

**Entwicklung eines rekombinanten Ganzzellsystems--
Klonierung, Coexpression und Mutagenese der Phenylalanin-Dehydrogenase
aus *Rhodococcus* sp. M4 und des malic enzymes aus *E.coli* K12**

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

vorgelegt von
Shukrallah Na'amnieh
aus Düsseldorf

Jülich 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1998 bis März 2002 am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Herrn Priv. Doz.- Dr. W. Hummel durchgeführt.

Die Arbeit wurde von Degussa AG und Minerva Stiftung der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften gefördert.

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

Referent: Priv.- Doz. Dr. W. Hummel

Korreferent: Prof. Dr. Cornelis P. Hollenberg

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	BEDEUTUNG VON ENZYMEN	1
1.2	ENZYME IN DER INDUSTRIE	2
1.3	DIE PHENYLALANIN DEHYDROGENASE AUS <i>RHODOCOCCUS</i> SP. M4	4
1.3.1	Malic enzyme aus <i>E. coli</i> K12	8
1.3.2	L-Phenylalanin-Synthese unter Coenzymregeneration	8
1.3.3	Expression rekombinanter Proteine	9
1.4	PROTEIN-DESIGN	11
1.4.1	Gezielte Mutagenese	11
1.4.2	Zufallsmutagenese	13
1.5	HOCHZELLDICHTE-FERMENTATION (HZD)	14
2	Problemstellung und Zielsetzung	15
3	Material	17
4	Methoden	20
4.1	MOLEKULARBIOLOGIE	20
4.1.1	Isolierung der genomischen DNA	20
4.1.2	Auftrennung von DNA-Fragmenten über Elektrophorese	21
4.1.3	Ethanol-fällung	21
4.1.4	Polymerase Ketten Reaktion [PCR]	22
4.1.5	Berechnen der Schmelztemperatur der Primer	23
4.1.6	Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen	23
4.1.7	Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA	24
4.1.8	Ligation	24
4.1.9	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	25
4.1.10	Transformation	26
4.1.11	Schnellisolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> (modifiziert nach Birnboim und Doly)	26
4.1.12	Plasmidisolierung [Biorad]	27
4.1.13	Plasmidisolierung [Qiagen]	27
4.1.14	Restriktion	28
4.1.15	Sequenzierung	28
4.1.16	Gezielte Mutagenese	28
4.1.17	Zufallsmutagenese	29
4.1.18	Sättigungsmutagenese	31
4.2	BIOCHEMISCHE METHODEN	32
4.2.1	Zellaufschluß und Rohextraktgewinnung	32
4.2.2	Aktivitätstest für die Phenylalanin Dehydrogenase	33
4.2.3	Screening und Aktivitätstest in Titerplatten	34
4.2.4	Aktivitätstest für das NAD-abhängige malic enzyme	35
4.2.5	Gekoppelte enzymatische Synthese	35
4.2.6	Bestimmung des L-Phenylalanin mittels HPLC	35
4.2.7	Bestimmung der Acetatkonzentration	36
4.2.8	Ganzzell Biotransformation	36
4.2.9	Proteinaufreinigung	36
4.2.10	Proteinbestimmung nach Bradford	37
4.2.11	Entsalzen von Proteinlösungen	37
4.2.12	Konzentrierung von Proteinlösungen	37
4.2.13	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
4.2.14	Färbung	39
4.3	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	40
4.3.1	Verwendete Organismen	40
4.3.2	Anzuchtbedingungen und Medien	40
4.3.3	Plattenkulturen	41
4.3.4	Schüttelkolbenkulturen	41
4.3.5	Konservieren von mikrobiologischen Stämmen	41
4.3.6	Fermentation der rekombinanten PheDH in Hochdichte Medium (HZD)	41
4.3.7	Bestimmung der optischen Dichte	44
5	Ergebnisse	45
5.1	KLONIERUNG DER PHENYLALANIN DEHYDROGENASE (PHEDH)	45
5.1.1	Präparation genomischer DNA	45
5.1.2	Klonierung des PheDH-Gens mittels PCR	46
5.1.3	Klonierung des PheDH Gens in den pUC-18	47
5.1.4	Sequenzierung des <i>phedh</i> -Gens	49

5.1.5	Expression des rec PheDH -Gens in <i>E.coli</i>	50
5.1.5.1	Klonierung der PheDH im Expressionsvektor PET16b	50
5.1.5.2	Expression der PheDH im PET-System.....	52
5.1.5.3	Klonierung des PheDH-Gens in pkk223-3.....	53
5.1.5.4	Expression der recPheDH im pKK223-3.....	56
5.1.6	Optimierung der Induktionsparameter	57
5.1.7	Reinigung der recPheDH aus <i>E. coli</i> JM105.....	60
5.1.8	Substratspektrum und K_M -Werte.....	62
5.1.9	Temperaturstabilität.....	63
5.1.10	Temperaturoptimum	64
5.1.11	pH-Optimum	64
5.2	HOCHZELLDICHTE FERMENTATION (HZD).....	66
5.2.1	Zuführung von Nährstoffen, Nebenproduktbildung und Wachstum.....	66
5.2.2	Bestimmung des Induktionszeitpunkts	68
5.3	KLONIERUNG DES MALIC ENZYMES	70
5.3.1	Präparation genomischer DNA.....	70
5.3.2	Genisolierung und Klonierung des malic enzymes im recPhe-pKK-223-3.....	70
5.4	KONSTRUKTION EINES EXPRESSIONSVEKTORS MIT HETEROLOGER EXPRESSION.....	75
5.4.1	Coexpression der PheDH und des malic enzymes.....	77
5.4.2	Optimierung der Aktivität.....	78
5.4.3	K_m -Wertbestimmung	81
5.4.4	Gekoppelte L-Phenylalanin Synthese unter Regeneration des Coenzym NADH	81
5.5	GANZZELLUMSETZUNG	85
5.6	GEZIELTE MUTAGENESE	87
5.6.1	Mutation des Lysin 66	88
5.6.2	Sequenzierung der K66I	94
5.6.3	Expression der PheDH-Mutante K66I.....	94
5.6.4	Herstellung weiterer Muteine.....	96
5.6.5	Mutation von Lysin 66 zu Arginin und Lysin 78 zu Isoleucin	97
5.6.6	PCR der K66R- Mutanten und deren Klonierung.....	98
5.6.7	Aktivitätsnachweis des PheDH-Muteins K66R und K78I	99
5.7	ZUFALLSMUTAGENESE	101
5.8	ENTWICKLUNG EINES FARBTTESTES ALS SCREENINGSMETHODE.....	102
5.8.1	K66R –Muteine.....	104
5.8.2	Biochemische Charakterisierung des K66R-8-Muteins.....	107
5.8.3	Synthese von Phenyllactat mit dem Mutein K66R-8.....	109
5.8.4	Austausch K66I.....	112
6	Diskussion.....	114
7	Zusammenfassung.....	127
8	Literaturverzeichnis.....	131

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Industriell genutzte Enzyme, ihr Ursprungsorganismus, aus dem sie isoliert werden und mögliche Verwendungszwecke.....	2
Tabelle 2: PCR-Zyklen	46
Tabelle 3: PCR Protokoll zur Amplifizierung des PheDH-Gens. Variiert wurde die Konzentration der Template-DNA.....	46
Tabelle 4: Ligationsansatz zur Klonierung der PheDH im pUC18-Vektor	48
Tabelle 5: Expressionsresultate der rekombinanten <i>E.coli</i> Stämme. Die Aktivitäten wurden im Rohextrakt „30%iger Aufschluss“ gemessen.....	57
Tabelle 6: Zusammenfassung der Reinigung der recPheDH aus E.coli-Rohextrakt.....	61
Tabelle 7: Untersuchte Substrate der Rec-PheDH.....	62
Tabelle 8: Kinetische Parameter für die Rec-PheDH.....	62
Tabelle 9: PCR Protokoll zur Amplifizierung des malic enzymes aus dem rekombinanten pUC18-Plasmid. Variiert wurden die Konzentrationen der Template-DNA.....	76
Tabelle 10: Aktivitätsbestimmung der exprimierten Enzyme in einem 10 L Fermenter mit LB-Medium als batch-Fermentation.....	78
Tabelle 11: Aktivitätsvergleich in Abhängigkeit des Aufschlusspuffers	79
Tabelle 12: Proteinbestimmung beider exprimierten Enzymen, PheDH und malic enzyme, nach Variation der Aufschlusszeit. Die Zellen wurden nach einer 60-, 30-sekundigen Behandlung zwischenzeitlich 30Sekunden abgekühlt.	81
Tabelle 13: Aufreinigung des rekombinanten malic enzymes.....	81
Tabelle 14: Vergleich der PheDH- bzw. der malic enzyme-Aktivität in verschiedenen Reaktionspuffern. Die Aktivitäten sind in Prozent vom Optimalen zu sehen.....	84
Tabelle 15: Möglichkeiten zur Substratumsetzung nach einer Mutagenese. Durch den Austausch des Lysins in Isoleucin (neutrale Aminosäure) könnte die Methylgruppe des Ketons akzeptiert werden und somit das Keton zum Amin umsetzen. Es wird eine direkte Hydrierung der Ketosäure zur Hydroxysäure bei einer Mutagenese des Lysin 66 in Arginin erwartet.	88
Tabelle 16: Zusammenfassung der hergestellten Mutanten und deren neue Eigenschaften . (O) getestet aber keine Aktivität, (-) nicht getestet. Die Restaktivität bezieht sich auf der rec-PheDH.	100
Tabelle 17: Km-Werte des Muteins K66R-8. Untersucht wurde Phenylpyruvat sowohl bei einer reduktiven Aminierung als auch bei einer Reduktion ohne Ammoniumionen.....	108
Tabelle 18: Vergleich der Reaktionsmechanismen verschiedener Muteine. Die 3 Mutationen wurden einzeln rückgängig mutiert. Die drei Mutationen sind als Kombination für die neue Eigenschaft der PheDH verantwortlich. Die Substitution der einzelnen Mutationen in die ursprünglichen Codons der PheDH führte zum Verlust der LDH-Aktivität.	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionsschema der Phenylalanin Dehydrogenase.....	4
Abbildung 2: Reaktionsmechanismus zur Aminierung von Ketosäuren und die dabei beteiligten Aminosäuren in der NAD-abhängigen Phenylalanin Dehydrogenase.....	5
Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der NAD-abhängigen Phenylalanin Dehydrogenase aus <i>Rhodococcus</i> sp. M4. Dargestellt ist das Enzym mit dem Substrat Phenylpyruvat ohne Coenzym und Inhibitor. Die Pfeile zeigen auf die Aminosäure Lysin 66, die im aktiven Zentrum beteiligt ist, sowie auf das Substrat im Substratkanal. Die tiefe Spalte ist ein typischer Substratkanal für Aminosäure Dehydrogenasen.....	6
Abbildung 4: Die beteiligten Aminosäuren im aktiven Zentrum der PheDH. Die Aminosäure Lysin 66 ist die Bindungsstelle zur Carboxylgruppe im Phenylpyruvat.....	7
Abbildung 5: Schema zur Synthese von L-Phenylalanin unter Regeneration des Coenzym NADH mittels Formiat Dehydrogenase.....	9
Abbildung 6: Protein-Design Zyklus zur gezielten Mutagenese eines Enzyms.....	12
Abbildung 7: Prinzip der gezielten Mutagenese mittels überlappender Fragmente.....	29
Abbildung 8: Vorgehensweise der Zufallsmutagenese.....	31
Abbildung 9: Schema zum Screeningsvorgang.....	34
Abbildung 10: genomische DNA aus <i>Rhodococcus</i> sp. M4 nach Elektrophorese im 0.5 %igem Agarosegel.....	45
Abbildung 11: Ergebnis der PCR Reaktionen, die Abbildung zeigt ein Fragment mit einer Größe von etwa 1100 bp, als Marker wurde die Gibco KB-Leiter verwendet. Von den PCR-Ansätze wurden 7 µl auf ein 0.8 % Agarosegel aufgetragen, 1-3 entsprechen den Ansätze in Tabelle 2.....	47
Abbildung 12: Vektorkarte des pUC18 -PheDH.....	48
Abbildung 13: DNA-Sequenz der Phenylalanin Dehydrogenase aus <i>Rhodococcus</i> sp. M4 mit zwei Stopcodons.....	49
Abbildung 14: Fließschema zur Klonierung des recPheDH-Gens in die Expressionsvektoren PET11a oder PET 16b.....	51
Abbildung 15: Agarose-Gel zur Überprüfung der Restriktion der recpET-16b-und 11a-Vektoren. Bei einer Größe von etwa 1100bp tritt eine Bande des geschnittenen Inserts auf Bahn 2 pET-16b und Bahn 5 pET-11a. Als Marker wurde eine KB-Leiter (Gibco) verwendet Bahn 1. Der Ansätze wurden mit NdeI/BamHI behandelt.....	51
Abbildung 16: SDS-Gel zur Überprüfung der Expression. Bei einer Größe von etwa 39 kDa tritt eine Bande auf. Bahn 1: Rohextrakt aus dem rec-pET16b in <i>E. coli</i> BL21 das Rohextrakt wurde nicht abzentrifugiert. Bahn 2: Überstand des abzentrifugierten Rohextrakts aus rec-pET16b in <i>E. coli</i> BL21. Bahn 3: Rohextrakt aus dem rec-pET11a in <i>E. coli</i> BL21. Bahn 4: Überstand des abzentrifugierten Rohextrakts aus rec-pET11a in <i>E. coli</i> BL21. 5: Marker.....	52
Abbildung 17: Vektorkarte des pKK-223-3-recPheDH. Das PheDH-Gen wurde an der SmaI-Schnittstelle im Expressionsvektor pKK-223-3 mit einem Abstand zur Ribosomenbindungsstelle von 14bp ligiert.....	54
Abbildung 18: rec-pKK223-3-PheDH verdaut mit EcoRI. 1: KB-Marker, 2-6 recPhe-pKK223-3 verdaut mit EcoRI (verschiedene Konzentrationen). Nach einer Restriktionsanalyse taucht eine Bande mit der erwarteten Größe von ca. 800bp auf.....	56
Abbildung 19: Variation der IPTG-Konzentration bei der Induktion von pkk-223-3-PheDH/ JM105. Die Kulturen wurden mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen zwischen 0 und 3 mM induziert. Die spezifische Aktivität wurde im Rohextrakt gemessen.....	58
Abbildung 20: Wachstumsverhalten für <i>E. coli</i> nach der Induktion.....	59
Abbildung 21: Variation des Induktionszeitpunktes in Expressionskulturen von pkk-223-3-PheDH/ JM105. Die Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 1 mM IPTG induziert. Die spezifische Aktivität wurde im Rohextrakt gemessen.....	60
Abbildung 22: SDS-PAGE (12.5 %, Silberfärbung) zur Überprüfung der Reinheit der recPheDH nach DEAE-Sepharose FF –Chromatographiegel. 1 Marker, 2+3 recPheDH nach DEAE-Sepharose FF, 4 Rohextrakt aus <i>E. coli</i>	61
Abbildung 23: Temperaturstabilität der rec-PheDH im Vergleich zur WT-PheDH im Rohextrakt.....	63
Abbildung 24: Temperaturoptimum der recPheDH im Vergleich zur WT-PheDH, Enzym-präparate aus dem Rohextrakt JM105. 100 % bei der rec-PheDH entsprechen 270 U/mg, und im WT-PheDH 24 U/mg.	64
Abbildung 25: pH-Optimum der rec-PheDH für die reduktive Aminierung. 100 % bei der rec-PheDH entsprechen 190 U/mg, und im WT-PheDH 16 U/mg. Die Messung wurde bei 30°C durchgeführt.	65
Abbildung 26: Wachstumsverhalten und Acetatbildung durch <i>E. coli</i> JM105 [rec-pKK-223-3-PheDH] bei linearer Erhöhung der Glucosezufuhr in HZD-Medium mit Hefeextraktzusatz bei 30°C. Die Acetatbildung wurde mittels HPLC bestimmt.....	66
Abbildung 27: Wachstumsverhalten und Acetatbildung durch <i>E. coli</i> JM105 [rec-pKK223-3-PheDH] in HZD-Medium mit Hefeextraktzusatz bei 30°C und exponentieller Erhöhung der Glucosezufuhr.....	67
Abbildung 28: Entwicklung der PheDH-Volumenaktivität in Abhängigkeit vom Induktionszeitpunkt während der Zufütterungsphase.....	68
Abbildung 29: 0.8 %iges Agarosegel zum Nachweis der Konzentrationszunahme an rec-pKK-223-3 bei Induktion 1h nach Beginn der Glucose-Zuführung während der Fermentation.....	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 30: Zu- und Abnahme der Plasmidkopienzahl bei Induktion 5 h nach Beginn der Glucosezuführung	69
Abbildung 31: Neue PCR-Strategie zur Amplifikation des malic enzymes. Es wurde ein Einzelstrang amplifiziert, der als Template für eine zweite PCR dient	71
Abbildung 32: DNA-Sequenz des malic enzymes aus <i>E. coli</i> K12	72
Abbildung 33: Proteinsequenz des malic enzymes aus <i>E. coli</i> K12 abgeleitet von der DNA-Sequenz	73
Abbildung 34: Alignment der Aminosäuresequenz verschiedener malic enzymes. NADP- <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> (Parkhill et al., 2001), <i>Mdh Pasteurella multocida</i> (May et al., 2001), NAD- <i>Brucella melitensis</i> (DeVecchio et al., 2002), NADP- <i>E.coli</i> (Blattner et al., 1997).	75
Abbildung 35: Konstruktion des Plasmids für eine heterologe Expression zur L-Phe Synthese mittels Ganzzellumsetzung	75
Abbildung 36: PCR-Ausbeute des malic enzyme-Gens bei verschiedenen Konzentrationen an Template-DNA (rec-pUC18)	76
Abbildung 37: Vektorkarte des rec-pKK-223-3 PheDH-Malic. Malic enzyme wurde 3' zur PheDH an der PstI- und HindIII-Schnittstelle mit eigener Ribosomenbindungsstelle kloniert.	77
Abbildung 38: Stabilitätsbestimmung der PheDH bzw. des malic enzymes nach verschiedenen Aufschlusszeiten mittels Ultraschalls. Die Zellen wurden nach einer 60-, 30-sekundigen Behandlung zwischenzeitlich 30 Sekunden abgekühlt.	80
Abbildung 39: pH-Optimum von malic enzyme und der PheDH. Die Aktivität beider Enzymen nimmt bei Zunahme des pH-Wertes zu. Die Messungen wurden mit partiell gereinigtem Enzym durchgeführt. Für die Phenylalanin Dehydrogenase wurde die reduktive Aminierung gemessen	82
Abbildung 40: Temperaturoptimum. Die Messungen wurden bei pH 8,5 und in 0,1M HEPES-Puffer durchgeführt.	83
Abbildung 41: HPLC-Analytik zur Nachweis von in situ Regenerationsystems gildeten L-Phenylalanin	84
Abbildung 42: Bildungskinetik für L-Phe. Die Bildung von L-Phe wurde <i>in situ</i> durchgeführt.	85
Abbildung 43: Produktnachweis nach einer 5 stündigen Umsetzung mit ganzen rekombinanten <i>E. coli</i> Zellen	86
Abbildung 44: Ganzzellumsetzung zur Produktion von L-Phe. Die Bestimmung von L-Phe erfolgte mittels HPLC	86
Abbildung 45: Reaktionsmechanismus der reduktiven Aminierung von Phenylalanin mittels PheDH	87
Abbildung 46: Schema zur Mutagenese mittels PCR nach der Methode der „overlapping extension“, ausgetauscht wurde das Lysin66 gegen Isoleucin	89
Abbildung 47: Klonierungsstrategie zur Einführung der Mutation PheDHK66I. Im ersten Schritt wurden zwei Fragmente amplifiziert, die die gleiche Mutation tragen; beim zweiten Schritt hybridisierten sie zum ganzen Gen. Somit konnte das amplifizierte Gen in den Expressionsvektor ligiert werden	90
Abbildung 48: Agarosegelanalyse der PCR zur K66I- Mutagenese. Spur 1: kb-Leiter; Spur 2 unspezifische Amplifikation der Teilfragmente; Spur 3 und 4 sind gewünschte Amplifikate nach einer Optimierung der PCR- Bedingungen mit einer Größe von ca. 200 bp bzw. 900 bp	93
Abbildung 49: Sauberes PCR-Produkt nach der Fusion der beiden Fragmente (Abbildung 48; Bahn 3+4) mit einer Größe von 1.1 kb	93
Abbildung 50: Gensequenz des K66I- Muteins	94
Abbildung 51: Das aktive Zentrum der PheDH und der Effekt des Lysin66 durch den Austausch in Isoleucin. (A) Wechselwirkung zwischen Lysin66 und der Carboxylgruppe des Substrates in der PheDH, (B) Mutein K66I, Lysin wurde gegen Isoleucin ausgetauscht, das keine Wasserstoffbindung zur Carboxylgruppe des Substrates bildet. Wasserstoffbindungen sind grün dargestellt.	95
Abbildung 52: Reaktionsmechanismus der reduktive Aminierung von Phenylacetone	95
Abbildung 53: Klonierungsstrategie der PheDH-Mutanten am Beispiel der PheDH-K66R. Das ganze rekombinante Plasmid wird mittels Mutagenese-Primer amplifiziert und in <i>E.coli</i> -Zellen transformiert	98
Abbildung 54: Reaktionsmechanismus zur Umsetzung der Ketosäure Phenylpyruvat zur Hydroxysäure Phenyllactat.	99
Abbildung 55: Reaktionsschema zum Verlauf des Farbtests	103
Abbildung 56: Farbttest auf Agarplatten mit ganzen Zellen. Die gelben Zellen enthalten PheDH-Aktivität	103
Abbildung 57: Bestimmung der Aktivität der K66R-Muteine. Gezeigt werden einige Muteine mit den restlichen Aktivitäten im Vergleich zur Wt-PheDH. Bei zwei Muteinen (Mutein 2 und 8) konnte der natürliche Reaktionsmechanismus verändert und somit neue Eigenschaften erzielt werden.	104
Abbildung 58: Aminosäuresequenz des Mutein K66R-8 im Vergleich zur PheDH-AS-Sequenz. 3 Mutationen K66R, T208A, E225D sind in diesem Mutein für die neue Aktivität verantwortlich	105
Abbildung 59: Dreidimensionale Struktur des K66R-8-Mutein. Gezeigt sind die durch die Mutagenese ausgetauschten Aminosäuren. Die Mutationen K66R, T208A und E225D sind hervorgehoben. Wasserstoffbindungen sind grün dargestellt.	106
Abbildung 60: Das aktive Zentrum der PheDH und der Effekt des Lysin66 durch den Austausch in Arginin. (A) Wechselwirkung zwischen Lysin66 und der Carboxylgruppe des Substrates, (B) Arginin wird anders orientiert und geht keine Wechselwirkung mit der Carboxylgruppe des Substrates ein. Wasserstoffbindungen sind grün dargestellt.	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 61: Reaktionsschema des K66R-8-Mutein.....	107
Abbildung 62: pH-Optimum des Muteins K66R-8 im Vergleich zur Wildtyp-PheDH. Der Aktivitätstest (Reduktion des Phenylpyruvat ohne Ammoniumionen) wurde bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 5 und pH 10 gemessen	108
Abbildung 63: Temperaturoptimum des K66R-8-Muteins im Vergleich zur Wildtyp-PheDH. Die Ansätze enthielten Tris/HCl Puffer (100 mM pH 8.0 + Phenylpyruvat und NADH) wurden auf den jeweiligen Meßtemperaturen (25-50°C) in der Küvette temperiert und gemessen	109
Abbildung 64a: GC-Chromatogramm des Syntheseansatzes der K66R-8 nach zweistündiger Inkubation. Eingesetzt wurden 30 mM Phenylpyruvat, 100 mM HEPES-Puffer, 100 mM Formiat, 2 mM NAD ⁺ , 2 mM MgCl ₂ , 20 U K66R-8 und 30 U Formiat Dehydrogenase.....	110
Abbildung 65: Einfluss der Mutationen K66R, T208A und E225D, auf die Enantioselektivität der Reduktion von Phenylpyruvat (30 mM) in Abhängigkeit von der Zeit.....	111
Abbildung 66 Produktnachweis nach einer 9 stündigen Umsetzung mit dem Mutein K66I. Zur Regenerierung des Coenzym NADH wurden 40 U Formiat Dehydrogenase eingesetzt. Die reduktive Aminierung erfolgte mit (NH ₄) ₂ SO ₄ und 30 mM Phenylpyruvat als Substrat. (L-Phe = 23 min; der Peak bei 29 min ist nicht identifiziert).	113
Abbildung 67: Alignment der Aminosäuresequenzen der Wt-PheDH aus <i>Rhodococcus</i> sp. M4 (Brunhuber <i>et al.</i> , 1994) mit der LDH aus <i>Bifidobacterium longum</i> (Iwata <i>et al.</i> , 1994) und der Mutante K66R-8. Rot: Identische Aminosäuren; grün: ähnliche Aminosäuren; Durch Fettdruck hervorgehoben: Mutationen; blaue Pfeile: wichtige Reste zur Bildung der Rossmann fold.	125

