, 12108-17

Balbas P. and Bolivar F. [1990]

Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*.

Methods Enzymol.: 185, 14-37

Banaszak LJ. [1966]

Malate dehydrogenases: crystallographic properties of the soluble heart enzymes.

J Mol Biol, 28;22 (2):389-91

- 
- Barnett JA., Payne RW. and Yarrow D. [1979]  
A guide to identifying and classifying yeasts.  
Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne
- Baumann, M. [1990]  
Comparative gas phase and pulsed liquid phase sequencing on a modified Applied Biosystems 477A sequencer.  
Anal Biochem, 190, 2, 198-208
- Bell JK. , Yennawar HP., Wright SK., Thompson JR., Viola RE. and Banaszak LJ [2001]  
Structural analyses of a malate dehydrogenase with a variable active site  
J Biol Chem, 1 [in press]
- Bertram G., Swoboda RK., Gooday GW., Gow NA and Brown AJ. [1996]  
Structure and regulation of the *Candida albicans* ADH 1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase.  
Yeast.: 12 (2), 115-127
- Biot JP. [1815]  
"On the asymmetry of naturally occurring organic compounds,"  
The Foundation of Stereochemistry: Memoirs by Pasteur, Van't Hoff, Le Bel and Wislicenus  
Richardson, G. M., trans. and ed., American Book Co., New York
- Birktoft JJ., Fu Z., Carnahan GE., Rhodes G., Roderick SL. and Banaszak LJ. [1989]  
Comparison of the molecular structures of cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenase.  
Biochem Soc Trans;17 (2):301-4
- Birnboim H. C. and Doly J. [1979]  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.Nucleic Acids Res 7 (6):  
1513-23
- Biselli M., Kragl U. and Wandrey C. [1995]  
Reaction engineering for enzyme-catalized Biotransformations.  
Kap. A4 in Drauz K. and Waldmann H. (Editor)  
Enzyme Catalysis in Organic Chemistry, VCH-Weinheim
- Blaich R. [1978]  
Analytische Elektrophoreseverfahren  
Thieme, Stuttgart
- Blum H., Beier H. and Gross H. [1987]  
Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.  
Electrophoresis, 8, 93-99
- Böhni PC., Gasser S., Leaver C. and Schatz G. [1980]  
The organization and expression of the mitochondrial genome.  
Eds. Kroon, AM. and Saccone, C. (Elsevier/North Holland, Amsterdam, 423-433)

- 
- Bolivar F., Rodriguez RL., Betlach MC. and Boyer HW. [1977]  
Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9  
Gene: 2(2):75-93
- Bommarius AS., Schwarm M. and Drauz K. [1998]  
Biocatalysis to amino acid based chiral pharmaceuticals-examples and perspectives.  
J.Mol.Catal.B, 5, 1-11
- Bommarius AS., Schwarm M., Stingl K., Kottenhahn M., Huthmacher K. and Drauz K. [1995]  
Synthesis and use of enantiomerically pure *tert*-leucine.  
Tetrahedron: Asymmetry, 6 (12), 2851-2888
- Bommarius AS. and Drauz K. [1994]  
An enzymatic route to L-ornithine from arginine--activation, selectivity and stabilization of L-arginase.  
Bioorg Med Chem;2 (7):617-626
- Bradford MM. [1976]  
A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.  
Anal. Biochem, 72, 248-254
- Bradshaw CW., Shen GJ. and Wong CH. [1991]  
Bioorg.Chem., 19, 398-405
- Bränden CI., Jörnvall H., Eklund H. and Furugren B. [1975]  
Alcohol dehydrogenases. In: Boyer PD.  
The Enzyme Vol Xioxidation-Reduction Part A.  
Academic Press NY, 103-190
- Braun HP., Emmermann M., Kruff V. and Schmitz UK: [1992]  
The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrom c reductase of the respiratory chain.  
EMBO J: 11 (9), 3219-27
- Bullock WO., Fernandez JM. and Short JM. [1987]  
BioTechniques 5, 376-381
- Burton DR. [1993]  
Monoclonal antibodies from combinatorial libraries.  
Acc.Chem.Res.: 26 (8), 405-411
- Calvin NM. and Hanawalt PC.  
High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation.  
J Bacteriol., 170 (6):2796-2801
- Carrea G. and Riva S. [1986]  
Applications of cofactor dependent enzymes in organic synthesis.  
Chimica Oggi: 3, 17-21

- 
- Caulcott CA., Lilley G., Wright EM., Robinson MK. and Yarranton GT. [1985]  
Investigation of the instability of plasmids directing the expression of Met-prochymosin in *Escherichia coli*.  
J Gen Microbiol:131 ( Pt 12):3355-65
- Chenault HK. And Whitesides GM. [1987]  
Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis.  
Appl. Biochem. Biotechnol., 14, 147-197
- Chou CH., Bennett GN. and San KY. [1994]  
Effect of modulated glucose uptake on high-level recombinant protein production in a dense *Escherichia coli* culture.  
Biotechnol Prog:10(6):644-7
- Clark DP [1989]  
The fermentation pathways of *E.coli*.  
FEMS Microbiol. Rev., 63, 223-234
- Cleland WW. [1963]  
The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I.Nomenclature and rate equations.  
Biochim. Biophys. Acta, 67, 104-137
- Cline J., Braman JC and Hogrefe HH. [1996]  
PCR fidelity of pfu polymerase and other thermostable DNA polymerase.  
Nucleic Acids Res.: 15, 24 (18), 3546-51
- Creighton T.E. [1989]  
Disulfid Bounds between Cystein Residues.  
Protein Structure, Oxford, IRL
- Cunningham BC., Bass S., Fuh G. and Wells JA. [1990]  
Tinc-mediation of the binding of human growth hormone to the human prolactin receptor.  
Science: 250, 1709-1712
- Dale DC. [1994]  
Hematopoietic growth factors. Commentary.  
Curr Opin Hematol:1(3):177-9
- Davies J. and Jones JB. [1979]  
Enzymes in organic synthesis: 16 heterocyclic ketones as substrates of horse liver alcohol dehydrogenase. Stereospecific reductions of 2-substituted tetrahydrothiopyran-4-ones.  
J.Am.Chem.Soc.: 101, 5405-10
- Dean PDG., Johnson WS. and Middle FA. [1985]  
Affinity chormatography.  
A practical approach, Oxford, IRL Oxford Press
- De Boer HA. and Comstock JL. [1983]

---

The tac promotor: a functional hybrid derived from the trp and the lac promoters.