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALF	Automated Laser Fluorescent Sequencer
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumine
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CTAB	N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium Bromid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDH	Formiatdehydrogenase
FF	Fast Flow
h	Stunde
IB-L-C	N-Iobutyryl-L-Cystein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _{pi}	Kaliumphosphatpuffer
K _m	Michaelis-Menten Konstante
L	Liter
LB	Luria Bertani
min	Minute
M	molar

Abbildungsverzeichnis

mM	Millimolar
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
NAD	Nicotinamadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamadenindinucleotid (reduzierte Form)
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
OPA	o-Phthaldialdehyd
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
PheDH	Phenylalanin Dehydrogenase
Rec-PheDH	rekombinante wt-PheDH
SDS	Natriumlaurylsulfat
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumenanteil pro Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil pro Volumenanteil
w/w	Gewichtsanteil pro Gewichtsanteil
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Enzymen

In den meisten Publikationen über die Biokatalyse findet man die Aussage, dass die chemische Industrie durch die Biokatalyse inhärent bessere Verfahren zu erwarten hat. Dabei sollte allerdings nicht übersehen werden, dass seit 200 Jahren verschiedenste Verbindungen von Arzneimitteln bis zu Haushaltsreinigern ohne Biokatalysatoren effizient hergestellt werden. Daher besteht kein Grund zu der Annahme, dass die Chemie in den nächsten Jahrhunderten nicht ebenso erfolgreich sein wird. Die großen Vorteile chemischer Verfahren sind Einfachheit, Geschwindigkeit (gesteigert durch den Einsatz von Hitze und Druck) und niedrige Kosten, warum also sollten Biokatalysatoren interessant sein? Die genannten Vorteile der chemischen Verfahren kommen manchmal nicht zum Tragen, wenn für das gewünschte Produkt regio- oder stereospezifische Reaktionen erforderlich sind, wenn Edukte oder das Produkt instabil sind oder wenn Verunreinigungen durch Nebenreaktionen ein ernsthaftes Problem sind. Biokatalysatoren sind attraktiv, weil zu ihren Eigenschaften Chemo-, Regio- und Stereoselektivität, eine beeindruckende Katalyseeffizienz und die Fähigkeit zur Reaktion in wässrigen Medien gehören.

So besitzen Enzyme eine hohe Chemo- und Regioselektivität, die Voraussetzungen für die Steuerung der komplexen Vorgänge in einer Zelle sind. Enzyme beschleunigen Reaktionen um Faktoren von wenigstens einer Million. Ohne sie würden die meisten Reaktionen in biologischen Systemen nicht in wahrnehmbarem Umfang ablaufen.

Eine erhebliche Bedeutung hat die Biotechnologie in der Qualitätsverbesserung von Nahrungsmitteln in Bezug auf Struktur und Geschmack (Uhlig, 1991) sowie in der Herstellung von Aminosäuren erlangt. Aufgrund der hohen Spezifität und Selektivität werden Enzyme in zunehmendem Maße in die klassische Organische Chemie integriert. Für Pharmaka und Agrochemikalien sind enantiomerenreine Wirkstoffe zunehmend gefordert, um unerwünschte Nebenwirkungen auszuschließen, wie im bekanntesten Fall beim *Contergan*, bei dem das (R)-Enantiomer beruhigend, das (S)-Enantiomer aber teratogen wirkt (Faber, 1997). Die Synthese von enantiomerenreinen Verbindungen ist daher von besonderem Interesse.

Dass Enzyme nicht immer bei industriellen Prozessen zum Einsatz kommen, liegt hauptsächlich daran, dass Enzyme unter harten industriellen Bedingungen eingesetzt werden sollten, die zu deren Denaturierung führen. Dazu gehören vor allem hohe Temperaturen und die Anwesenheit organischer Lösungsmittel. Dennoch haben biotechnologische Verfahren es ermöglicht, einige klassische chemische Prozesse zu ersetzen.

1.2 Enzyme in der Industrie

Wegen der strengen Umweltauflagen für die chemische Industrie suchen die Groß-Industrien, aber auch mittelständige Betriebe nach umweltfreundlichen Methoden. Dadurch entwickeln sich biotechnologische Verfahren rasch und es werden immer mehr Enzyme in der Industrie eingesetzt.

Die Pharmaindustrie hat enorme Aufwendungen in die Herstellung enantiomerenreiner Wirkstoffe gesteckt, um pharmakologisch wirksame Substanzen in der geforderten Reinheit zu erhalten. Mittlerweile wird die Forderung nach enantiomerenreinen Wirkstoffen auch für die Entwicklung neuer Agrochemikalien intensiv geprüft (Ernst&Young, 1998). Zu erwarten ist, dass dieses Qualitätskriterium eingehalten werden muss, sobald der Stand der Technik dies zulässt.

Industriell genutzte Enzyme sind z.B. die bei der Fruchtsaftklärung verwendeten Pektinasen oder die als enzymatische Wirkstoffkomponenten in Waschmitteln und in der Textilverarbeitung zum Einsatz kommenden Lipasen, Proteasen, und Cellulasen (Tabelle 1) (Jaag, 1968).

Tabelle 1: Industriell genutzte Enzyme, ihr Ursprungsorganismus, aus dem sie isoliert werden und mögliche Verwendungszwecke

Enzym	Isoliert aus	Nutzung bei
?-Amylase	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Stärkeprodukte, Textilverarbeitung, Brotherstellung, Fruchtsäfte, Sirup, Gemüsesäfte
Bromelain	<i>Ananas comosus</i> <i>Ananas bracteatus</i>	Fruchtsaftklärung, Fleischzartmacher
Cellulasen	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma reesei</i>	Glucoseherstellung, Papierverarbeitung
Glucose-Isomerase	<i>Streptomyces spec</i> <i>Bacillus coagulans</i>	Herstellung von Zuckersirup
Glucose-Oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Antioxidans

Auch in der organischen Synthese gewinnen Enzyme zunehmend an Bedeutung (Zaks, 2001). Innerhalb der industriell genutzten Biokatalysatoren kommt den Dehydrogenasen dabei in den letzten Jahren, trotz des erforderlichen Zusatzes von Coenzymen, eine stärkere Bedeutung zu.

(Carrea *et al.*, 1996). Da Coenzyme kostenintensiv sind, wenn sie in äquimolaren Mengen in der enzymatischen Synthese im industriellen Maßstab eingesetzt werden, wurden eine Reihe von Verfahren entwickelt, die Coenzyme *in situ* zu regenerieren (Kometani *et al.*, 1994; Leonida *et al.*, 1998). Dabei stellen enzymatische Verfahren die effizienteste Methode zur Coenzymregenerierung dar.

So stellen Dehydrogenasen ideale Biokatalysatoren für asymmetrische Synthesen chiraler, enantiomerenreiner Substanzen aus prochiralen Vorstufen dar (Hummel & Kula, 1989). Einsatzgebiete sind derzeit vor allem die Produktion von Pharmazeutika, Feinchemikalien und Lebensmittelzusatzstoffen (Drauz *et al.*, 1994). Kommerziell gehandelte Enzyme wie zum Beispiel Alkohol Dehydrogenasen, Phenylalanin Dehydrogenase (Hummel, 1997), D- oder L-Lactat Dehydrogenasen oder D-Hydroxyisocaproinsäure Dehydrogenasen (Lerch *et al.*, 1989), wurden für die Präparation von optisch aktiven Substanzen mit Erfolg eingesetzt (Hanson *et al.*, 2000).

Am Beispiel der Synthese von enantiomerenreinen Aminosäuren durch die enzymatische reduktive Aminierung prochiraler α -Ketosäuren werden Aminosäure Dehydrogenasen wie die Leucin Dehydrogenase (LeuDH) aus *Bacillus* sp. (Bommarius & Drauz, 1994; Bommarius *et al.*, 1995; Wichmann *et al.*, 1981) und die Phenylalanin Dehydrogenase (PheDH) aus *Rhodococcus* sp. M4 mit Erfolg eingesetzt (Hummel *et al.*, 1987).

Eine Vielzahl neuer aliphatischen und aromatischen α -Aminosäurederivate, kann aufgrund der breiten Substratspektren der LeuDH und der PheDH mit hoher Enantioselektivität hergestellt werden (Krix *et al.*, 1997). Erfolgreich wurde die NAD-abhängige Leucin Dehydrogenase aus *Bacillus* sp. für die Synthese optisch aktiver Aminosäuren mit ungewöhnlichen Resten wie (S)-tert.-Leucin eingesetzt (Bommarius *et al.*, 1995). Das meist breite Substratspektrum dieser für die chemische Synthese einsetzbaren Enzyme wirkt sich vorteilhaft aus, da meistens die Enzyme für mehr als ein Substrat verwendbar sein sollten.

Das bei Dehydrogenasen notwendige Coenzym beeinträchtigt die Synthese nicht, da NAD^+ über einen längeren Zeitraum stabil (Janssen *et al.*, 1987; Oppenheimer & Kaplan, 1974; Wong & Whitesides, 1981) und durch die Regenerierung mit Formiat kostengünstig einsetzbar ist.

1.3 Die Phenylalanin Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. M4

Die Phenylalanin Dehydrogenase (PheDH) aus *Rhodococcus* sp. M4 katalysiert die oxidative Desaminierung von L-Phenylalanin zum Phenylpyruvat und Ammonium, dabei wird das Coenzym NAD^+ zum NADH reduziert (Abbildung 1) (Hummel *et al.*, 1987).

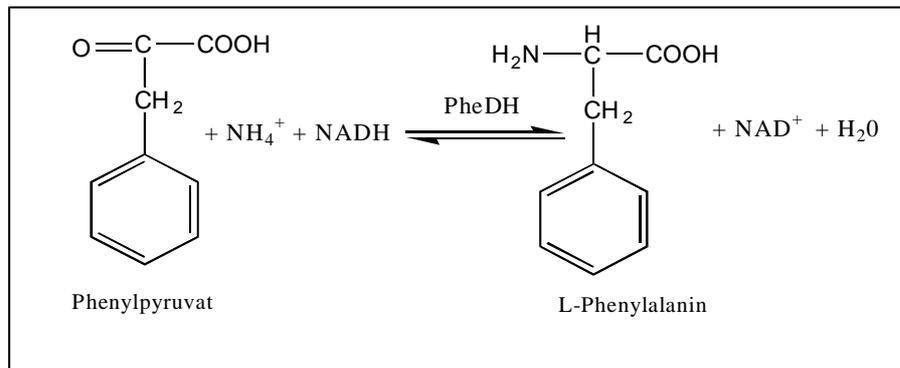


Abbildung 1: Reaktionsschema der Phenylalanin Dehydrogenase.

Das Enzym benötigt NAD^+ als natürliches Coenzym und wurde bei einigen gram-positiven, aeroben Bakterien gefunden. Anfänglich wurde die PheDH in *Brevibacterium* sp (Hummel *et al.*, 1984) und später in anderen Bakterienstämmen wie *Bacillus*, *Sporosarcina* (Asano *et al.*, 1987), *Nocardia* (de Boer *et al.*, 1989), *Thermoactinomyces* (Ohshima *et al.*, 1991), und *Rhodococcus* (Hummel *et al.*, 1987) gefunden. Die Phenylalanin Dehydrogenase gehört zu einer großen Aminosäure-Dehydrogenasen-Familie, zu der die Glutamat Dehydrogenase, Alanin Dehydrogenase, Leucin Dehydrogenase, und die selten vorkommende Lysin-Dehydrogenase gehören. Die PheDH kann für die Synthese von optisch aktivem L-Homophenylalanin, einem Baustein vom Angiotensin, für die Behandlung von Bluthochdruck (Hypertension) und Herzfehlern (Abrams *et al.*, 1984; Ondetti & Cushman, 1981) und ebenfalls für die Herstellung von Allysins als Vasopeptidase Inhibitor (Hanson *et al.*, 2000) sowie zur industriellen Synthese von L-Phenylalanin als Komponente von Aspartam (Wichmann *et al.*, 1981) verwendet werden. Ebenso kann das Enzym für den Nachweis der Phenylketonurie (Centerwall & Centerwall, 2000) mittels eines Biosensors eingesetzt werden (Wendel *et al.*, 1991; Wendel *et al.*, 1990).

Die Phenylalanin Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. M4 ist im Gegensatz zu den octameren Phenylalanin Dehydrogenasen aus *Bacillus sphaericus* (Okazaki *et al.*, 1988) und *Sporosarcina urea* (Asano *et al.*, 1987) ein Tetramer von 39.5 kDa pro Monomer (Brunhuber *et al.*, 1994). Die Phenylalanin Dehydrogenase aus *Thermoactinomyces* liegt als Hexamer vor (Takada *et al.*, 1991). In Abbildung 2 ist der Reaktionsmechanismus der Phenylalanin Dehydrogenase dargestellt (Brunhuber *et al.*, 2000). Die reduktive Aminierung des Phenyl-

pyruvats erfolgt über die Bildung von Iminophenylpyruvat, das in einem weiteren Schritt zu L-Phenylalanin reduziert wird.

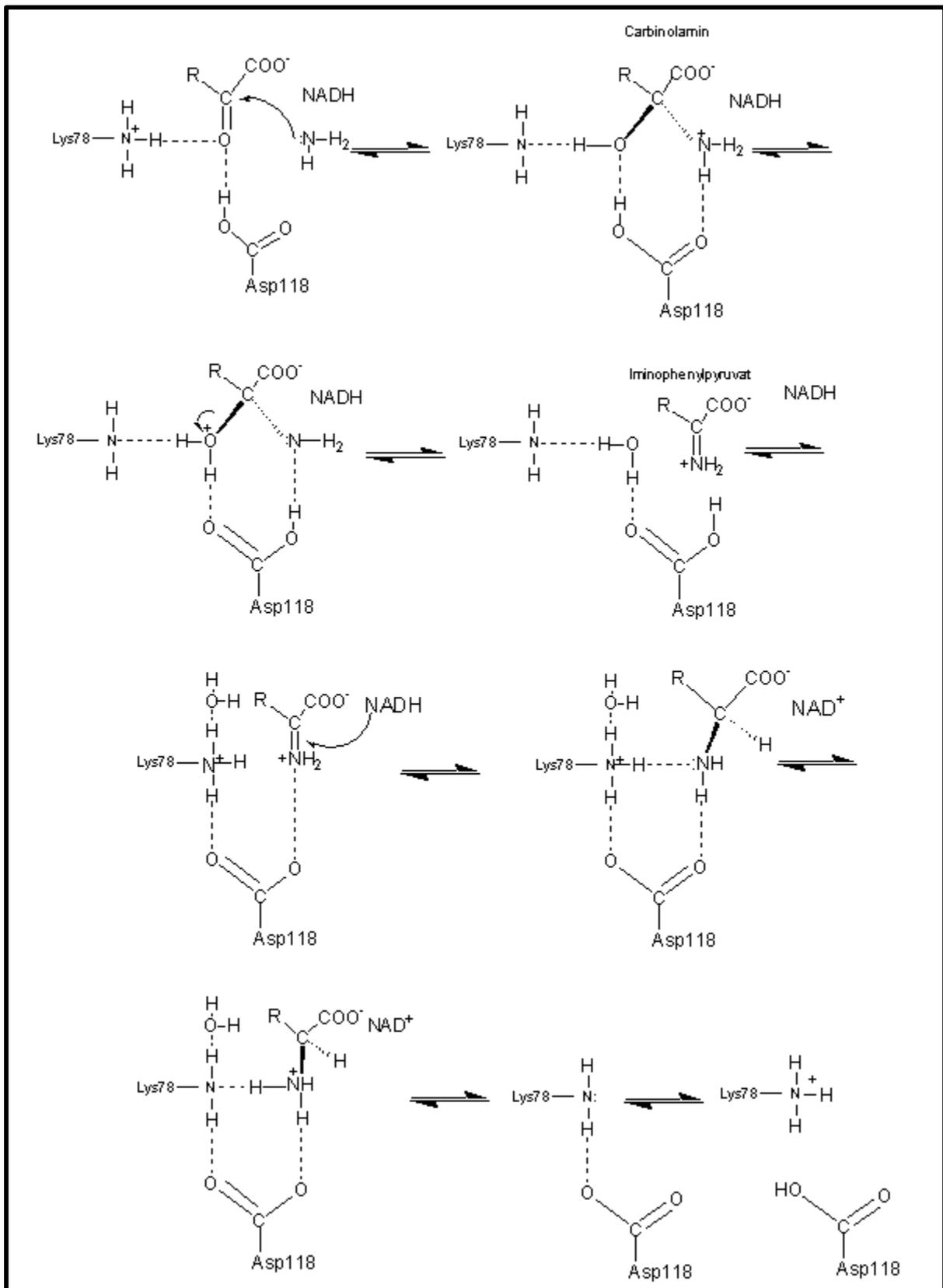


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus zur Aminierung von Ketosäuren und die dabei beteiligten Aminosäuren in der NAD-abhängigen Phenylalanin Dehydrogenase.

Die Kristallisation und Aufklärung der PheDH aus *Rhodococcus* sp. M4 wurde durch Vanhooke et al (Vanhooke *et al.*, 1999) ermöglicht. Basierend auf den Daten der dreidimensionalen Struktur konnte die PheDH mittels 3D-Programm (Swiss PDB Viewer) modelliert werden (Abbildung 3). Hervorgehoben sind die Aminosäure Lysin an Position 66 im aktiven Zentrum, die Lage des Substrates Phenylpyruvat und das Coenzym NAD^+ .

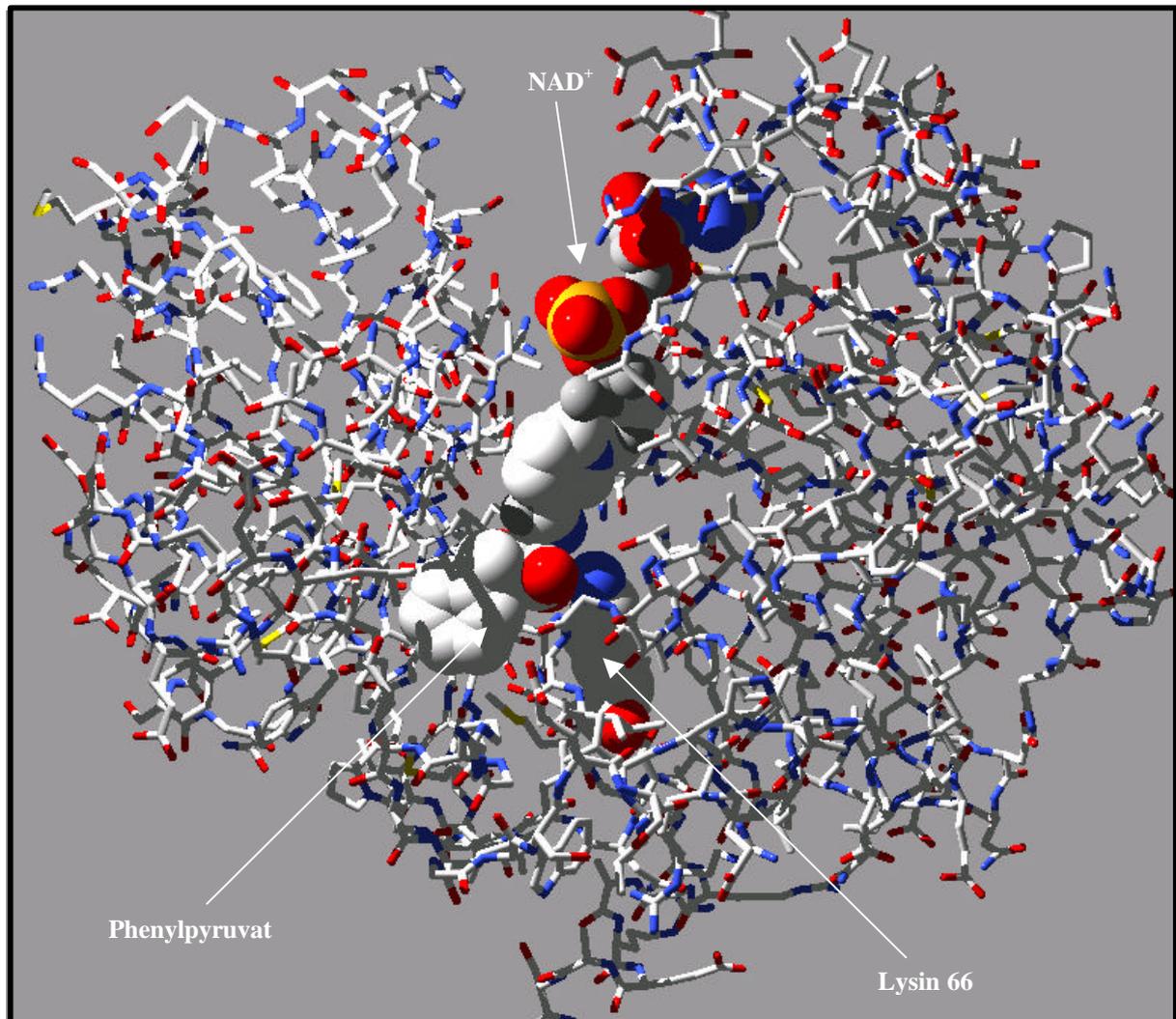


Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der NAD-abhängigen Phenylalanin Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. M4. Dargestellt ist das Enzym mit dem Substrat Phenylpyruvat ohne Coenzym und Inhibitor. Die Pfeile zeigen auf die Aminosäure Lysin 66, die im aktiven Zentrum beteiligt ist, sowie auf das Substrat im Substratkanal. Die tiefe Spalte ist ein typischer Substratkanal für Aminosäure Dehydrogenasen.

Zur Veranschaulichung sind die beteiligten Aminosäuren im aktiven Zentrum mit den Wasserstoffbindungen zum Substrat und Coenzym (NAD) in Abbildung 4 dargestellt.

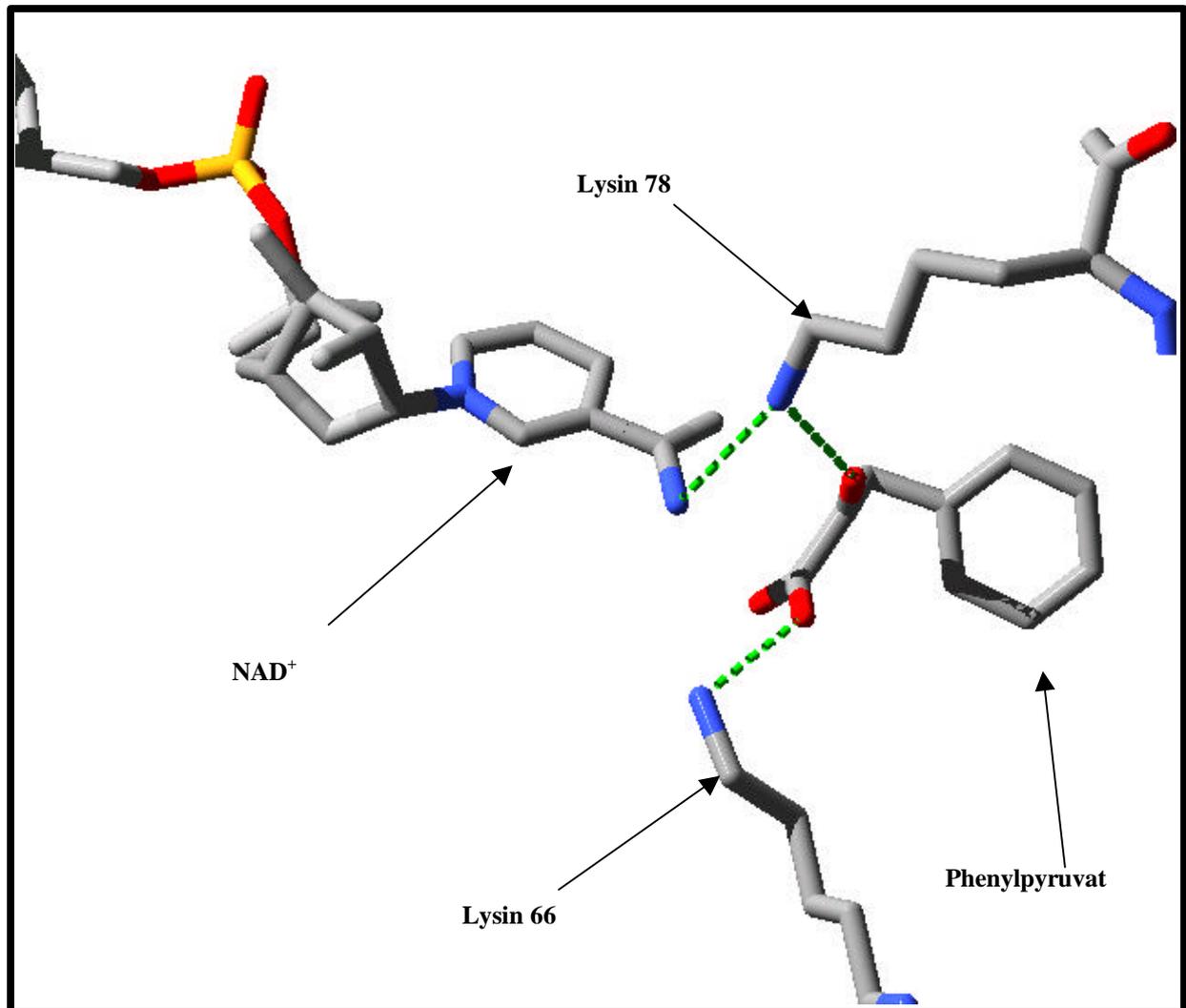


Abbildung 4: Die beteiligten Aminosäuren im aktiven Zentrum der PheDH. Die Aminosäure Lysin 66 ist die Bindungsstelle zur Carboxylgruppe im Phenylpyruvat

1.3.1 Malic enzyme aus *E. coli* K12

Das NAD abhängige malic enzyme ist in der Natur weit verbreitet und katalysiert die oxidative Decarboxylierung von L-Malat. Dieses Enzym gehört zur Klasse der Oxidoreduktasen und kann für die kolorimetrische Bestimmung von Malat und ebenfalls für die NADH-Regenerierung im Enzymreaktor eingesetzt werden (Nakamura *et al.*, 1986).