Proc.Natl.Acad.Sci USA: 80 (1), 21-25

Dickinson FM. And Daziel K. [1967]

Substrate specificity and stereospecificity of alcohol dehydrogenase.

Nature: 241 (83), 31-33

Dodds DR and Jones JB. [1988]

Enzymes in organic synthesis. Preparations of enantiomerically pure chiral hydroxydecalones via stereospecific horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed reductions of decalindiones.

J.Am.Chem.Soc.: 110, 577-583

Drauz K. and Waldman H. [1996]

Enzyme catalysis inorganic synthesis.

VCH, Weinheim

Edman P. [1956]

On Mechanism of Phenyl Isothiocyanate Degradation of Peptides.

Acta Chem.Scand 10: 761-768

Edman P. and Begg G. [1967]

A protein sequenator.

Eur J Biochem 1(1): 80-91

Eklund H., Nordström B., Zepezauer E., Söderlund G., Ohlson I., Boiwe T., Söderberg BO., Tapla O. and Bränden Cl. [1976]

Three dimensional structure of horseliver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution.

J.Mol.Biol.: 102, 27-59

Emmermann M., Braun HP., Arretz M. and Schmitz UK. [1993]

Characterization of the bifunctional cytochrome c reductase-processing peptidase complex from potato mitochondria.

J.Biol.Chem.: 5, 268 (25), 18936-42

Faber K. [1997]

Biotransformation in organic chemistry.

Springer Verlag, Berlin

Faber KN., Harder W. , Ab G. and Veenhuis M. [1995]

Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins.

Yeast: 11(14):1331-44

Ferbeyre G., Villareal A. and Morales J. [ 1993]

A rapid procedure for preparing high molecular weight DNA from yeast for Southern analysis.

Biotechniques 14 (3): 386

Fonds der Chemischen Industrie [2001]

Chemie heute-Das Wissenschaftsmagazin des Fonds der Chemischen Industrie

---

Flaman JM., Frebourg T., Moreau V, Charbonnier F., Martin C., Ishioka C., Friend SH. and Iggo R. [1994]

A rapid PCR fidelity assay.

Nucleic Acids Res.: 1, 22 (15), 3259-60

Fleet GW., Ramsden NG., Nash RJ., Fellows LE., Jacob GS., Molyneux RJ., di Bello IC. and Winchester B. [1990]

Synthesis of the enantiomers of 6-epicastanospermine and 1,6-diepicastanospermine from D- and L-gulonolactone.

Carbohydr.res.: 19 (205), 269-282

Fry, AJ., Sobolov, SB., Leonida, MD. And Voivodov, KI. [1984]

Electroenzymatic synthesis (regeneration of NADH coenzyme): Use of nafion ion exchange films for immobilization of enzyme and redox mediator.

Tetrahedron, 35 (31), 5607-5610

Ganzhorn AJ., Green DW., Hershey AD. And Gould RM. [1987]

Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenase.

J.Biol.Chem.: 262, 5446-5454

Geli V. [1993]

Functional reconstitution in *Escherichia coli* of the yeast mitochondrial matrix peptidase from its two inactive subunits.

Proc.Natl.Acad.Sci.: 1, 90 (13), 6247-51

Gellissen G. and Veenhuis M. [2001]

The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: its use in fundamental research and as a cell factory.

Yeast::18(3):i-iii

Gemballa G. [1993]

Der dreifache Skandal. 30 Jahre nach Contergan.Eine Dokumentation.

Luchterhand Literaturverlag, Hamburg

Gould RM. and Plapp BV. [1990]

Substitution of arginine for histidine-47 in the coenzyme binding site of yeast alcohol dehydrogenase I.

Biochemistry, 12;29(23):5463-8

Goward CR. and Nicholls DJ. [1994]

Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis.

Protein Sci ;3(10):1883-8

Godfrey T. and West S., [1996]

Industrial Enzymology.

Macmillan Publishers Ltd., Basingstoke Hampshire, UK

- 
- Grisshammer R. and Tate CG. [1995]  
Overexpression of integral membrane proteins for structural studies.  
Q Rev Biophys;28 (3):315-422
- Gultekin H. and Heermann KH. [1988]  
The use of polyvinylidene difluoride membranes as a general blotting matrix.  
Anal Biochem, 172,2, 320-9
- Habermann E. [1994]  
Education in pharmacology: Comments from E. habermann, University of Gießen, Germany.  
Trends Pharmacol.Sci.: 15 (1), 17-19
- Hanahan, D. [1983]  
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.  
J Mol Biol 166 (4): 557-80
- Hauri, HP. and Bucher, K. [1986]  
Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution.  
Anal Biochem, 159, 2, 386-9
- Hawlotschek G., Schneider H., Schmidt B., Tropschug M., Hartl FU. and Neupert W. [1988]  
Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein.  
Cell, 3;53(5):795-806
- Helling, RB., Goodman, HM. and Boyer, HW. [1974]  
Analysis of R-Eco RI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis.  
J. Virol., 14, 1235-1244
- Hummel, W. [1999]  
Large-scale application of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments.  
TIBTECH, 17, 487-492
- Hummel, W. [1997]  
New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds.  
Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 58:145-84
- Hummel W. [1990]  
Reduction of acetophenone to R (+) phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*.  
Appl. Microbiol.Biotechnol., 34, 15-19
- Hummel, W. and Kula, MR. [1989a]  
Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds.  
Eur.J.Biochem, 184, 1-13

- 
- Hummel, W. and Kula, MR. [1989b]  
Simple method for small scale disruption of bacteria and yeasts.  
J. Microbiol. Meth., 9, 201-209
- Hummel W., Schütte H. and Kula MR. [1988]  
D (-) mandelic acid dehydrogenase from *Lactobacillus curvatus*.  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 433-439
- Hummel W., Neiss N. and Kula MR., [1984]  
Isolation and characterization of a bacterium processing L-phenylalanine dehydrogenase activity.  
Arch. Microbiol., 137, 47-52
- Janssen DB., Jager D. and Witholt B. [1987]  
Degradation of n-haloalkanes and alpha, omega-dihaloalkanes by wild-type and mutants of *Acinetobacter* sp. strain GJ70.  
Appl Environ Microbiol;53(3):561-6
- Jensen PR. and Michelsen O. [1992]  
Carbon and energy metabolism of atp mutants of *Escherichia coli*.  
J Bacteriol:174(23):7635-41
- Jörnvall, H., Persson, B. and Jeffery, J. [1987]  
Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenase. The zinc-containing, long chain alcohol dehydrogenases.  
Eur.J.Biochem., 167, 195-201
- Jörnvall H., Eklund H. and Bränden Cl. [1978]  
Subunit confirmation of yeast alcohol dehydrogenase.  
J.Biol.Chem., 253, 8414-8419
- Keinan, E., Seth, KK. and Lamed, RJ. [1987]  
Synthetic applications of Alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii*.  
Enzyme Eng., 8, Ann. NY Acad. Sciences, 501, 130-150
- Khosla C., Curtis JE., DeModena J., Rinas U. and Bailey JE. [1990]  
Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*.  
Biotechnology (N Y): 8(9):849-53
- Kiefhaber T., Rudolph R., Kohler HH. and Buchner J. [1991]  
Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation.  
Biotechnology (N Y): 9(9):825-9
- Klinman, JP. [1972]  
The mechanism of enzyme-catalyzed reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent reductions.  
J.Biol.Chem., 247, 7977-7987
- Kniep, B. and Muhlradt, PF. [1990]

---

Immunochemical detection of glycosphingolipids on thin-layer chromatograms.

Anal Biochem, 188, 1, 5-8

Knorre WA., Deckwer WD., Korz D., Pohl HD., Riesenberg D., Ross A., Sanders E. and Schulz V. [1991]

High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* with computer-controlled optimal growth rate.

Ann N Y Acad Sci: 27;646:300-6

Knowles, JR. [1991]

Enzyme catalysis: not different, just better.

Nature 350 (6314): 121-124

Kopetzki E., Schumacher G., and Buckel P. [1989]

Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions.

Mol Gen Genet: 216(1):149-55

Kowit JD. and Maloney J. [1982]

Protein cleavage by boiling in sodium dodecyl sulfate prior to electrophoresis.

Anal Biochem, 123(1), 86-93

Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W. and Wandrey, C. [1996]

Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example.

Biotechnol. Bioeng., 52, 309-319

Kragl, U., Vasic-Racki, D. and Wandrey, C. [1992]

Kontinuierliche reaktionsführung mit löslichen Enzymen.

Chem. Ing. Tech., 64 (6), 499-509

Kubo, K. [1995]

Variability in heat-induced fragmentation of a protein in the presence of dodecyl sulfate: the role of an intramolecular sulfhydryl/disulfide exchange.

J Biochem, 118(6), 1112-7

Kula, M.-R. and Kragl, U. [2000]

Dehydrogenases in the Synthesis of Chiral Compounds Catalyst for the Synthesis of Chiral 2-Hydroxy Ketones.

Stereoselective Biocatalysis, (R.N. Patel, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 839-866

Kula, MR. and Wandrey, C. [1987]

Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NADH regeneration.

Methods Enzymol., 136, 9-21

- 
- Kyhse-Andersen, J. [1984]  
Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from PAA to nitrocellulose.  
J. Biochem. Biophys. Methods, 10, 203-209
- Ladisch, MR. and Kohlmann KL. (1992)  
Recombinant human insulin.  
Biotechnol. Prog. 8 (6): 469-478
- Lämmli, UK. [1970]  
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature, 227, 680-685
- Lamed, RJ. and Zeikus, JG. [1981]  
Novel NADP-linked alcohol-aldehyde/ketone oxidoreductase in thermophilic ethanologenic bacteria.  
Biochem. J., 195, 183-190
- Landwall P. and Holme T. [1977]  
Influence of glucose and dissolved oxygen concentrations on yields of *Escherichia coli* B in dialysis culture.  
J Gen Microbiol;103(2):353-8
- Le Bel A., [1874]  
"On the asymmetry of naturally occurring organic compounds,"  
The Foundation of Stereochemistry: Memoirs by Pasteur, Van't Hoff, Le Bel and Wislicenus Richardson, G. M., trans. and ed., American Book Co., New York
- Lee SY., Choi J. and Wong HH. [1999]  
Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review.  
Int J Biol Macromol: 25(1-3):31-6
- Lehninger, AL. [1987]  
Biochemie, 2. Auflage.  
VCH-Weinheim, S. 272
- Leong, MM., Fox, GR. [1988]  
Enhancement of luminol-based immunodot and Western blotting assays by iodophenol.  
Anal Biochem, 172, 1, 145-50
- Leong, MM., Milstein, C. and Pannell, R. [1986]  
Luminescent detection method for immunodot, Western, and Southern blots.  
J Histochem Cytochem, 34, 12, 1645-50
- Leube, RE., Kaiser, P., Seiter, A., Zimbelmann, R., Franke, WW., Rehm, H., Knaus, P., Prior, P., Betz, H. and Reinke, H. [1987]  
Synaptophysin: molecular organization and mRNA expression as determined from cloned cDNA.  
Embo J, 6, 11, 3261-8

- 
- Liese, A.; Seelbach, K. and Wandrey, C. [2000]  
Industrial Biotransformations  
WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- Liese A. and Filho MV. [1999]  
Production of fine chemicals using biocatalysis.  
Curr. Opin. Biotechnol., 10 (6), 595-603
- Liese A., Zelinski T. Kula MR. and Wandrey C. [1997]  
A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones.  
J. Mol. Cat.: B: Enzymatic: 110, 1-9
- Lind, P. and D. Eaker [1982]  
Amino-acid sequence of the alpha-subunit of taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*).  
Eur J Biochem 124 (3): 441-7
- Livermore DM. and Brown DF. [2001]  
Detection of beta-lactamase-mediated resistance.  
J Antimicrob Chemother: 48 Suppl 1:59-64
- Lundberg KS., Shoemaker DD., Adams MW., Short JM., Sorge JA. and Mathur EJ. [1991]  
High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*.  
Gene: 1;108(1): 1
- MacLeod R., Prosser H., Fikentscher L., Lanyi J. and Mosher HS. [1964]  
Asymmetric reductions XII: Stereoselective ketone reductions by fermenting yeast.  
Biochemistry: 3, 838-846
- Magonet E., Hayen P., Delforge D., Delaive E., and Remacle J. [1992]  
Importance of the structural zinc atom for the stability of yeast alcohol dehydrogenase.  
Biochem J: 15;287 ( Pt 2):361-5
- Marcinowski S. and Grisebach H. [1978]  
Enzymology of lignification. Cell-wall bound beta-glucosidase for coniferin from spruce (*Picea abies*) seedlings.  
Eur J Biochem: 1;87(1):37-44
- Matsudaira, P. [1987]  
Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene fluoride membranes.  
J. Biol. Chem., 262, 10035-10038
- Mayer AF., Hellmuth K., Schlieker H., Lopez-Ulibarri R., Oertel S., Dahlems U., Strasser AWM. And van Loon APGM. [1998]  
An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*.  
Biotechnol. Bioeng.: 63 (3), 374-381