Das malic enzyme wurde sehr umfangreich in verschiedenen Organismen, in Bakterien (*Sulfolobus solfataricus* (Iwakura *et al.*, 1978), *Clostridium thermocellum* (Lamed & Zeikus, 1981), *Bacillus subtilis* (Diesterhaft & Freese, 1973), *Pseudomonas fluorescens* (Knichel & Radler, 1982), in Pflanzen *Zea mays*, *Solanum tuberosum* (Hausler *et al.*, 1987; Willeford & Wedding, 1987), und ebenfalls in höheren Organismen, Rattenleber (Bagchi *et al.*, 1987; Magnuson *et al.*, 1986; Winberry *et al.*, 1983) untersucht.

Das in dieser Arbeit klonierte NAD abhängige *E. coli* K12 malic enzyme zeigt Ähnlichkeit im Molekulargewicht (50 kDa) zum malic enzyme aus *Bacillus stearothermophilus* (Kobayashi *et al.*, 1989) aber einen Unterschied zum NADP-abhängigen malic enzyme aus *E. coli* (62 kDa) (Nakamura *et al.*, 1986).

1.3.2 L-Phenylalanin-Synthese unter Coenzymregeneration

Verschiedene Wege führen zur Produktion der Aminosäure L-Phenylalanin. Man kann dies durch chemische Synthesen, Extraktion von Protein-Hydrolysaten, fermentative oder enzymatische Methoden erreichen. Eine direkte Fermentation zur Produktion von L-Phenylalanin ist mit *Corynebacterium glutamicum* (Nakayama *et al.*, 1978) oder *Bacillus subtilis* (McEvoy & Joyce, 1974) beschrieben. Dennoch konnten mittels der Phenylalanin Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. M4 in einem Enzym-Membran-Reaktor $456 \text{ g L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ L-Phenylalanin erzielt werden (Hummel *et al.*, 1987). Die Synthese des L-Phenylalanins wurde durch die PheDH unter Regeneration des Coenzym NADH mit der Formiat Dehydrogenase (FDH) katalysiert. Phenylpyruvat wird in diesem System durch reduktive Aminierung mit Hilfe von PheDH in L-Phenylalanin umgewandelt. Gleichzeitig sorgt die FDH für die Regenerierung des NADH durch Formiat (Abbildung 5) (Hummel *et al.*, 1987). Für die Regenerierung des NADH im industriellen Maßstab wird bis dato die NAD-abhängige Formiat Dehydrogenase eingesetzt (Kula & Wandrey, 1987; Shaked & Whitesides, 1980). Das Verfahren konnte großtechnisch angewandt werden (Kragl *et al.*, 1992).

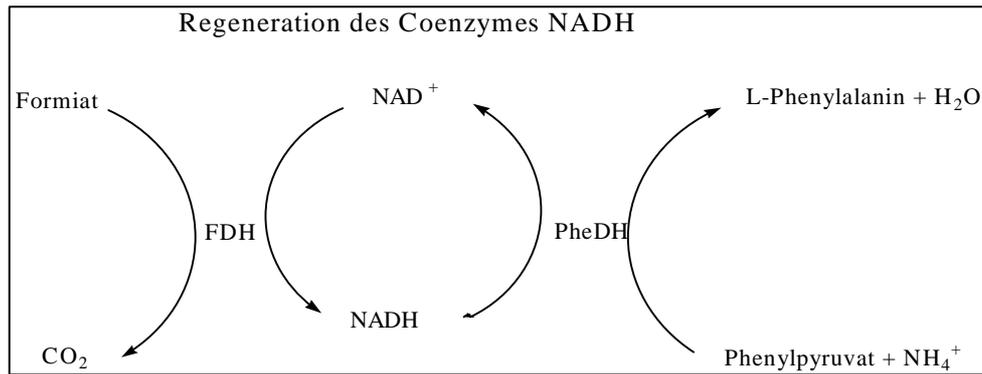


Abbildung 5: Schema zur Synthese von L-Phenylalanin unter Regeneration des Coenzym NADH mittels Formiat Dehydrogenase.

1.3.3 Expression rekombinanter Proteine

Die Möglichkeit, Proteine, die normalerweise entweder gar nicht oder nur in extrem geringen Mengen verfügbar waren, in großen Mengen herzustellen, beeindruckte Wissenschaftler, Ärzte und Geschäftsleute gleichermaßen. Im Jahre 1976 hielt die Gentechnik Einzug in die Biotechnologie. Erstmals wandte man die Verfahren der DNA-Klonierung, Oligonucleotidsynthese und Genexpression in einem einzelnen Experiment an, bei dem man ein menschliches Protein durch die Expression einer rekombinierten DNA gewann. Es handelte sich um den aus 14 Aminosäuren bestehenden Peptidneurotransmitter Somatostatin (Itakura *et al.*, 1977). Das Gen des entsprechenden Proteins wurde in einem Plasmid kloniert und in *E. coli* exprimiert. Wenig später gelang die Expression des menschlichen Insulins (Nossal, 1980), das zur Behandlung des Diabetes dient und zum ersten kommerziell genutzten Produkt der Gentechnik wurde.

Solche Meisterleistungen beruhten auf Erfolgen in allen Bereichen der Molekularbiologie, unter anderem der Oligonucleotidsynthese, der Isolierung der DNA-spaltenden und verknüpfenden Enzyme, der Charakterisierung bakterieller Plasmide und der Erforschung der Genexpression.

Eine Vielfalt an Expressionsplasmiden ist kommerziell erhältlich. Die Minimal-Ausstattung solcher Plasmide besteht aus einem Promotor, einer Ribosomenbindungsstelle, dem *Origin of Replication*, und einem Selektionsmarker. Dennoch führt der Abbau oder die chemische Modifizierung des Antibiotikums durch das Produkt des Resistenzgens oder den Wirtstamm oft zur Reduktion der Plasmidkopienzahl in der Zelle und begünstigen die Entstehung heterogener Organismenpopulationen (Bentley *et al.*, 1993).

Für die Verbesserung solcher Systeme wurden spezielle DNA-Sequenzen bezüglich Plasmidstabilität, mRNA-Stabilität, effizienter Translationsinitiation, und rechtszeitiger Transkriptionstermination entwickelt (Balbas & Bolivar, 1990). Beispiele solcher Sequenzen bilden Repressorgene, Terminatoren, Antiterminatoren, Sekretionsgene und Reportgene (Stader, 1995). Die Stabilität des Fremdgens oder Plasmids (Segregationsstabilität), wird durch hohe Kopienzahl, *par*-Sequenzen und Selektionsmarker gefördert (Balbas & Bolivar, 1990). Durch die Einführung einer *par*-Sequenz kann die Segregationsstabilität eines Expressionsvektors erhöht werden (Zurita *et al.*, 1984). Einfluß üben außerdem die Transkriptionsaktivität des Fremdgens und die genetischen Eigenschaften des Wirtsorganismus (Stader, 1995) sowie die Zusammensetzung des Kulturmediums aus (Mason & Bailey, 1989).

Die Klonierung des Gens der cDNA eines Proteins ist nur der erste von vielen Schritten, um gentechnisch ein Protein für medizinische oder industrielle Anwendungen herzustellen. Der nächste Schritt besteht darin, das Gen in eine Wirtszelle einzuschleusen und es darin zu exprimieren. Die bekanntesten Expressionssysteme sind die Bakterien *E.coli* und *Bacillus subtilis*, die Hefe, sowie kultivierte Insekten- und Säugetierzellen. Welches System geeignet ist, hängt von den Projektzielen und den Eigenschaften des zu produzierenden Proteins ab.

Bakterienzellen sind einfache Systeme mit kurzer Generationszeit, hoher Ausbeute und niedrigen Kosten. Die Zellen, insbesondere von *B. subtilis*, lassen sich induzieren und schleusen das Produkt in das Kulturmedium aus, was die Reinigung des Proteins außerordentlich vereinfacht. Allerdings haben prokaryotische Zellen auch einige Nachteile.

Manche Proteine werden zwar extrem stark exprimiert (sie können mehr als 20 % der Masse aller Bakterienproteine ausmachen), aber oft falten sie sich nicht korrekt, und bilden dann unlösliche Einschlusskörper (inclusion bodies) (Hibino *et al.*, 1994). Diese Proteine kann man zwar durch Extraktion gewinnen, sie sind allerdings in aller Regel biologisch inaktiv. Kleine Proteine lassen sich unter Umständen in ihre aktive Form überführen (Babbitt *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1993), bei großen Produkten ist das jedoch normalerweise nicht möglich. Ein zweites Problem ist, dass Fremdproteine für Bakterien manchmal toxisch sind wie z.B. Aminosäure-Oxidasen, sodass Kulturen, die das Protein herstellen, nicht in hoher Dichte wachsen können. Diese Schwierigkeit lässt sich oft durch einen induzierbaren Promotor umgehen. Wenn die Kultur dicht gewachsen ist, schaltet man den Promotor an, der daraufhin mit der Transkription des Gens für das toxische Fremdprotein beginnt.

Drittens fehlen den Bakterien jene Enzyme, die Proteine in Eukaryotenzellen nach der Translation modifizieren, indem sie ihnen beispielsweise Phosphatgruppen oder Zuckerreste anhängen. Derartige chemische Modifikationen sind häufig notwendig, damit die Proteine Aktivität zeigen. Eine Möglichkeit zur posttranslationalen Modifikation besteht darin, die modifizierenden eukaryotischen Enzyme zu reinigen und mit ihnen bakteriell exprimierte Proteine nachträglich abzuwandeln.

1.4 Protein-Design

1.4.1 Gezielte Mutagenese

Die Nutzung von Mikroorganismen und der daraus gewonnenen Enzyme erhalten neue Aspekte durch die Gentechnik, mit denen sowohl neue Produkte herstellbar werden, als auch erhebliche Verbesserungen in Ausbeute und Qualität bei konventionellen Produkten zu erwarten sind.

Mittels NMR-Techniken und Röntgenstrukturanalyse wurde die Ermittlung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins ermöglicht, und durch den Einsatz von Computertechnik gezielt Veränderungen vorgenommen.

Über die gezielte Verknüpfung dieser Strukturaufklärung mittels Computertechnik mit den neuen Kenntnissen der Biochemie und der Molekularbiologie können wirtschaftlich interessante Enzyme untersucht und modifiziert werden. So wurden Enzymvarianten hergestellt, die sich durch überlegene Eigenschaften, wie z.B. höhere Aktivität, bessere Stabilität, erweitertes Substratspektrum oder Coenzympezifität auszeichnen (Galkin *et al.*, 1997; Slusarczyk *et al.*, 2000). Einige veränderte Enzyme können so technisch interessante Chemikalien bis zu 10000x besser umsetzen, als die natürliche Form des Enzyms (Wilkinson *et al.*, 1984). Statt tausender von Proteinen auf mögliche Wirksamkeit zu testen, versucht man mit Hilfe des Protein-Designs eine neue maßgeschneiderte Struktur am Computer zu entwerfen. Diese neumodifizierten Enzyme werden dann mit molekularbiologischen Methoden hergestellt und hinsichtlich Struktur und neuer Eigenschaften untersucht. Für den Einsatz eines erfolgreichen rationalen Designs müssen vorab tiefgehende Informationen über Struktur und Reaktionsmechanismus vorliegen. Abbildung 6 zeigt den Zyklus, wie er normalerweise durchgeführt wird.

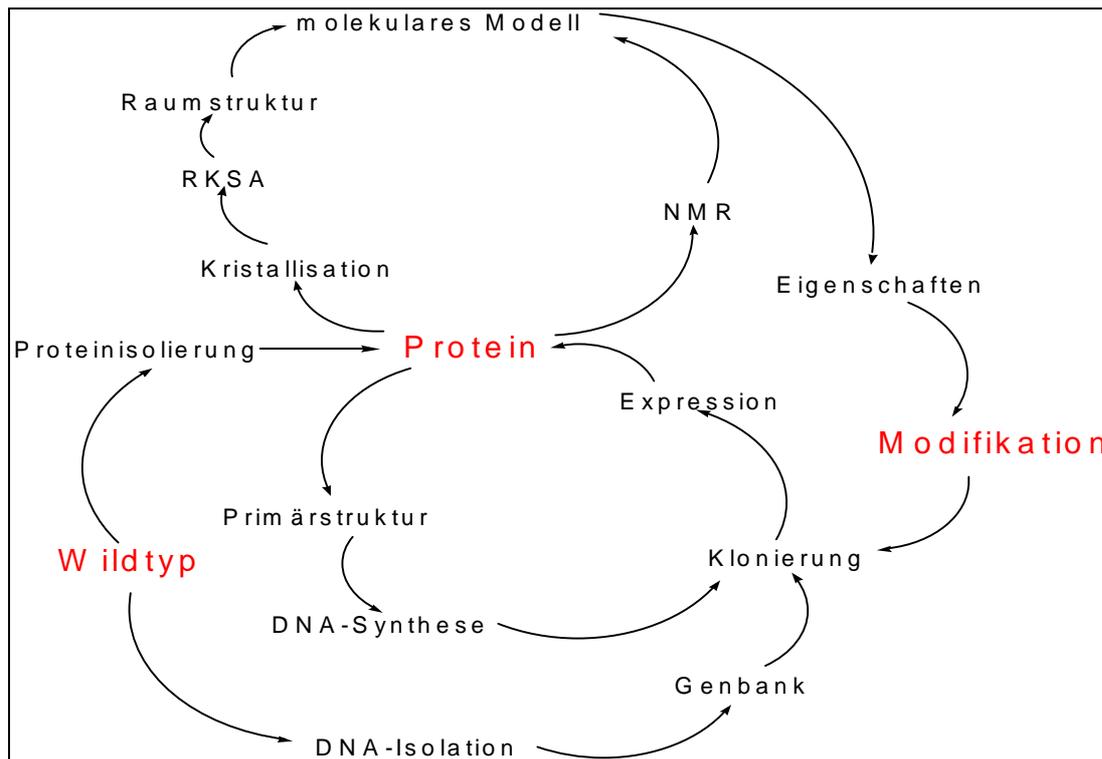


Abbildung 6: Protein-Design Zyklus zur gezielten Mutagenese eines Enzyms

(RKSA = Röntgenstrukturanalyse)

Die Überlegung, dass durch die Senkung der Entfaltungsentropie mittels ausgewählter Aminosäuresubstitutionen die Konformation des T4-Lysozyms stabilisiert werden kann, haben Matthews et al. (Matthews *et al.*, 1987) durch die Erzeugung einer Doppelmutante nachgewiesen und somit die Thermostabilität dieses Proteins erhöht. In einer folgenden Arbeit wurde durch die Einführung von zwei Disulfidbrücken an definierten Stellen im Lysozym, das heißt Austausch von vier Aminosäuren, die strukturell günstig für eine Ausbildung lagen, die Thermostabilität von 41°C auf 58°C erhöht, wobei das neu entstandene Enzym die volle Aktivität besaß (Matsumura *et al.*, 1989).

Vacca et al. (Vacca *et al.*, 1995) konnten durch den Austausch von Tryptophan 140 gegen Histidin mittels gezielter Mutagenese die Reaktions- bzw. Substratspezifität der Aspartataminotransferase verändern. Dadurch kann Alanin siebenmal schneller als durch das Wildtypenzym racemisieren, während die Aktivität des Muteins gegenüber Alanin sechsfach abnahm.