- 
- Merril, CR. [1990]  
Gel Staining Techniques.  
Methods Enzymol, 182, 477-488
- Mullis, KB. and Faloona, FA. [1987]  
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.  
Methods Enzymol, 155, 335-50
- Nakazaki M., Chikamatsu H. and Taniguchi M. [1982]  
Horse liver alcohol dehydrogenase (HLADH) mediated chemicoenzymatic asymmetric synthesis of (+) twistanone from cis-decalin-2,7-dione.  
Chem.Lett.:1761-1764
- Neubauer P., Ahman M., Tornkvist M., Larsson G. and Enfors SO [1995]  
Response of guanosine tetraphosphate to glucose fluctuations in fed-batch cultivations of *Escherichia coli*.  
J Biotechnol:15;43(3):195-204
- Nielson K., Braman JC. and Kretz K. [1995]  
High fidelity long PCR amplifications with pfu DNA polymerase.  
Strategies in Mol. Biol.: 8, 26-31
- Nielsen, B. and Brown, L. [1984]  
The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels.  
Anal Biochem, 141, 311-315
- Odds FC. [1988]  
Candida and Candidosis. A review and biography.  
2<sup>nd</sup> edn. Baillire Tindall, London
- O'Farrell, PH. [1975]  
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.  
J Biol Chem 250 (10): 4007-21
- O'Farrell, PZ. and Goodman, H. M. [1977]  
High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins.  
Cell 12 (4): 1133-41
- Persson B., Zigler JS. Jr and Jornvall H. [1994]  
A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase enoyl reductases, VAT-1 and other proteins.  
Eur J Biochem:15;226(1):15-22
- Peters, J.Minuth, T.Kula, M. R., [1993]  
A novel NADH-dependent carbonyl reductase with an extremely broad substrate range from *Candida parapsilosis*: purification and characterization.  
Enzyme Microb: Technol, 15, 11, 950-8

- 
- Peters, J., Zelinski, T., Minuth, T. and Kula, M.R. [1993]  
Synthetic application of the carbonyl reductases isolated from *Candida parapsilosis* and *rhodococcus erythropolis*.  
Tetrahedron: Asymmetry, 4, 7, 1683-1692
- Peters, J., Minuth, T. and Kula, M.R. [1993]  
Kinetic and mechanistic studies of a novel carbonyl reductase isolated from *Candida parapsilosis*.  
Biocatalysis, 8, 31-46
- Phillips, TA., Van Bogelen RA.. and Neidhardt FC. [ 1984]  
lon gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein.  
J Bacteriol 159 (1): 283-7
- Plapp BV., Ganzhorn AJ., Gould, RM., Green DW. and Hershey AD. [1990]  
Catalysis by yeast alcohol dehydrogenase.  
In: Werner H. (edt.) Enzymology and Molecular Biology of carbonyl Metabolism: Plenum Press NY, 241-251
- Pohl, T. [1990]  
Concentration of proteins and removal of solutes.  
Methods Enzymol, 182, 68-83
- Poppe L., Stuike-Prill R., Meyer B., and van Halbeek H. [1992]  
The solution conformation of sialyl-alpha (2----6)-lactose studied by modern NMR techniques and Monte Carlo simulations.  
J Biomol NMR;2(2):109-36
- Prelog V. [1964]  
Specification of the stereospecificity of some oxidoreductases by diamond lattice sections.  
Pure Appl. Chem.: 9, 119-130
- Prussak, CE., Almazan, MT., Tseng, BY. [1989]  
Peptide production from proteins separated by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.  
Anal Biochem, 178, 2, 233-8
- Rabilloud, T. [1992]  
A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains.  
Electrophoresis 13 (7): 429-39
- Rämsch, C., Kleinlanghorst LB. Knieps EA., Thommes J. and Kula MR. [2000]  
Aqueous two-phase systems containing urea: influence of protein structure on protein partitioning.  
Biotechnol Bioeng. 5 (69 (1): 83-90
- Rapp P. and Backhaus S., [1992]  
Enzyme Microb. Technol., 14, 938

- 
- Reha-Krantz, L.J. [1985]  
The Escherichia coli strain JM105 contains partial supE activity.  
Gene; 38 (1-3):275-6
- Reid, MF. And Fewson, CA. [1994]  
Molecular Characterization of microbial Alcohol Dehydrogenase.  
Crit. Rev. Microbiol., 20, 13-56
- Riesenberg D., Menzel K., Schulz V., Schumann K., Veith G., Zuber G. and Knorre WA. [1990]  
High cell density fermentation of recombinant Escherichia coli expressing human interferon alpha 1.  
Appl Microbiol Biotechnol; 34(1):77-82
- Rissom S. and Kragl U. [2001].  
Approaches to the recycle of cofactors  
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, accepted
- Rissom S., Beliczey J., Griffels G., Kragl U. and Wandrey C. [1999]  
Asymmetric reduction of acetophenone in membrane reactors: comparison of oxazaborolidine and alcohol dehydrogenase catalyzed processes.  
Tetrahedron. Asymmetry: 10, 923-928
- Rissom S. [1999]  
Membranverfahren für Redoxenzyme - Gasversorgung, Reaktion, Produktextraktion  
Dissertation, Universität Bonn
- Roberts, RJ. and Macelis, D. [2000]  
REBASE - restriction enzymes and methylases.  
Nucleic Acids Res 28 (1): 306-7
- Robson B. and Garnier j. [1988]  
The special case of metalloproteins.  
In: Introduction to proteins and protein engineering.  
Elsevier: 195-224
- Rodenbrock A., Selber K., Egmond MR., and Kula MR. [2000]  
Extraction of peptide tagged cutinase in detergent-based aqueous two-phase systems.  
Bioseparation;9 (5):269-76
- Rossmann, MG., Liljas, A., Bränden, Cl. And Banaszak, LJ. [1975]  
Evolutionary and Structural Relationship among Dehydrogenases. In: Boyer PD. (ED),  
The Enzymes Vol. XI Oxidation-Reduction, Academic Press, NY, 62-102
- Rossomando, EF. [1990]  
Ion-exchange chromatography.  
Methods Enzymol, 182, 309-17
- Rudolph, R. and Lilie, H. [1996]  
In vitro folding of inclusion body proteins.  
Faseb J, 10, 1, 49-56

- 
- Rychlik, W., Spencer, WJ. and Rhoads, RE. [1990]  
Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro.  
Nucleic Acids Res., 18, 21, 6409-12
- Rychlik W. and Rhoads RE. [1990]  
A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization sequencing. An *in vitro* amplification of DNA.  
Nucleic Acids Res.: 17, 8543-8551
- Saiki, R K., Gelfand, DH., Stoffel, S., Scharf, SJ., Higuchi, R., Horn, GT., Mullis, KB. and Erlich, HA. [1988]  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.  
Science, 239, 4839, 487-91
- Santos MA., Keith G., and Tuite M.[1993]  
Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon.  
EMBO J.;12(2):607-16
- Sambrook, JEF., Fritsch EF. and Maniatis, T. [1989]  
Molecular cloning - a laboratory manual.  
Cold Spring Harbor Laboratory Press(2)
- Sawers G. and Jarsch M. [1996]  
Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*.  
Appl Microbiol Biotechnol: 46(1):1-9
- Schägger, H. and G. Jagow [1991]  
Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form.  
Anal. Biochem. 199: 223-231
- Schratter, P. [1996]  
Purification and concentration by ultrafiltration.  
Meth. Mol. Biol., 59, 115-134
- Schubert T., Kula MR. and Müller M. [1999]  
Chemoenzymatic synthesis of (S)-8-O-methylmellein by *Candida parapsilosis* carbonyl reductase.  
Synthesis: 12, 2045-2048
- Schütte H., Flossdorf J, Sahm H. and Kula MR. [1976]  
Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase from *Candida boidinii*.  
Meth.Enzym.: 89, 527-531
- Schütte, H., Flossdorf, J., Sahm, H. and Kula, MR. [1976]  
Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase from *Candida boidinii*.  
Eur.J.Biochem, 62, 151-160
- Seelbach K., Riebel B., Hummel W., Kula MR., Tishkov V., Egorov AM., Wandrey C. and Kragl U. [1996]

---

A novel regenerating method of NADP(H) using a new formate dehydrogenase.

Tetrahydron Lett.: 37 (9), 1377-1380

Shen, HD., Choo, KB., Lee, HH., Hsieh, JC., Lin, WL., Lee, WR. and Han SH. [1991]

The 40 kilodalton allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies.

Clin. Exp. Allergy, 21, 675-681

Shieh WR. [1987]

Purification and studies on the  $\beta$ -ketoesterreductase from baker's yeast.

Available on university microfilms. Int. Order No. DA 8712440, 136-248

Siuzdak, G. [1996]

Massspectrometry for Biotechnology.

San Diego, Academic Press

Southern, EM. [1975]

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J Mol Biol, 98, 3, 503-17

Stader J. [1995]

Gene expression in recombinant *Escherichia coli*.

Bioprocess Technol: 22:1-51

Steffan JS., Minard KI. and McAlister-Henn L. [1992]

Expression and function of heterologous forms of malate dehydrogenase in yeast.

Arch Biochem Biophys, 14:293 (1):93-102

Steffan JS. and McAlister-Henn, L. [1992]

Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH3 isozyme of malate dehydrogenase.

J Biol Chem, 5:267 (34):24708-15

Stinson, RA. [1993]

Kinetic parameters for the cleaved substrate, and enzyme and substrate stability, vary with the phosphoacceptor in alkaline phosphatase catalysis.

Clin Chem; 39 (11 Pt 1):2293-7

Studier, FW. [1991]

Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system.

J Mol Biol 219 (1): 37-44

Stueber D. and Bujard H. [1982]

Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes.

EMBO J;1(11):1399-404

Suzuki T., Ueda T., Ohama T., Osawa S. and Watanabe K. [1993]

The gene for serine tRNA having anticodon sequence CAG in a pathogenic yeast, *Candida albicans*.

---

Nucleic Acids Res.: 21 (2), 4039-4045

Sutcliffe JG.

Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol:43 Pt 1:77-90

Thömmes J. [1997]

Fluidized bed adsorption as a primary recovery step in protein purification.

Adv. Biochem. Eng. Biotechnol, 58, 185-230

Vallee BL. and Auld DS. [1990]

Active-site zinc ligands and activated H<sub>2</sub>O of zinc enzymes.

Proc Natl Acad Sci U S A: 87(1):220-4

Vieira, J. and Messing J. [1982]

The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.

Gene 19 (3): 259-68

Vogelstein B. and Gillespie D. [1979]

Preparative and analytical purification of DNA from agarose.

Proc Natl Acad Sci U S A;76 (2):615-9

Ward OP. and Young CS. [1990]

Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeast.

Enzyme Microb Technol: 12(7):482-93

Weiss, B., Jacquemin-Sableu, A., Live, TR., Fareed, GC. and Richardson, CC. [1968]

Enzymatic breakage and joining of desoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with Bacteriophage T4.

J.Biol. Chem., 253, 2483-2495

Wichmann R., Wandrey C., Buckmann AF. and Kula MR. [2000] and [1981]

Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration.

Reprinted from Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIII. 12, 2789-2802

Widdel, F. and Wolfe, RS [1989]

Expression of secondary alcohol dehydrogenase in methanogenic bacteria and purification of the F specific enzyme from methanogenium thermophilium strain TCI.

Arch. Microbiol. 125, 322-328

Wilcox G. and Studnicka GM. [1988]

Expression of foreign proteins in microorganisms.

Biotechnol Appl Biochem: 10(6):500-9

Wingard LB. Jr., Schiller JG., Wolfson SK. Jr., Liu CC., Drash AL. and Yao SJ. [1979]

Immobilized enzyme electrodes for the potentiometric measurement of glucose concentration: immobilization techniques and materials.

---

J. Biomed. Mater. Res.;13 (6):921-35

Wong Ch. and Whitesides GM. [1981]

Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H cofactor regeneration by using glucose-6-phosphate and the glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*.

J Am.Chem.Soc.: 103, 4890-4899

Yang MJ., Geli V., Oppliger W., Suda K., James P. and Schatz G. [1991]

The MAS-encoded processing protease of yeast mitochondria. Interaction of the purified enzyme with signal peptides and a purified precursor protein.

J Biol Chem: 5;266(10):6416-23

Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing J. [1985]

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.

Gene 33 (1): 103-19

Zelinski T. [1995]

Enantioselektive Reduktion von Ketonen mit neuen NAD(H)-abhängigen Oxidoreduktasen.

Dissertation: Universität Düsseldorf

Zelinski T. and Kula MR. [1994]

A kinetic study and application of a novel carbonyl reductase isolated from *Rhodococcus erythropolis*.

Bioorg Med Chem: 2(6):421-8

Zurita M., Bolivar F. and Soberon X. [1984]

Construction and characterization of new cloning vehicles. VII. Construction of plasmid pBR327par, a completely sequenced, stable derivative of pBR327 containing the par locus of pSC101.