Die benötigte exakte Aufklärung der Struktur eines Enzyms ist ein Nachteil der gezielten Mutagenese, da sich die Strukturen bekannter Proteine nicht auf andere mit ähnlichen Sequenzmotiven übertragen lassen.

1.4.2 Zufallsmutagenese

Die Methode der „Zufallsmutagenese“ (random mutagenesis), bei der ein großer Pool an Veränderungen in ein Enzym eingeführt wird, ist eine gute Alternative zum rationalen Protein-Design. Um das Screening der durch die Zufallsmutagenese hergestellten Enzymvarianten- Bibliothek ermöglichen zu können, sind geeignete und effektive Selektionsmechanismen notwendig. Mit geeigneten Methoden können die gewünschten Eigenschaften detektiert werden. Es wird eine Art künstlicher Evolution herbeigeführt (Arnold & Moore, 1997), bei der man den Selektionsdruck zur Verbesserung der Eigenschaften zu Hilfe nimmt (Bornscheuer *et al.*, 1998; Bornscheuer *et al.*, 1999).

Diese Methode wurde zur Erhöhung der Temperaturstabilität (Bryan *et al.*, 1986) bzw. der pH-Stabilität (Cunningham & Wells, 1987) von Enzymen oder zur Erhöhung der Resistenz (Oliphant & Struhl, 1989) erfolgreich angewandt. Durch den Austausch von Asparagin 218 gegen Serin konnte die Thermostabilität der Serin-Protease Subtilisin aus *Bacillus amyloliquefaciens* im Vergleich zum Wildtyp um das vierfache gesteigert werden (Bryan *et al.*, 1986). Hier erfolgte die Mutagenese durch Zugabe von Natriumbisulfit, das zur Desaminierung von Cytosin zu Uracil führte. Das Screening nach diesem Mutein erfolgte über ein geeignetes Subtilisinsubstrat und einen pH-Indikator auf Agarplatten, so dass beim Abbau des Substrates eine pH-Senkung stattfand und sich somit die Farbe des Indikators änderte. Zhou *et al.* verwendeten für die Erhöhung der Thermostabilität des Subtilisins die Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR) (Zhou *et al.*, 1996), konnten damit allerdings die gleichen Punktmutationen wie Bryan *et al.* nachweisen. In einer anschließenden gezielten Mutagenese wurde eine weitere Aminosäure substituiert und somit eine Doppelmutante erzeugt, die sowohl thermostabil als auch oxidationsresistent ist. Arnold *et al.* bewirkte eine Verbesserung der Thermostabilität der *Bacillus subtilis*-Protease – Subtilisin E und erhielten somit eine ähnliche Thermostabilität wie bei der *Thermoactinomyces vulgaris*- Thermitase (Zhao & Arnold, 1999). Mit der „error-prone“ Methode konnte ebenfalls die Aktivität vom Subtilisin E auf das 16 fache erhöht werden (You & Arnold, 1996).

Die gerichtete Evolution als erfolgreiches Konzept zeigen die folgenden Beispiele:

p-NB-Esterase: 3 Mutationen / höhere Aktivität in org. Lösungsmittel (Moore *et al.*, 1997)

Subtilisin E: 8 Mutationen / 1000 x höhere Halbwertszeit bei 65°C (Zhao *et al.*, 1998)

Die Zufallsmutagenese hat folgende Vorteile:

1. keine Strukturinformation nötig
2. schnellerer Optimierungsprozeß
3. mehrere unspezifische Mutationen/Generationen sind möglich

1.5 Hochzelldichte-Fermentation (HZD)

Um die durch kontinuierliche Zuführung ein oder mehrerer Nährstoffe während der Fermentation auftretende Katabolit-Repression und Anreicherung toxischer Substanzen vermeiden zu können, erfolgt die Kultivierung rekombinanter Mikroorganismen in der Regel mittels der fed-batch-Technologie.

Die HZD-Fermentation dient zur Verbesserung der Produktivität mikrobieller Systeme, der Reduktion von Produktions- Investitionskosten und Kulturvolumina (Knorre *et al.*, 1991). Ebenso können Sauerstoffverbrauch und die Wärmeentwicklung durch die Limitierung der Wachstumsrate kontrolliert werden (Riesenberg, 1991). Dennoch führen die Substratlimitation und -inhibition, Limitierung der Sauerstoffversorgung und Wärmetransfer, CO₂ -Konzentration sowie die Bildung metabolischer Nebenprodukte zu Problemen bei der HZD-Fermentation (Riesenberg *et al.*, 1991).

Metabolische Nebenprodukte: Die Bildung von Nebenprodukten hängt von der Zusammensetzung des Mediums, dem Wirtstamm und der spezifischen Wachstumsrate ab (Pan *et al.*, 1987). Unvollständig oxidierte Nebenprodukte wie Acetat, Lactat, Pyruvat, Ethanol und Isobutyrat werden von *E. coli* Kulturen, deren Dichte über 40 g Biomasse pro Liter Medium beträgt, akkumuliert (Landwall & Holme, 1977; Paalme *et al.*, 1990). Dieser Effekt ist durch die Bildung von Salzen im Medium zu beobachten (Jensen & Carlsen, 1990). Nach Lee *et al.* führt insbesondere das Nebenprodukt Acetat zur Inhibition des Wachstums, infolgedessen wird die Produktion des heterologen Proteins vermindert (Lee, 1996).

CO₂-Konzentration: Verminderte Wachstumsrate sowie die Bildung metabolischer Nebenprodukte können bei CO₂-Partialdrücke oberhalb 0,3 atm beobachtet werden (Pan *et al.*, 1987).

Sauerstofftransfer: Da das Wachstum rekombinanter *E.coli*-Zellen unter aeroben Bedingungen erfolgt, sollte der Sauerstoff-Partialdruck nicht unter 10 % sinken. Dennoch wächst das Problem der Sauerstoff-Transferrate bei großen Fermentervolumina aufgrund der Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser, die auf maximal 200 mmol O₂ pro Liter limitiert ist (Riesenberg, 1991).

Substratinhibition: Die Inhibierung des Wachstums wird durch Substratkonzentrationen oberhalb bestimmter Grenzwerte verursacht. Hefeextrakt oder Pepton, die komplexe Verbindungen darstellen, sind nur in geringer Konzentration löslich (Riesenberg & Guthke, 1999).

Fermenter-Durchmischung: Bei mangelhafter Durchmischung großer Fermenter sind Zellen, die sich nahe der Nährstoff-Injektionsstelle befinden, erhöhten Nährstoffkonzentration ausgesetzt, während an anderen Stellen Nährstoffmangel herrschen kann. Sowohl der Mangel als auch der Überschuss bewirken eine Verringerung der Zellausbeute (Neubauer *et al.*, 1995)

2 Problemstellung und Zielsetzung

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war, sowohl die NAD-abhängige Phenylalanin Dehydrogenase (PheDH) aus *Rhodococcus* sp. M4 als auch das malic enzyme aus *E.coli* K12 zu klonieren. Die Klonierung dieser zwei Enzyme im gleichen Plasmid sollte die Grundlage für die reduktive Aminierung von α -Ketosäuren und gleichzeitig die Regeneration des Coenzym mittels Ganzzell-Biotransformation ermöglichen. Ein weiteres Ziel war die Erweiterung des Substratspektrums der PheDH durch Mutagenese.

Der Faktor, der die Effektivität der NADH-Regeneration im Produktionsprozeß herabsetzt, ist die schwache Aktivität und die mangelnde Stabilität des üblicherweise verwendeten Regenerationsenzym Formiat-Dehydrogenase (FDH). Die erforderliche Nachdosierung des Coenzym während des Prozesses erhöht die Produktionskosten signifikant. Um die Wirtschaftlichkeit des Verfahren zu erhöhen, wird in dieser Arbeit das malic enzyme aus *E. coli* K12 als eine Alternative zur FDH für die Regeneration kloniert und überprüft.

Die Klonierung des zweiten Enzyms – die rec-PheDH - soll eine Grundlage für die Mutagenese schaffen. Die Erweiterung des Substratspektrum der PheDH, wird mittels gezielter Mutagenese bzw. Zufallsmutagenese durchgeführt. Die Sequenz der PheDH wird mit bekannten Aminosäuresequenzen verglichen und die Bindungsstellen sowie die

Interaktionen zwischen den Aminosäurenresten im aktiven Zentrum der PheDH zum Substrat bestimmt. Mit Hilfe der Kristallisationsdaten der PheDH wird die PheDH modelliert und ein Proteindesign durchgeführt.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war, Einblicke in den Reaktionsmechanismus der PheDH und Aufschluss über die Struktur–Funktionsbeziehungen dieses Enzyms zu gewinnen. Hierbei sollte das aktive Zentrum der PheDH mit dem der Lactatdehydrogenase verglichen und eventuelle Mutagenese durchgeführt werden.

Für die Erweiterung des Substratspektrums werden Mutationen in der PheDH mit Hilfe verschiedener Methoden eingeführt, um somit die Konstruktion einer neuen Amin-Dehydrogenase für die Herstellung von aromatischen Aminen aus aromatischen Ketonen zu erreichen.

3 Material

Geräte

Analytik-Apparaturen

Gaschromatograph

Shimadzu

HBLC-System

Gynkotek (Germering)

GC-9A

Shimadzu (Düsseldorf)

NMR-ARX500

Bruker

Robocycler

Stratagene

Bildverarbeitung

Eagle Eye II, Videosystem

Stratagene (Heidelberg)

Fraktionssammler Frac 100

(Pharmacia)

Disintegration

Schwingkugelmühle

(Retsch)

Disintegrator S

IMA

Ultraschallgerät

Branson

Dialyse und Ultrafiltration

Ultrafiltrationskammer 8050, 8010

Amicon

Fermentation

20 L-Bioreaktor Biostat

Braun

Contifuge 300 MD

Heraeus Christ

Elektrophorese

Gel elektrophorese GNA 100

Pharmacia (Freiburg)

Gelelektrophorese Horizon 11.14

Life Technologies (Eggenstein)

Prep Cell

Biorad

Küvetten

Mikroküvetten (50 µl), Quarzglas

Hellma (Müllheim/Baden)

Halbmikroküvetten (1 ml), optisches Glas

Hellma (Müllheim/Baden)

Fluoreszenzhalbmikroküvetten(1 ml), Quarzglas

Hellma (Müllheim/Baden)

Photometer

UV/Vis-Spektralphotometer 16 A

Shimadzu (Duisburg)

UV/Vis-Spektralphotometer DU 650

Beckmann (Düsseldorf)

Fluoreszenzphotometer LS 50 B

Perkin Elmer (Düsseldorf)

Zentrifugen

Eppendorf-Zentrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments (Bad Homburg)
Vacuumzentrifuge	(Univapo 150 H)
+Kühlfalle	(Unicryo MC1L)

Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien für Lösungen und Puffer waren mindestens von analytischer Qualität (p.a.) und wurden in der Regel von Fluka, Sigma, Roth oder Merck bezogen.

Nährmedienbestandteile waren von Merck oder Difco, die Coenzyme von Bts.

Enzyme für die Molekularbiologie wurden von NEB, Pharmacia, Biozym, Stratagene oder Roche bezogen. Die Chemikalien für molekularbiologische Untersuchungen waren von höchster Qualität. Die genannten Chemikalien wurden in „ultra pure“ Qualität eingesetzt.

Acetonitril	Applied biosystems (Weiterstadt)
EDTA	Pharmacia (Freiburg)
Acrylamid	Biorad (München)
Bis-Acrylamid	Biorad (München)
APS	Biorad (München)

Nucleotide/Nucleinsäuren

dATP, dGTP, dTTP, dCTP	Pharmacia (Freiburg)
------------------------	----------------------

DNA-Molekulargewichtsmarker:

- A. DNA-Marker IV [Boehringer]
- B. DNA-Marker VI [Boehringer]
- C. DNA-Marker VII [Boehringer]
- D. DNA-Leiter [Gibco]

Enzyme

BamHI, NcoI, StuI, EcoRI, HindIII, pStI, NdeI, SmaI	Biolabs
RNaseA	Roth (Karlsruhe)
Taq-DNA-Polymerase (10 U/μl)	Finnzyme
Ligase	Roche
Alkalische Phosphatase	Promega (Heidelberg)

Mikroorganismen

<i>E. coli</i> BL21	[<i>hsdS gal (?cIts857 ind1Sam7 nin5 lacUV5)</i>]
<i>E. coli</i> DH5?	[<i>supE44 ?lacU169 ?80lacZ? M15) hsdR17 recA1 gyrA96 thi-relA1</i>]
<i>E. coli</i> HB101	[<i>supE44 hsdS20 (rB- mB-) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20xyl-5mtl-1</i>]
<i>E. coli</i> JM105	[<i>subE endA sbcB15 hsdR4 rpsL(str^r) thi ? (lac-proAB) F(traD36proAB⁺ lacI^q lac? ZM15)</i>]
<i>E. coli</i> JM109	[<i>recA1 sup E44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi ? (lac-proAB) F'(traD36proAB⁺ lacI^q lacZ? M15)</i>]
<i>E. coli</i> XL1-Blue	[<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^q lacZ? M15 Tn10(tet^r)</i>]

Vektoren

pKK223-3	[4,584kb, <i>ColE1</i> -Replicon, <i>P_{tac}</i> , <i>Amp^r</i>]
pTRC99a	[4,176 kb, <i>ColE1</i> -Replicon, <i>P_{trc}</i> , <i>lacI^q</i> , <i>Amp^R</i>]
pUC18	[2,686 kb, <i>ColE1</i> -Replicon, <i>lacZ'</i> , <i>lacI</i> , <i>Amp^R</i>]
pET-16b	[5,711 kb, <i>His.Tag</i> , <i>T7</i> , <i>Amp</i>]

Kits für die Molekularbiologie

Sure clone Kit	Pharmacia
Plasmid Präparation	Qiagen
DNA Extraktion	Qiagen
Auto Read Sequencing Kit	Pharmacia
Rapid DNA Ligation Kit	Roche

4 Methoden

4.1 Molekularbiologie

4.1.1 Isolierung der genomischen DNA

Sowohl die genomische DNA von *Rhodococcus* sp. M4 für die Isolierung der Phenylalanin Dehydrogenase als auch die des *E. coli* K12 für malic enzyme, wurden nach van Soolingen *et al.* isoliert (van Soolingen *et al.*, 1991). Dafür wurden Kulturen mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und bei 30°C und 120 rpm bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ ca. 0.7 wachsen gelassen.

Die Kultur wurde für 30 min bei 80°C erhitzt und dann abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach dem Resuspendieren wurden die Zellen mit 0.5 ml Lysozym (10 mg/ml) behandelt, und für 30 min bei 37°C inkubiert.

1.5 ml 10 %iges SDS und 120 µl Protease K (10 mg/ml) wurden zugefügt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Durch diese Behandlung konnten die Proteine denaturiert und ausgefällt werden. Um die restlichen Proteine und Lipide zu fällen, wurde die Lösung mit 1 ml 5 M NaCl und 1.5 ml N-Cetyl-N,N,N-trimethylammonium Bromid/NaCl, (4.1 g NaCl, 10 g N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium Bromid in 100 ml H₂O), versetzt. Der ganze Ansatz wurde gut vermischt und für 20 min bei 65°C inkubiert.

Die DNA wurde durch ein äquivalentes Volumen von CHCl₃ / Isoamyl Alkohol (24:1) nach Zentrifugation extrahiert. Der Vorgang wurde zweimal durchgeführt, um die DNA vollständig zu isolieren.

Die DNA aus der wässrigen Phase konnte durch 0.6 Vol. Isopropanol bei -20°C für 30 min gefällt werden. Danach wurde sie abzentrifugiert und das erhaltene DNA-Pellet mit 2 ml 70%igem kalten Ethanol gewaschen.

Da Ethanol spätere Reaktionen inhibieren könnte, wurde die DNA durch Zentrifugation im Vakuum (vacuum speed univapo) getrocknet.

Zum Nachweis der Reinheit der DNA können zwei Methoden eingesetzt werden:

1. Absorption bei 260 und 280 nm
2. durch Gelelektrophorese (0.5 % Agarose)

4.1.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten über Elektrophorese

Die Agarose wurde durch Aufkochen in der gewünschten Konzentration (0,8-1,2 %) in 1xTBE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit 1/20000 Volumen an Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in horizontale Kammern gegossen. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Probenpuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit 1xTBE-Puffer gefüllten Kammer. Die Ethidiumbromidfluoreszenz wurde im UV-Durchlicht (312 nm) mit dem Videosystem „Eagle Eye II“ (Stratagene) aufgezeichnet.