Gene: 28(1):119-22

---

## 7. Anhang

Der Anhang ist nach den jeweiligen Kapitel gegliedert.

1.2.2	Kapitel 2.4.2, S. 46	Verwendete Primer
pUC18MBCPCR	5'CCAGAGATTCCAAAGACTCAGAAGGCTGTT3'	
pUC18MBACPCR	5'TTTTTGAGTATCCAAAACGTATCT3'	
MBCPCR2	5'CGAATTCATGCCAGAGATTCCAAAGACTCAGAAGGCTGTT3'	
MBCPCR7	5'GCACCTGCAGTTATTTTTGAGTATCCAAAACGTATCT3'	
MBS1	5'CCAGAGATTCCAAAACTCAAAAAGCTGTTGTT3'	
MBASO3	5'ACT(C)AAT(C)GGTCAATTGGTT(C)TAC(T)AAA(G)GAT3'	
PETMBCPCR	5'CCGAGCCATGGCAGAGATTCCAAAGACTCA3'	
PETMBACPCR	5'CGCACTCGAGTTATTTTTGAGTATCCAAAACGTATC3'	
TRCMBCPCR	5'CGCACTCGAGTTATTTTTGAGTATCCAAAACGTATC3'	

### Kapitel 2.4.11.2, S. 52 *SureClone*-Kit-Klonierungsansätze

#### Blunting-Kinasereaktion

PCR-Produkt	1 – 16 µL
Klenow-Fragment	1 µL
10fach Kinasepuffer	2 µL
Polynukleotidkinase	1 µL
<u>Aq.dest.</u>	<u>auf 20 µL</u>
	20 µL

#### 1.3 Ligationsreaktion

Produkt aus der Kinasereaktion	2 µL
50 ng des dephosphorylierten Vektors	1 µL
2X Ligationspuffer	10 µL
DTT-Lösung	1 µL
T4 DNA-Ligase	1 µL
<u>Aq.dest.</u>	<u>auf 20 µL</u>
	20 µL

### Kapitel 3.9.6, S. 81 Hypothetisches Modeln analog der Pferdeleber-ADH

Aufgrund des gleichen Reaktionsmechanismus und der Zuordnung zu *medium chain* Dehydrogenasen wurde mit Hilfe der für die HL-ADH bekannte Röntgenstruktur ein strukturbasierter Sequenzvergleich dargestellt und die Art und Orientierung der Aminosäuren der einzelnen Positionen zu

vergleichen. Dadurch sollte vor allen Dingen geklärt werden, ob die *CPCR* über Disulfidbrücken verfügt. Diese hypothetischen Arbeiten wurden von Prof. Dr. J. Grötzingler vom Institut für Biochemie der RWTH Aachen durchgeführt. Diese Studien wurden mit Hilfe des Programmes „Whatif“ auf einem Indigo-Rechner von Silicon Graphics (München) durchgeführt.

### 1.3.1 Kapitel 3.9.6, S. 81, Kapitel 3.14., S. 93 Alignment HL-ADH und *CPCR*

```

HI-ADH   1  ANEVIKCK AAVAVEAGKP LSIEEIEVAP PKAHEVRIKI IATAVCHTDA
CPCR     1  MPEIPKTQK AVVFETSGGK LEYKDI PVPK PKSNE LLINV KYSGVCHTDL

HI-ADH   49  YTLSGADPEG CFPVILG-HEG AGIVESV GEG VTKLKAGDTV IPLYIPQ-CGE
2 CPCR    50  HAWKGDWPLD TKLP LVGGHEG AGVVVGM GDN VKGWEIGDYA
GIKWLNGSCLN

HI-ADH   99  CKFCLNPKTN LCQKIRVTQG KGLMPDGTSR FTC---KGKT ILHY--MGTS
CPCR    102  CEFCEQGAEP NCPQADLSGY THDGSFEQYA TADAVQAARI PKNADLAKA

HI-ADH   144  TFSEYTVVAD ISVAKIDPLA P-LD--KVCL LGCGISTGYG AAVNTAKLEP
CPCR    151  APILCAGVTVYK AL KTAQLKA

HI-ADH   191  GSVCAVFGLG GVGLAVIMGC KVAGASRIIG VDINKDKFAR AKEFGATECI
CPCR    172  GEWVCISGAG GGLGSLAIQY AIAMGYRVIG IDGGAEKGEY IKSLGAEAYI

HI-ADH   241  NPQDFSK--- PIQEV L-IEM TDG GVDYSFE CIGNVKVMRA ALEACHK GWG
CPCR    222  DFTK—EK DIVEAVK KAT NGGPHGVINV SVSEKAINQS VEYVRPLG

HI-ADH   288  VSVVVGVAAS GE-EIAT RPF QLV TGRTWKG TAFGGWKSVE SVPKLVSEYM
CPCR    267  KVVLVGLPAG SKVVAPVFDA VVKS-VEIKG SYVGNRKDTQ EALDFFARGK

HI-ADH   337  SKKIKVDEFV THNLSFDEIN KAFELMHS GK SIRTVVKI
CPCR    307  VNCQIKIVGL SELPEVFKLM EEGKILGRYV LDTQK

```

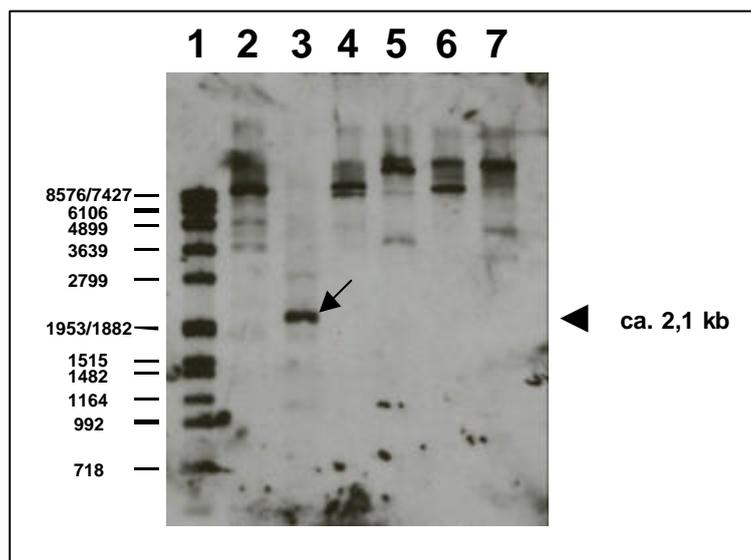
■: kennzeichnet die Cysteine in den Sequenzen. ■: markiert die homologen Bereiche.

### 2.1.1 Kapitel 3.14, S. 87 Southern Blot Hybridisierung

Durch Hybridisierungen mit markierter DNA (Sonde) an immobilisierte Nucleinsäuren kann man bestimmte DNA-Fragmente, z. B. das *CPCR*-Gen, identifizieren. Für den Transfer von doppelsträngiger DNA auf Blotmembranen [Southern, 1978] wurden gDNA-Proben nach Restriktion mit *Bgl* II, *Eco* R I, *Hinc* II, *Hind* III, *Pst* I, *Sac* I, *Sal* I oder *Sph* I (↪ 2.4.9) in einem 0,9 % Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde 10 min in Aq.millipore gewaschen, die Doppelstrang-DNA 2 x 15 min mit Denaturierungspuffer gespalten, mit Aq.millipore gewaschen und 2 x 15 min mit Neutralisationspuffer inkubiert. Nach Equilibrieren des Gels in 20xSSC-Puffer erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran ü/N in 2xSSC-Puffer. Die Membran wurde getrocknet und im UV-Transilluminator (Stratagene, Heidelberg) mit 240 nm UV-Licht für 60 sec bestrahlt, um die Nucleinsäuren an die Membran zu fixieren. Als Sonde diente ein mit Digoxigenin markiertes (DIG-Labeling-Kit) PCR-Fragment (Template: gDNA aus *Candida parapsilosis*, Primern MBS1 und MBASO3, 30 Zyklen, 52 °C, (↪ 2.4.2)). Die Nylonmembran mit fixierter Nucleinsäure wurde 2 h bei 68 °C in 50 ml Hybridisierungslösung inkubiert, die DIG-markierte Sonde 10 min bei 95 °C denaturiert und direkt in den Hybridisierungsansatz gegeben. Die Hybridisierung der Sonde an die membrangebundenen Nucleinsäuren erfolgte ü/N bei 68 °C. Die Membran wurde 2 x 5 min in 2 x SSC, 0,1 % SDS bei RT und 2 x 15 min in 0,5 x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C unter leichtem

Schütteln gewaschen. Der Nachweis der hybridisierten DNA erfolgte über Chemilumineszenzreaktion mit dem Antikörper-Enzym-Konjugat anti-DIG-Peroxidase. Dazu wurde die Membran 1-5 min in Waschpuffer inkubiert und zur Absättigung unspezifischer Bindungen 30 min in 1 x Blockinglösung getränkt [Pohl, 1990]. Die Membran wurde 30 min mit 75 mU/mL anti-DIG-Peroxidase in 20 mL 1 % Blockingreagenz unter leichtem Schütteln inkubiert, 2x15 min zur Entfernung nicht gebundener Antikörper mit Waschpuffer inkubiert und 2-5 min mit Detektionspuffer equilibriert. Auf die equilibrierte Membran wurden 1-2 mL des Chemilumineszenzsubstrat CSPD gegeben und das folgende Lichtsignal wurde mittels Photoreaktion mit einem Film oder mit Hilfe eines Luminographs detektiert.

-Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl	-Neutralisationspuffer	3 M NaCl
	0,5 M NaOH		0,5 M TRIS-HCl, pH 8
-20 x SSC	3 M NaCl		0,3 M Natriumcitrat, pH 7,5
-Hybridisierungslösung	5 x SSC		0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin
	0,02 % (w/v) SDS		1 % (w/v) Blockingreagenz



### Southern Blot zur Identifizierung des vollständigen *CPCR*-Gens.

gDNA wurde mit Restriktionsenzymen verdaut und nach einer Auftrennung im Agarosegel Southern geblottet. Das Dig-markierte Produkt der *CPCR*-PCR wurde als Sonde eingesetzt. Die DNA-Sonde stellt das komplette *CPCR*-Gen aus 1047 Basenpaaren dar. Bahn 1: DIG-Marker (Roche); Bahn 2: gDNA, restringiert mit *Eco* RI; Bahn 3: gDNA, restringiert mit *Hinc* II; Bahn 4: gDNA, restringiert mit *Sac* I; Bahn 5: gDNA, restringiert mit *Sph* I; Bahn 6: gDNA, restringiert mit *Pst* I; Bahn 7: gDNA, restringiert mit *Xba*

Auf dem dargestellten Blot in Abbildung 25 kann man neben vereinzelt unspezifischen und einigen spezifischen Banden im hohen Kilobasenbereich eine deutliche Bande bei 2,1 Kb in Bahn 3 erkennen. In diesem Ansatz wurde die gDNA mit dem Restriktionsenzym *Hinc* II verdaut. Die Bande entspricht einem Fragment mit dem DNA-Abschnitt, der als Template in der PCR diente.

Diese Southern Blot Hybridisierung wurde nicht bis zum Ende durchgeführt, da in Parallelversuchen mit degenerierten Primern das aktive rekombinante Enzym schon erhalten werden konnte.

**2.1.2 Kapitel 3.14, S. 87, „Codon Usage“ von *C. parapsilosis* und *C. albicans***

UUU 38.3 (Phe)	UCU 19.2 (Ser)	UAU 19.5 (Tyr)	UGU 9.8 (Cys)
UUC 13.6 (Phe)	UCC 10.8 (Ser)	UAC 21.2 (Tyr)	UGC 2.8 (Cys)
UUA 16.4 (Leu)	UCA 31.0 (Ser)	UAA 2.1 (Stop)	UGA 0.3 (Stop)
UUG 52.9 (Leu)	UCG 7.0 (Ser)	UAG 0.3 (Stop)	UGG 11.1 (Trp)
CUU 8.7 (Leu)	CCU 9.8 (Pro)	CAU 7.7 (His)	CGU 8.4 (Arg)
CUC 1.9 (Leu)	CCC 5.9 (Pro)	CAC 5.9 (His)	CGC 2.4 (Arg)
CUA 2.7 (Leu)	CCA 20.2 (Pro)	CAA 28.9 (Gln)	CGA 2.8 (Arg)
CUG 2.5 (Leu)	CCG 1.4 (Pro)	CAG 4.9 (Gln)	CGG 0.0 (Arg)
AUU 40.4 (Ile)	ACU 26.5 (Thr)	AAU 27.5 (Asn)	AGU 9.8 (Ser)
AUC 15.0 (Ile)	ACC 17.1 (Thr)	AAC 21.2 (Asn)	AGC 4.5 (Ser)
AUA 9.2 (Ile)	ACA 17.1 (Thr)	AAA 32.4 (Lys)	AGA 20.2 (Arg)
AUG 18.8 (Met)	ACG 4.5 (Thr)	AAG 28.6 (Lys)	AGG 3.5 (Arg)
GUU 35.5 (Val)	GCU 38.0 (Ala)	GAU 40.4 (Asp)	GGU 47.0 (Gly)
GUC 11.4 (Val)	GCC 15.7 (Ala)	GAC 17.4 (Asp)	GGC 9.1 (Gly)
GUA 6.7 (Val)	GCA 17.8 (Ala)	GAA 26.5 (Glu)	GGA 23.7 (Gly)
GUG 7.8 (Val)	GCG 3.5 (Ala)	GAG 18.1 (Glu)	GGG 7.7 (Gly)