6X Probenpuffer: 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau

TBE-Puffer: 90 mM Tris-HCL, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH8,2

Als Größenstandard für die DNA- Gelelektrophorese wurde die kB-Leiter der Fa. Gibco benutzt.

10X TBE-Puffer:

Tris 121.12 g

Borsäure 51.32 g

EDTA 3.72 g

Probenvorbereitung:

Die zu trennende DNA-Lösung wurde mit einfach DNA-Probenpuffer [Endkonzentration] pH 8.0 versetzt.

DNA-Probenpuffer [6fach]:

6xTBE; 50 % (v/v) Glycerin; 0.25 % (w/v) Bromphenolblau

4.1.3 Ethanolfällung

Zur Konzentrierung und Reinigung von DNA-Lösungen wurden diese mit 2 Vol. Ethanol und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 4.8 versetzt, 30 min. bei -20°C inkubiert und 20 min. bei 4°C und 13000 rpm abzentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde zweimal mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in Aq. bidest oder TE-Puffer, pH8.0 (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA) resuspendiert.

4.1.4 Polymerase Ketten Reaktion [PCR]

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) bietet die Möglichkeit, gezielt spezifische DNA-Fragmente zu amplifizieren. Durch entsprechende Geräte [Robocycler, Stratagene] ist die Reaktion komplett automatisiert. Durch Zugabe von genomischer DNA oder Plasmiden zusammen mit für ein DNA-Stück spezifischen Primern wird dieses DNA-Stück durch die Taq-Polymerase [*Thermus aquaticus*] amplifiziert. Da die Taq-Polymerase die hohen Denaturierungstemperaturen von 94°C übersteht und diese Temperatur für die Aufspaltung der doppelsträngigen DNA benötigt wird, ist es möglich, über viele Zyklen eine Amplifikation zu erreichen. Innerhalb jedes Zyklus erhöht sich exponentiell die Zahl des Template, da jedes neu gebildete Template Ausgangsmaterial für das nächste wird. Ein Zyklus besteht aus einem Denaturierungsschritt [94°C], einem Annealingschritt, in dem die Primer an das Template binden [Temperaturvariabel] und einem Amplifizierungsschritt [72°C], bei dem die Polymerase aktiv ist.

Der Reaktionsansatz aus:

10 mM	Tris pH 8.3
50 mM	KCl
1.5 mM	MgCl ₂
jeweils 200 µM	dATP, dCTP, dTTP, dGTP
20-40 pmol	jedes Oligonucleotid-Primers
2.5 U	Taq-Polymerase pro 100 µl Ansatz
10 ng	Plasmid-DNA als PCR-Template

Die PCR Amplifikation wurde auf einem automatischen DNA-Thermal-Cycler (Robocycler, Fa. Stratagene) nach folgendem Programm durchgeführt.

- ☞ 5 min Denaturierung bei 94°C (zu Anfang des Programms 1x)
- ☞ 1.2 min Annealingsschritt, in dem die Primer an das Template binden
- ☞ 1.5 min Extension (Verlängerung der Primer durch die Taq-Polymerase) bei 72°C [Temperaturvariabel].
- ☞ 1 min Denaturierung bei 95°C
- ☞ Zyklisches Wiederholen der letzten drei Schritte (25-30x)
- ☞ 5 min Extension (nach Abschluß der PCR, um eine vollständige Verlängerung eventuell vorher abgebrochener DNA-Produkte zu gewährleisten)

4.1.5 Berechnen der Schmelztemperatur der Primer

Die Schmelztemperatur T_m der Primer wurde nach Thein und Wallace (Thein & Wallace, 1988) abgeschätzt:

$$\text{Schmelztemperatur } T_m [^\circ\text{C}] = 2x(\text{Basenzahl A+T}) + 3x(\text{Basenzahl G+C})$$

Diese Bezeichnung gilt für Primerlängen ≥ 24 bp.

Für Primerlängen ≥ 14 bp gilt [MWG-Biotech]:

$$\text{Schmelztemperatur } T_m [^\circ\text{C}] = 69.3^\circ\text{C} + 0.41 \times (\text{GC-Gehalt [\%]} - 650 / \text{Primerlänge})$$

$$\text{Annealingtemperatur } T_a [^\circ\text{C}] = T_m + 3^\circ\text{C}$$

4.1.6 Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen

Die aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Banden können auch über spezielle Membransäulen aus dem Gel eluiert werden. Das dreifache Volumen des Gelstückgewichts an Puffer QX1 [keine Herstellangaben] wird hinzugegeben, und die Probe unter einmaligem Schütteln 10min bei 50°C inkubiert. Die Lösung wird auf eine Qiaquick-Zentrifugationssäule gegeben und 60sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen und die Säule durch erneute Zentrifugation mit 0.75 ml Puffer PE gewaschen und durch nochmalige Zentrifugation Reste des Puffers von der Membran der Säule entfernt. Abweichend von den Herstellerangaben wurde jedoch zur Elution 50 μl H_2O (pH 8.0) verwendet. Die eluierte DNA wurde über Einengen in der Vakuumzentrifuge auf die gewünschte Konzentration gebracht und weiterverarbeitet. Eine zweite Methode zur Isolierung der DNA- Fragmente erfolgte ebenso nach einem Qiagen Kit, mit dem man die komplette PCR-Lösung mit fünffachem Puffer PB [keine Herstellungsangaben] verdünnt und in eine Qiaquick Säule pipettiert. Die Säule wird zusammen mit einem Auffanggefäß 60 sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA kann nun mit 0.75 ml PE-Puffer [Ethanol] gewaschen. Dabei werden durch nochmalige Zentrifugation (60 sec., 13000 rpm) sämtliche Reste des PE entfernt. Anschließend wird die DNA mit 50 μl 1mM Tris bzw. H_2O pH 8.0 [1min, 13000 rpm] von der Säule eluiert und über Vakuumzentrifugation auf das gewünschte Volumen zur Weiterverarbeitung eingengt.

4.1.7 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Linearisierte Plasmide, deren Religationsrate aufgrund des Vorliegens komplementärer Enden besonders groß war, wurden unter Verwendung Alkalischer Phosphatase an ihren 5'-Termini dephosphoryliert. Dazu wurden 40µl des Restriktionsansatzes mit 1U alkalischer Phosphatase aus Shrimps (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP, Boehringer Mannheim) versetzt, mit dem zugehörigen, Zn^{2+} -haltigen Reaktionspuffer und Aq. bidest. auf ein Endvolumen von 50µl gebracht und 30 min. bei 37°C inkubiert. Eine weitere Unit des Enzyms wurde nach Ablauf dieser Periode zugefügt und die Inkubation um zusätzliche 30 min. verlängert. Das Enzym wurde mit einem Vol. Phenol-Isoamylalkohol-Chloroform (25:24:1; v/v/v) aus dem Ansatz extrahiert und die dephosphorylierte Vektor-DNA durch Ethanolfällung gereinigt.

4.1.8 Ligation

Die Ligation der geschnittenen und isolierten Gene erfolgte sowohl mit Hilfe der T4-DNA-Ligase der Firma Roche als auch mit dem „sure clone kit“ der Fa. Pharmacia. Je nach Schnittenden wurde für Ligationen mit überhängenden Enden (sticky-ends) ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 bzw. glatten Enden (blunt-end) von 1:5 gewählt.

Nach vorschriftmäßiger Reaktion mit Klenowenzym und Phosphonucleotidkinase (zur Auffüllung und Phosphorylierung der PCR-Enden) wurden die Fragmente von den Proteinen mittels Agarosegel aufgereinigt.

Genfragment	1-16 µl [50-200 ng]
Klenow-Fragment	1 µl
10 x Puffer	2 µl
Polynucleotidkinase	1 µl

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert, dann ein äquivalentes Volumen an Phenol-Chloroform zugegeben, intensiv vermischt [Vortex] und zur Phasentrennung bei 13000 rpm 2min abzentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Genfragment wurde aus dem Gel isoliert. Anschließend wurde eine Ligation der glatten Enden durchgeführt.

Ligation nach „sure clone kit Pharmacia“

Genfragment	50-200 ng
pUC18 Vektor	50 ng
2 x Ligationspuffer	10 ng
DTT	1 µl

T ₄ -Ligase		1 µl
H ₂ O	ad	20 µl

Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h bei 16°C inkubiert und dann kompetente *E.coli* Zellen [verschiedene Stämme] mit dem ligierten Plasmid transformiert.

Ligation nach "rapid ligation kit Roche"

Genfragment		6 µl (200 ng)
Plasmid (geschnitten)		2 µl (50 ng)
Dilution Puffer (keine Herstellerangaben)		2 µl
Ligation Puffer (keine Herstellerangaben)		10 µl
T ₄ -Ligase		1 µl

Das Reaktionsgemisch wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann kompetente *E. coli* Zellen [verschiedene Stämme] mit dem ligierten Plasmid transformiert.

4.1.9 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* XL1 Blue und JM 105 sowie HB101 erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Aus dem konservierten *E. coli* Stamm, wurden 5 ml LB-Medium 5 % angeimpft und über Nacht wachsen gelassen. 200 µl davon werden in 300 ml LB-Medium überimpft, das dann bis zu einer OD₅₅₀ 0.5 bei 37°C inkubiert wird. Die Kultur wird dann in eine SS34-Zentrifugenbecher überführt, 15 min auf Eis gekühlt und dann bei 4°C abzentrifugiert. (5000 rpm, 10 min.).

Die Zellen werden mit einer Lösung von 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kalium-Acetat pH 5.8, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert und erneut für 1h auf Eis gestellt. Anschließend werden die Zellen nochmals abzentrifugiert und in einer Lösung von 10 mM MOPS pH 7.0, 10 mM RbCl, 15 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Diese Zellsuspension wird dann in Aliquots von 100 µl schockgefroren (flüssiger Stickstoff) und bei -80°C aufbewahrt.

4.1.10 Transformation

Die Standardtransformation wurde nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983) durchgeführt. Hierzu wurden 100-200 µl kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 40 ng DNA aus dem Ligationsansatz zugegeben. Die Plasmidzellsuspension wurde 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 90 sec auf 42°C erwärmt und sofort wieder auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 300 µl LB - Medium wurden die Zellen zur Regeneration etwa 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl dieser Kultur auf einer Antibiotikahaltigen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.1.11 Schnellisolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* (modifiziert nach Birnboim und Doly)

Für die Schnellisolierung von Plasmiden werden die Zellen einem osmotischen Schock ausgesetzt und die Proteine danach ausgefällt, wobei die Zellen mit osmotischen Lösungen behandelt werden, die zum Platzen der Zellen führen (Birnboim & Doly, 1979).

1.5ml einer Übernachtskultur werden abzentrifugiert und mit 100µl Lsg. A + 100 µg/ml RNase sowie 200 µl Lsg. B versetzt (für 5 ml ÜN-Kultur werden alle Mengen bis zur Isopropanol-Fällung vervierfacht).

Der Ansatz wird dann 5 min auf Eis gelegt, gefolgt von 150 µl Lsg. C. Nach der Zugabe von Lsg. C wird der Ansatz wieder auf Eis für 15 min inkubiert und anschließend für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand (400µl) wird mit 260µl Isopropanol versetzt und bei -20°C für 30min absetzen gelassen. Danach wird der Ansatz für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und 2x mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen. Über der Speedvacuumzentrifuge werden die Plasmide getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Lsg. A: 50 mM Glucose
 10 mM EDTA
 2.5 mM Tris pH 8.0

Lsg. B: 0.2 M NaOH
 1 % SDS

Lsg. C: 3 M NaAC pH 8.0 (mit HCl titriert)

4.1.12 Plasmidisolierung [Biorad]

Für die saubere Plasmidreinigung wurde das Quantum Prep[®] (Plasmid Miniprep kit [Biorad]) verwendet. Die bindende Matrix ist ein Silicon dioxid exoskeleton aus Diatome.

Für die Reinigung der Plasmide wurden 2 ml transformierte Zellen bei 13000 rpm für 30 sec. abzentrifugiert und den Überstand entfernt. Dazu wurden 200µl Cell-Resuspension zupipettiert und gut resuspendiert (Vortex).

Auf die Zellsuspension wurden 250 µl Cell-Lysis-Solution zugegeben und gut vermischt. Nach der Behandlung mit der Lyse-Lösung wurden 250 µl „Neutralization Solution“ zugegeben und vorsichtig vermischt (nicht vortexen).

Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (5 min bei 13000 rpm).

Die wäßrige Phase wurde entfernt und mit 200 µl Matrix-Suspension vermischt. Die Lösung wurde dann in einen Spin-Filter angebracht und bei 13000 rpm für 5' abzentrifugiert.

Der Bodensatz wurde entfernt und der Ansatz (im Spin-Filter) wurde mit 500µl „Wash-Solution“ durch Zentrifugation gewaschen. Der Waschvorgang wurde 2x wiederholt.

Der Bodensatz wurde wieder entfernt und die Plasmid-DNA mit 56°C heißem deionisiertem H₂O durch Zentrifugation für 30 sek. eluiert.

Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

4.1.13 Plasmidisolierung [Qiagen]

Um die Plasmide aus den Bakterienzellen zu isolieren, wurde der Plasmid-Präparations-Kit der Fa. Qiagen verwendet. Dieser beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse in Verbindung mit einer Anionenaustauschchromatographie. Zur Vermeidung der Kopräzipitation störender Salze wurde die anschließende Isopropanol-Fällung bei Raumtemperatur durchgeführt und auch das 2 malige Ethanolwaschen (70 %) erfolgte bei Raumtemperatur. Nach der Trocknung in der Speed-Vac wurde das erhaltene Pellet in 10 µl 1 mM Tris, pH 8.0 aufgenommen. Die genaue Konzentration wurde mittels Restriktion eines 1µl Aliquots gelelektrophoretisch bestimmt.

4.1.14 Restriktion

Analytische Restriktionen erfolgten in einem Volumen von 30 µl, präparative in einem Volumen von 50 µl. Die für die einzelnen Restriktionsenzyme nötigen Puffer-Konzentrationen folgten den Herstellerempfehlungen. Die DNA-Menge für den präparativen Verdau lag in einem Bereich von 3-4 µg/Ansatz. Die Vektoren wurden noch zusätzlich 1h mit 5 Units alkalischer Phosphatase bei 37°C inkubiert, um die 5'-Phosphatgruppe zu entfernen und so die Religation des Vektors zu verhindern.

4.1.15 Sequenzierung

Die DNA- Sequenzierung erfolgte per Auftrag durch die Firma SequiServe, Vaterstetten, oder mittels eines Automated Laser Fluoreszenz- (A.L.F.) Sequenzierautomaten (Fa. Pharmacia) in einem 6 %igen Polyacrylamidgel. Die Sequenzreaktion nach Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977) mittels T7- DNA-Polymerase wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt [AutoRead™ Sequencing Kit, Fa. Pharmacia]. Pro Sequenzierung wurden 7 µg hochreine Plasmid-DNA benötigt. Sie erfolgten mit den im Kit enthaltenen vektorspezifischen Primern (pUC universal und reversal). Die Daten der Sequenz wurden mit dem Programm DNAsis ausgewertet.

4.1.16 Gezielte Mutagenese

Die gezielte Mutagenese erfolgte nach dem Prinzip der überlappenden PCR (Ho *et al.*, 1989). Hierbei werden Primer verwendet, die zwei DNA- Fragmente mit überlappenden Enden erzeugen. In einer zweiten PCR hybridisieren diese Fragmente. Das überlappende 3'-Ende jeden Stranges dient als Primer für die Synthese des Gegenstranges. Werden nun in die Oligonucleotiden Mutationen eingeführt, finden sich diese auch 100 % im Produkt wieder.

In einer zweiten PCR hybridisieren diese Fragmente, das überlappende 3'-Ende jeden Stranges dient als Primer für die Synthese des Gegenstranges.

Das resultierende Fusionsprodukt wurde durch weitere PCR mit den „äußeren“ Primern, die den gesamten Bereich einschließen, amplifiziert.

Vorteil dieser Methode ist, dass weder auf das Vorhandensein einer Restriktionsschnittstelle geachtet werden muss, noch das gesamte Plasmid amplifiziert wird. Das Prinzip der PCR-Mutagenese ist in Abbildung 7 dargestellt.