**„Codon Usage“ von *Candida parapsilosis* Genen**

Die „Codon Usage“ setzt sich aus der Analyse von acht verschiedenen Genen zusammen. Die Zahlenwerte hinter den jeweiligen Aminosäuretripletts geben die Häufigkeit der Tripletts in Prozent pro Tausend analysierter Tripletts an. Die in Klammern angegebenen Abkürzungen stellen die jeweils durch das Triplet kodierende Aminosäure dar [Genbank, 2001].

UUU 28.6 (Phe)	UCU 23.3 (Ser)	UAU 24.0 (Tyr)	UGU 9.7 (Cys)
----------------	----------------	----------------	---------------

UUC 15.9 (Phe)	UCC 10.3 (Ser)	UAC 11.6 (Tyr)	UGC 1.7 (Cys)
UUA 33.8 (Leu)	UCA.24.6 (Ser)	UAA 1.0 (Stop)	UGA 0.3 (Stop)
UUG 36.1 (Leu)	UCG 6.5 (Ser)	UAG 0.5 (Stop)	UGG 11.0 (Trp)
CUU 9.8 (Leu)	CCU 13.2 (Pro)	CAU 14.0 (His)	CGU 5.9 (Arg)
CUC 2.5 (Leu)	CCC 3.6 (Pro)	CAC 5.8 (His)	CGC 0.7 (Arg)
CUA 4.0 (Leu)	CCA 26.6 (Pro)	CAA 35.2 (Gln)	CGA 3.5 (Arg)
CUG 3.1 (Leu)	CCG 2.4 (Pro)	CAG 6.9 (Gln)	CGG 0.8 (Arg)
AUU 39.9 (Ile)	ACU 30.7 (Thr)	AAU 37.9 (Asn)	AGU 16.2 (Ser)
AUC 14.2 (Ile)	ACC 13.9 (Thr)	AAC 18.7 (Asn)	AGC 4.5 (Ser)
AUA 12.3 (Ile)	ACA 17.4 (Thr)	AAA 48.6 (Lys)	AGA 23.6 (Arg)
AUG 18.4 (Met)	ACG 3.6 (Thr)	AAG 19.4 (Lys)	AGG 2.7 (Arg)
GUU 33.2 (Val)	GCU 30.7 (Ala)	GAU 43.6 (Asp)	GGU 33.5 (Gly)
GUC 10.3 (Val)	GCC 12.7 (Ala)	GAC 14.7 (Asp)	GGC 4.5 (Gly)
GUA 8.0 (Val)	GCA 15.4 (Ala)	GAA 49.5 (Glu)	GGA 13.7 (Gly)
GUG 10.0 (Val)	GCG 2.0 (Ala)	GAG 11.5 (Glu)	GGG 7.7 (Gly)

### **Codon Usage“ von *Candida albicans* Genen**

Die „Codon Usage“ setzt sich aus der Analyse von 522 verschiedenen Genen zusammen. Die Zahlenwerte hinter den jeweiligen Aminosäuretripletts geben die Häufigkeit der Tripletts in Prozent pro Tausend analysierter Tripletts an. Die in Klammern angegebenen Abkürzungen stellen die jeweils durch das Tripletts kodierte Aminosäure dar [Genbank, 2001].

---

## **Vielen Dank an alle!**

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. M.-R. Kula für die interessante Themenstellung und die sehr guten Arbeitsbedingungen an ihrem Institut und für ihre Geduld bedanken. Darüber hinaus möchte ich auch nicht versäumen, mich für ihre stete fachliche Diskussionsbereitschaft zu bedanken, ganz gleich, ob sie Zeit hatte oder nicht und für ihre Warmherzigkeit.

Herrn Prof. Dr. G. Gellissen von der Firma RheinBiotech danke ich sehr für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Frau Dr. Martina Pohl von der Firma MPB Cologne GmbH danke ich für die Assoziation an ihre Arbeitsgruppe in ihrer Zeit als Gruppenleiter am Institut für Enzymtechnologie und die stete Diskussionsbereitschaft ihrerseits.

Frau S. Münch möchte ich für die Unterstützung bei den chromatographischen Arbeiten, Frau Dipl.-Chem. D. Müller für die Proteinsequenzierungen danken.

Bei den Mitarbeiter des Instituts für Biotechnologie I des Forschungszentrums Jülich, Hr. Dr. A. Liese, Hr. Prof. Dr. U. Kragl, Hr. Dr. S. Rissom und Hr. Dipl.-Chem. T. Schubert danke ich für die rege interdisziplinäre Zusammenarbeit bezüglich des hier dargestellten Enzyms.

Dann möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Enzymtechnologie für die schöne Zeit in Jülich, sowohl von der fachlichen als auch menschlichen Seite danken. Hervorheben möchte ich dabei Frau Dipl.-Biol. P. Heim und Hr. Dipl.-Biol. S. Naamnieh, mit denen ich mir nicht nur das Büro geteilt habe als auch Frau Dipl.-Chem. A. Rodenbrock, Dr. J. Feuser und Hr. Dipl.-Biochem. T. Linden, die alle durch ihre Freundschaft und stete Diskussionsbereitschaft auch in weniger schönen Stunden zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben. Darüber hinaus möchte ich nicht die schöne Zusammenarbeit mit Hr. Dr. S. Verseck, Fr. Dr. H. Slusarczyk und Hr. Dipl.-Chem. L. Krieg vergessen.

Mein Dank gilt auch Dr. R. Schmuck von der Firma Roche Diagnostics GmbH. Er wird sicherlich den Grund wissen.

Zum Schluß ein ganz, ganz großes Dankeschön an meine Eltern M. und K. Bönitz wie auch an meine Schwester C. Jost, an meinem Schwager A. Jost und besonders an meinem Freund Hr. Dr. H. Dulat, die sich in den Jahren der Doktorarbeit bestimmt oft über mich gewundert haben, mich aber immer unterstützt haben, wo sie nur konnten. Ich bin froh, daß ich Euch habe!