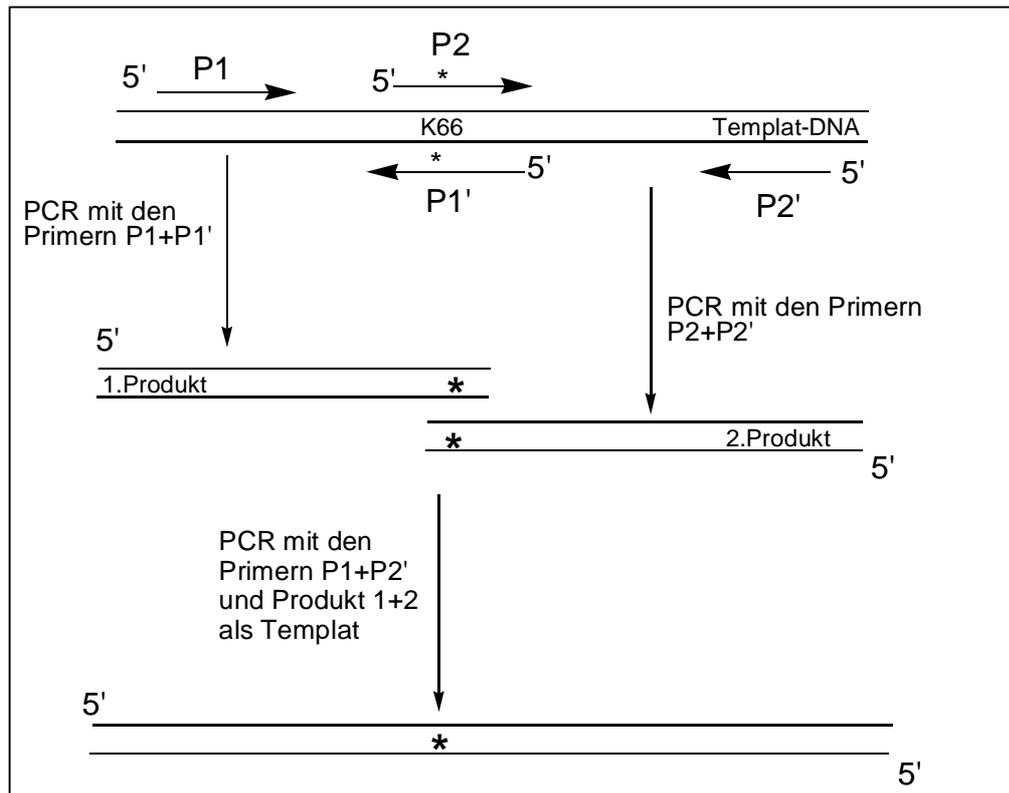


Abbildung 7: Prinzip der gezielten Mutagenese mittels überlappender Fragmente.

4.1.17 Zufallsmutagenese

Für die Herstellung verbesserter Enzymvarianten existieren zwei Strategien:

1. **Asexuelle Evolution** (Kuchner & Arnold, 1997), dabei wird durch zufällige Mutagenese, die möglichst auf das für das gewünschte Protein codierende Ausgangsgen beschränkt wird, eine Enzybibliothek hergestellt und anschließend auf verbesserte Eigenschaften durchmustert. Die in der ersten Generation gefundenen besten Enzyme können in folgenden Mutationsrunden optimiert werden. Dies setzt jedoch eine weitere Verbesserung der Varianten der ersten Generation durch Einführung neuer und Deletion sich als negativ erweisender Mutationen voraus.
2. Die **sexuelle Evolution** hingegen geht von einem Pool homologer Ausgangsgene aus. Diese können aus einer asexuellen Evolution hervorgegangen oder nah verwandten natürlichen Sequenzen sowie Enzymvarianten abgeleitet sein, die durch rationales Design hergestellt wurden. Das Prinzip dieses DNA shuffling oder gene shuffling (Stemmer, 1994) basiert auf einem partiellen DNaseI-Verdau und einer nachfolgenden Rekombination der Bruchstücke durch eine Polymerasekettenreaktion

(PCR). Nachteilig sind die nicht immer gegebenen Verfügbarkeiten homologer Gene, die Kontrolle des DNase-Verdau zur Herstellung von Bruchstücken optimaler Größe und Probleme mit der Ligationseffizienz bei der PCR (Bornscheuer *et al.*, 1998).

Die wohl wichtigste Methode zur asexuellen Evolution ist die Fehlerhafte Polymerasekettenreaktion (error-prone PCR) (Rice *et al.*, 1992).

Durch Einstellung nicht-optimaler Reaktionsbedingungen in der PCR kann die Fehlerhäufigkeit der Polymerase gesteigert werden

Die Einflußgrößen in der „error prone PCR“ sind:

Fehlerrate der Taq- Polymerase

Konzentration der Taq-Polymerase

molare Verhältnisse der Desoxynukleotide

Konzentration der Ziel- DNA (Template)

PCR- Zyklenzahl

[MgCl₂]

[MnCl₂]

Die Vorgehensweise der asexuellen Evolution ist in beschrieben.

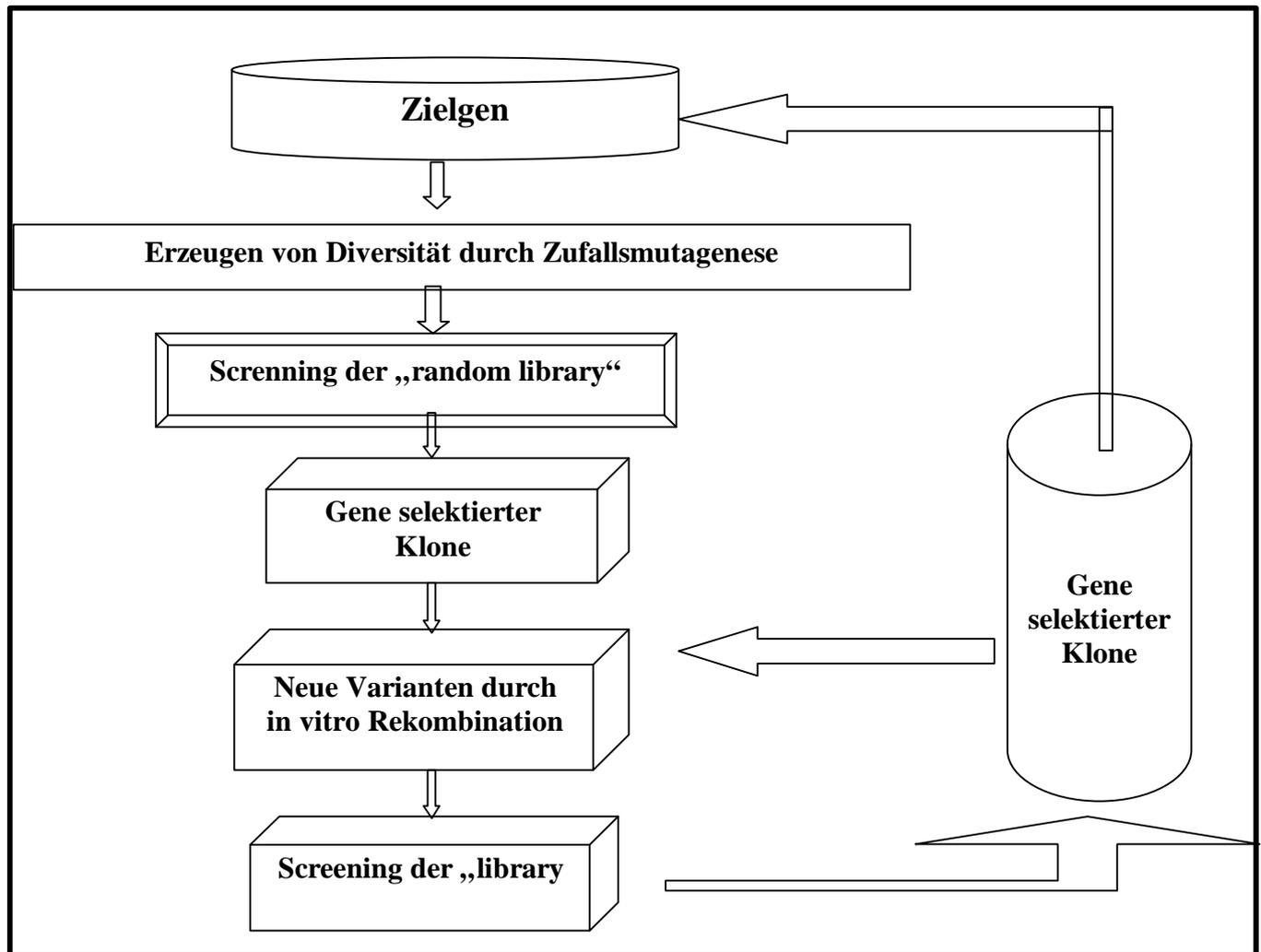


Abbildung 8: Vorgehensweise der Zufallsmutagenese

4.1.18 Sättigungsmutagenese

Der ausgewählte Aminosäurerest wird gegen mögliche andere Aminosäuren ausgetauscht, dafür werden die Mutageneseprimer so synthetisiert, dass theoretisch alle Triplettkombination möglich sind (Derbyshire *et al.*, 1986).

PCR-Protokoll:

10 mM Tris pH 8.3

50 mM KCl

1.5 mM MgCl₂

jeweils 200 µM dATP, dCTP, dTTP, dGTP

20-40 pmol jedes Mutagenese-Primers
2.5 U Polymerase-*pfu* – Stratagene pro 100 µl Ansatz
20 ng Plasmid-DNA als PCR-Template

Die PCR-Amplifikation wurde auf einen automatischen DNA-Thermal-Cycler (Robocycler, Fa Stratagene) nach folgendem Programm durchgeführt.

- 3 min Denaturierung bei 94°C (zu Anfang des Programms 1x)
- 1 min Annealingsschritt, in dem die Primer an das Template binden.
- Extension bei 72°C (Zeit hängt von der Größe des Plasmids ab. 1 min/ kb)
- 1 min Denaturierung bei 95°C
- Zyklisches Wiederholen der letzten drei Schritte (25x)
- 6 min Extension (nach Abschluß der PCR)

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 Zellaufschluß und Rohextraktgewinnung

Da das Protein in kleinen Mengen für den qualitativen Nachweis gebraucht wurde, wurden die Zellen durch eine Schwingkugelmühle aufgeschlossen [Retsch]. Dafür wurde ein Verhältnis von Zellen zum Aufschlußpuffer [0.1 M Kpi pH 7.0, 1 mM MgCl₂ , 10 Tropfen Ucolup/L) von 1:3 eingesetzt, und 1,2g Glasperlen (0.3 ?) pro 600 µl dieser Lösung zugegeben.

Die Eppendorfgefäße wurden in die Schwingkugelmühlensylinder gestellt und dann die Zellen in der Schwingkugelmühle für 10 min. disintegriert. Anschließend wurden die Proben 5 min. auf Eis abgekühlt und danach 3 min. bei 13000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abpipettiert. Der Aufschluß wurde ein zweites Mal wiederholt, indem die Aufschlußpuffer auf die Eppendorfgefäße verteilt und die restlichen, nicht aufgeschlossenen Zellen durch die Schwingkugelmühle disintegriert worden sind.

Um die große Zahl an Mutanten schnell und effektiv zu überprüfen, wurden die Kolonien in kleinem Maßstab (1,2 ml) angezüchtet und mit der unten geschilderten Methode aufgeschlossen.

Die Transformanten der Zufallsmutagenese wurden einzeln mit Zahnstochern abgepickt und in 150 µl LB-amp angeimpft. Das Wachstum der Vorkultur erfolgte über Nacht. 50 µl aus dieser Vorkultur wurden in 1,2 ml LB-amp als Hauptkultur angeimpft und nach einem

Wachstum von etwa 5 h (OD_{600} 0,7) wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG induziert, um die Expression zu starten.

Die Zellen werden nach dem folgenden Protokoll geerntet:

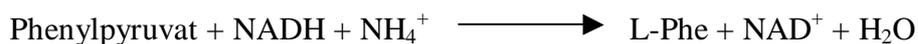
- ☒ 1,2 ml Kultur abzentrifugieren
- ☒ 600 μ l Überstand wegwerfen und den Rest resuspendieren
- ☒ 50 μ l Lysis-Puffer dazu und noch mal resuspendieren
- ☒ 30-45' bei 37°C schütteln
- ☒ Aus dem Ansatz der lysierten Zellen werden 50 μ l zur photometrischen Messung benötigt

Lysis-Puffer:

0,2 % Triton X-100 10 ml
20 mM EDTA 40 ml
200 mM Kpi-Puffer 50 ml pH 7.0

4.2.2 Aktivitätstest für die Phenylalanin Dehydrogenase

Die Bestimmung der enzymatischen rekombinanten PheDH erfolgte mittels photometrischer Tests anhand der Extinktionsabnahme bei 340 nm. Dies basiert auf dem Verbrauch von NADH im Zuge der Umsetzung der Ketosäure Phenylpyruvat (Hummel *et al.*, 1987)



Die Extinktionsabnahme bei 340nm wurde über 1min verfolgt. Die Berechnung der Aktivität als U/ml (U entspricht 1 μ mol Substratumsatz/min) erfolgte über das Lambert-Beersche Gesetz. Der Aktivitätstest wurde bei 30°C und bei pH 8.5 durchgeführt

Der Testansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tris/HCl 0.1 M
(NH₄)₂SO₄ 0,15 M
Phenylpyruvat 3 mM
NADH 0.3 mM

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l Enzym gestartet.

4.2.3 Screening und Aktivitätstest in Titerplatten

Die Aktivitätsbestimmung der hergestellten Muteine in Bezug auf Phenylaceton bzw. Phenylpyruvat wurde photometrisch in Titerplatten durchgeführt.

Dafür wurden Mutanten durch eine schnelle Methode isoliert (4.2.1) und auf Aktivität überprüft.

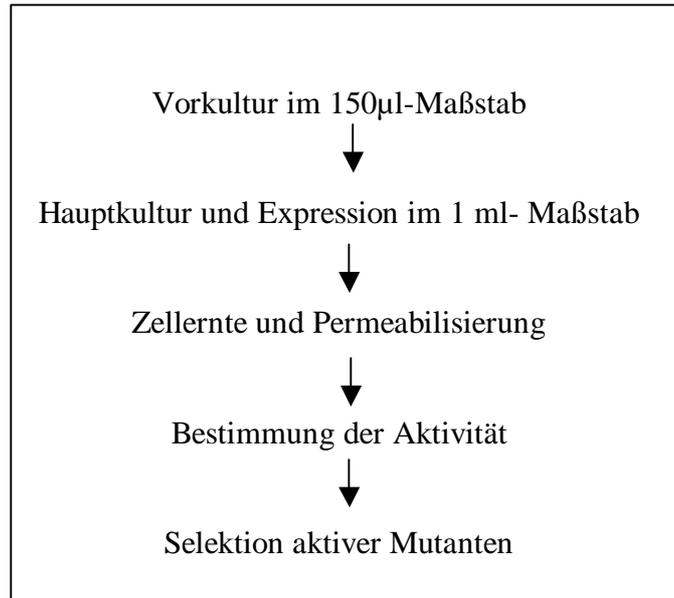


Abbildung 9: Schema zum Screeningsvorgang

Reaktionsansatz:

120 µl Substratansatz

50 µl Rohextrakt

Messung bei 340 nm

Substratansatz:

100 mM (NH₄)₂SO₄

100 mM (Tris-Puffer) pH-Wert 8.5

3 mM Phenylpyruvat bzw. Phenylaceton

0,3 mM NADH

Für die Reaktion wurden 120 µl davon verwendet und mit 50 µl Rohextrakt gestartet.

4.2.4 Aktivitätstest für das NAD-abhängige malic enzyme

HEPES pH 7.5	0.1 M
L-Malat	2 mM
NAD ⁺	0.5 mM
Enzym (Rohextrakt)	10 µl

4.2.5 Gekoppelte enzymatische Synthese

Das Reaktionsmedium für die kontinuierliche Produktion des L-Phenylalanin wurde folgendermaßen zusammenpipettiert:

0,1 M	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,1 M	Hepes (pH 8.0)
30 mM	Phenylpyruvat
60 mM	Malat
2 mM	MgCl ₂
1,5 g/l	BSA
2 mM	NAD ⁺

Das gesamte Volumen des Reaktionsmediums beträgt 10 ml und wurde mit 50 U PheDH und 70 U malic enzyme gestartet. Die L-Phenylalaninkonzentration wurde zu unterschiedlichen Reaktionszeiten mittels HPLC bestimmt.

4.2.6 Bestimmung des L-Phenylalanin mittels HPLC

Die Derivatisierung der Proben für die HPLC-Analytik wurde wie folgt durchgeführt:

OPA-Derivatisierungsansatz: 140 µl Na-Borat-Puffer + 40 µl Probe bzw. Standard + 20 µl OPA/IBLC-Reagenz. Die Mischung wurde sofort kräftig gerührt.

OPA/IBLC oder IBDC: 260 mM IBLC oder IBDC + 170 mM OPA werden in Na-Borat-Puffer (0,1 M, pH 10,5) gelöst.

Na-Borat-Puffer: 0,1 M Na₂B₄O₇ · 10 H₂O in Wasser gelöst und mit NaOH auf pH 10,5 eingestellt.

4.2.7 Bestimmung der Acetatkonzentration

Die Bestimmung der Acetatkonzentration in Fermenterlösungen erfolgte über HPLC auf einer Aminex HPX 87 H Säule (Biorad) mit einem Fluß von 0,5 ml/min unter Verwendung von 0,2N Schwefelsäure als Laufmittel. Das Injektionsvolumen betrug 100 µl und die Temperatur 40°C, die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 215nm. Die absoluten Acetatkonzentrationen der Proben, aus denen die Biomasse durch Zentrifugation abgetrennt worden war, wurden anhand einer Eichung mittels Acetatlösung ermittelt.

4.2.8 Ganzzell Biotransformation

In 200 ml Reaktionsansatz wurden 1 g rekombinante Zellen für die Produktion von L-Phenylalanin verwendet.

Reaktionsansatz für L-Phenylalanin-Synthese:

0,1 M	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,1 M	HEPES-Puffer pH8.5
0,1 M	Malat
2 mM	MgCl ₂
2 mM	NAD ⁺
40 mM	Phenylpyruvat

Die Synthese erfolgte bei 30°C unter langsamen Rühren. Für kleinere Ansätze wurden die Zellmengen entsprechend abgewogen.

4.2.9 Proteinaufreinigung

Das durch den Aufschluß erhaltene Rohextrakt wurde auf eine DEAE-Sepharose-FF Säule (Volumen 7.1 ml, Fluß 1 ml/min.) aufgetragen. Die Säule wurde vorher mit 5 fachem Säulenvolumen eines 0.1 M Kpi-Puffers (8.94 g K₂HPO₄ + 0.21 g KH₂PO₄) gespült. Anschließend wurde die Konzentration von NaCl über einen linearen Gradienten bis auf 100 % zum Eluieren erhöht.

Dadurch wurden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen anionischen Bindungsstärke bei verschiedenen Natriumchloridkonzentrationen eluiert und in Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen wurden anhand des Aktivitätstests auf PheDH-Aktivität überprüft. Diejenigen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt, und für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

4.2.10 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt wurde photometrisch nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt.

Diese Methode beruht auf der Farbverschiebung des Farbstoffes im Gegenwart von Proteinen.

Es bildet sich ein blau gefärbter Komplex, der bei 595 nm detektiert werden kann.

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist sehr empfindlich und für geringe Proteinmengen geeignet. Das in der Reaktion eingesetzte Bradfordreagenz wurde selbst hergestellt:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 wurden mit 50 ml Ethanol versetzt und über Nacht gerührt. Danach erfolgte die Zugabe von 100 ml 85 %iger Phosphorsäure, und anschließend wurde die Lösung auf 1 L mit Wasser aufgefüllt. Die fertige Lösung wurde einige Zeit gerührt, anschließend filtriert und unter Lichtabschluß aufbewahrt.

Testansatz:

900 µl	Bradfordreagenz
100 µl	Proteinlösung

Die Proben wurden 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 595 nm gemessen.

4.2.11 Entsalzen von Proteinlösungen

Die Entsalzung von Proteinen erfolgte entweder über Gelfiltration oder Ultrafiltration. Hierbei wurden 2.5 ml der Proteinlösung auf eine vorher mit dem gewünschten Puffer äquilibrierte PD10 Sephadex G 25 Säule [Pharmacia] aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend durch Elution der PD10 mit 3.5 ml des gewünschten Puffers wiedergewonnen und damit umgepuffert.

4.2.12 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Enzympräparate wurden, je nach Bedarf, mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Es wurden entweder YM20-Membranen in Rührzellen [Fa. Amicon] oder Zentrifugationsröhrchen [Fa. Centricon] verwendet.

4.2.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) gehört zu den in der biochemischen Analytik meistverwendeten Elektrophoresemethoden. Sie verwendet als Träger polymerisiertes und quervernetztes Acrylamid, dessen Porengröße in einem weiten Bereich variierbar ist.

Diese Methode liefert scharf getrennte Banden und dient bei entsprechender Eichung zur Bestimmung der molaren Masse bzw. des stoke'schen Radius von nichtglobulären Makromolekülen.

Die Geldichte, auch Gelkonzentration genannt, wird durch die Größen T und C bestimmt. T ist gleich dem Prozentanteil an Acrylamid und Methylen-bis-Acrylamid am Gesamtvolumen, C ist der prozentuale Anteil von N,N,-Methylen-bis-acrylamid (dem quervernetzenden Agens). Die Gele wurden nach Laemmli (Laemmli, 1970) gegossen.

Verwendete Stammlösungen:

Trennpuffer	1.5 M	Tris/HCl	pH 8.8
Sammelgelpuffer	0.5 M	Tris/HCl	pH 6.8
SDS	10 % (w/v)		
Glycerin	85 % (w/v)		
APS	10 % (w/v)		

Sammelgelzusammensetzung:

Sammelgelpuffer	0.125 M
Acrylamid	5 %
SDS	0.10 % (w/v)
APS	0.02 % (w/v)
TEMED	0.25 % (w/v)

Elektrophoresepuffer pH 8.0

Tris	0.025 M
Glycerin	0.192 M
SDS	0.1 % (w/v)

Probenpuffer:

Glycerin	10 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
Tris/HCl pH 6.8	0.063 M
Bromphenolblau	0.1 % (w/v)

?-Mercaptoethanol 10 % (v/v)

Um eine Denaturierung zu erreichen, wurden die Proben mit 20 µl Probenpuffer versetzt und 4 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt.

4.2.14 Färbung

Silberfärbung von Proteinen (Blum et al., 1987):

Das Gel wurde in eine Fixierlösung überführt und unter ständigem Schütteln (3x30 min.) fixiert. Nach der Fixierung wurde das Gel 10 min mit 20 % (v/v) Ethanol inkubiert und direkt 10 min mit Millipore Wasser gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Gel silbergefärbt.

Um das Gel zu färben und sichtbar zu machen, wurde es für 1 min in der Sensitivierungslösung (0.02 % (w/v) Natriumthiosulfat x H₂O) geschüttelt, dann kurz mit Wasser gespült und anschließend 20-30 min in der Färbelösung [2 % (v/v) AgNO₃, 750 µl/L (v/v) 37 % HCHO] inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde das Gel wieder kurz mit Wasser gespült und dann entwickelt [6 % (w/v) Na₂CO₃, 500 µl/l (v/v) 37 % HCHO, 0.0005 % (w/v) Natriumsulfat x H₂O].

Die Fixierreaktion wurde abgestoppt, sobald die Banden sichtbar waren.

Fixierlösung

40 % (v/v)	Ethanol, vergällt (Methylethylketon)
10 % (v/v)	Essigsäure konz.

Coomassie Färbung:

Färbelösung	0.1 % Coomassie blue R-250 (w/v)
	40 % Ethanol, vergällt [Methylethylketon] (v/v)
	10 % Essigsäure (v/v)
Entfärber	40 % Ethanol, vergällt [Methylethylketon] (v/v)
	10 % Essigsäure (v/v)

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel für 20 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend die Banden mit Hilfe des Entfärbers [mehrmals wechseln] unter Schütteln sichtbar gemacht. Um einen klaren Hintergrund zu erzielen, konnte das Gel nach Einsatz des Entfärbers über Nacht in 0.5 M NaCl oder Wasser inkubiert werden.

4.3 Mikrobiologische Methoden

4.3.1 Verwendete Organismen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Stamm *Rhodococcus* sp. M4, sowie mit *E.coli* XL1-blue, *E.coli* k12, HB101, JM105, SG13009, UT5600 und BL21 gearbeitet.

4.3.2 Anzuchtbedingungen und Medien

Rhodococcus sp. M4

Für den *Rhodococcus* sp. M4 wurde das M4-Medium (Hummel *et al.*, 1987) nach folgender Zusammensetzung verwendet:

KH ₂ PO ₄	4 g
L-Phenylalanin	10 g
Hefeextrakt	1 g
HVK	2 ml

Thiamin/HCl (nach dem Autoklavieren) 200 µg add 1L H₂O

Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7.5 mit NaOH eingestellt.

Als Vorkultur wurden 200ml dieses Mediums mit einer einzelnen Kolonie des *Rhodococcus* sp. M4 angeimpft. Die Zellen wurden für 48h bis zur stationären Phase unter aeroben Bedingungen (Kolben mit Schikanen) bei 120 rpm und 30°C kultiviert.

Davon wurde die Hauptkultur 5 %ig angeimpft und unter gleichen Bedingungen kultiviert.

E. coli

Für den *E. coli* wurde das LB-Medium (Luria-Bertani) nach folgender Zusammensetzung verwendet:

Bacto-Trypton	1 %
Bacto-Yeast Extrakt	0.5 %
NaCl	0.5 % pH 7.5

Für feste Nährböden wurde 1.5 % Bactoagar (Difco) zugesetzt. Der Selektionsdruck wurde durch Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml) nach dem Autoklavieren eingestellt.

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei 37°C als Schüttelkultur in den entsprechenden Medien. Vorkulturen wurden in Reagenzgläsern, größere Kulturen in Schüttelkolben mit Schikanen inkubiert.

4.3.3 Plattenkulturen

Die Inkubation fester Medien erfolgte aerob bei 37°C, bis Einzelkolonien erkennbar waren. Bewachsene Platten wurden bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert.

4.3.4 Schüttelkolbenkulturen

Flüssigmedien wurden mit Einzelkolonien, Glycerin-Stocks oder 0,1-10 Vol.-% anderer Flüssigkulturen beimpft und auf einem Rundsüttelgerät mit einer Frequenz von 110-160 rpm bei geeigneter Temperatur inkubiert.

4.3.5 Konservieren von mikrobiologischen Stämmen

Von allen Stämmen wurden 1 ml einer stationären Kultur mit 5 % DMSO [steril] versetzt und in entsprechenden, sterilen Kryoröhrchen (Nunc) bei -80°C konserviert.

4.3.6 Fermentation der rekombinanten PheDH in Hochdichte Medium (HZD)

5 L bzw. 20 L HZD-Medium wurden mit 1 % exponentiell wachsender HZD_{amp} Flüssigkultur beimpft und bei 37°C inkubiert. Rührerdrehzahl und Sauerstoffeintrag wurden so angepasst, dass ein Sauerstoffpartialdruck von 20 % nicht unterschritten wurde. Die maximalen Werte betragen 800 rpm Rührerdrehzahl und 5 L·min⁻¹ Lufteintrag. Bei Bedarf wurde ein Überdruck von bis zu 1 bar angelegt. Die Einstellung des pH-Werts auf 7.0 erfolgte unter Verwendung von 25 %igem Ammoniakwasser und 1 N Phosphorsäure. Sobald die vorgelegte C-Quelle erschöpft war, wurde Feedlösung computergesteuert zugesetzt. Die Induktion der Expression erfolgte innerhalb der Feedphase durch IPTG. War der Sauerstoffpartialdruck irreversibel unter 20 % gesunken, wurde die Fermentation abgebrochen.

Batch-Medium-Zusammensetzung

Nr.	Lösung	Substanz	Endkonz. (g/l)	V End (ml)	Konz.- Faktor	V Stamm (ml)	m (g)
1	HZD-Grundlsg. pH= 6,9	NH ₄ Cl	0,2	10000	10	1000	2
		(NH ₄) ₂ SO ₄	2	10000	10	1000	20
		KH ₂ PO ₄	13	10000	10	1000	130
		K ₂ HPO ₄	10	10000	10	1000	100
		NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	6	10000	10	1000	60
2	Glucose-Lsg.	Glucose-1H ₂ O	6	10000	80	125	60
3	MgSO ₄ -Lsg.	MgSO ₄ -7H ₂ O	1	10000	200	50	10
4	Hefeextrakt-Lsg.	Hefeextrakt	3	10000	100	100	30
5	Na ₂ -EDTA-Lsg.	Na ₂ -EDTA	0,0084	10000	5000	2	0,084
6	Vitamin-Lsg. 428 DSM pH=7 erst Folsäure bei pH=7 lösen, dann die anderen bei pH=12 lösen	Riboflavin(Vit. B2)	0,0005	10000	200	50	0,005
		Thiamin-HCl(Vit.B1)	0,05	10000	200	50	0,5
		Nicotinsäure	0,0025	10000	200	50	0,025
		PyridoxinHCl(VitB6)	0,0025	10000	200	50	0,025
		Ca-Panthotenat	0,0025	10000	200	50	0,025
		Biotin	0,000005	10000	200	50	0,00005
		Folsäure	0,00001	10000	200	50	0,0001
Cyanocobalamin(B12)	0,00005	10000	200	50	0,0005		
7	Spurenelemente-Lsg. In 5 N HCl	CaCl ₂ -2H ₂ O	0,04	10000	250	40	0,4
		ZnSO ₄ -7H ₂ O	0,002	10000	250	40	0,02
		CuCl ₂ -2H ₂ O	0,001	10000	250	40	0,01
		MnSO ₄ -1H ₂ O	0,01	10000	250	40	0,1
		CoCl ₂ -6H ₂ O	0,007	10000	250	40	0,07
		H ₃ BO ₃	0,0005	10000	250	40	0,005
		AlCl ₃ -6H ₂ O	0,01	10000	250	40	0,1
		Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0,002	10000	250	40	0,02
		FeSO ₄ -7H ₂ O	0,04	10000	250	40	0,4
8	Thiamin-Lsg.	Thiamin-HCl(Vit.B1)	0,1	10000	2000	5	1
9	Ampicillin-Lsg.	Ampicillin	0,1	10000	2000	5	1
10	IPTG-Lsg.	IPTG (Endkonz.=0,5 mM)	0,119145	10000	1000	10	1,191

Fed-Batch-Medium- Zusammensetzung

Nr.	Lösung	Substanz	Endkonz. (g/l)	V End (ml)	Konz. faktor	V Stamm (ml)	m (g)
1	HZD-Grundlsg.	Stammlsg von Batch		4000	10	400	
2	Glucoselsg.	Glucose	600	4000	1,28	3124	2400
3	MgSO ₄ -Lsg.	Stammlsg von Batch	12	4000	16,6666	240	48
4	Hefeextrakt-Lsg.	Stammlsg von Batch	18	4000	16,6666	240	72
5	Vitaminlsg428DSM	Stammlsg von Batch		4000	200	20	
6	Spurenelemente-Lsg.	Stammlsg von Batch		4000	250	16	
7	Thiamin-Lsg.	Thiamin-HCl (Vit.B1	1	4000	40	4	

Batch-Medium: Im Fermenter

HZD-Grundlsg.	1000 ml
Glucose-Lsg.	125 ml
MgSO ₄ -Lsg.	50 ml
Hefeextrakt-Lsg.	100 ml
Na ₂ -EDTA-Lsg.	1 ml
Vitamin-Lsg. 428 (DSM)	50 ml
Spurenelemente-Lsg.	40 ml
Thiamin-Lsg.	5..ml
Ampicillin-Lsg.	5 ml
IPTG-Lsg.	10 ml
Antischaum	4 ml
Inokulum	100 ml
ad Aqua dest	8510 ml
Gesamt	10000

Fed-Batch-Medium: Im Fermenter

HZD-Grundlsg.	400 ml
Glucose-Lsg.	3044 ml
MgSO ₄ -Lsg.	240 ml
Hefeextrakt-Lsg.	240 ml
Vitamin-Lsg. 428 (DSM)	20 ml

Spurenelemente-Lsg.	16 ml
Thiamin-Lsg.	40 ml
Gesamt	4000 ml

Die rekombinanten Zellen wurden bei einer OD_{600} von 60 mit 1 mM IPTG induziert. Unter Sauerstoff- sowie pH-Regulation sind die Zellen bis zu einer OD_{600} von 170 gewachsen.

4.3.7 Bestimmung der optischen Dichte

Mikrobielle Zellen, die in einen Lichtstrahl gebracht werden, bewirken einen Intensitätsverlust, der unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen Gesetzes beschrieben werden kann (Bergter, 1983): $E = \epsilon \cdot c \cdot d$. Bei konstanten Extinktionskoeffizienten (ϵ) und konstanter Küvettenschichtdicke (d) besteht für definierte Bereiche eine direkte proportionale Beziehung zwischen Extinktion und Zellkonzentration (c) (Bursch *et al.*, 1970).

Innerhalb einer Population wachsende Zellen kann über spektrophotometrische Messung der Extinktion im Wellenlängenbereich von 550 nm bis 610 nm die zeitabhängige Zunahme der Zellkonzentration bestimmt werden. Dies erleichtert die Reproduzierbarkeit wachstumsabhängiger Versuchsergebnisse, erfordert jedoch konstante Versuchsbedingungen, da der jeweilige Extinktionskoeffizient von Größe, Form, Brechungsindex und Wachstumsbedingungen der untersuchten Spezies abhängig ist. Aussagen über absolute Zellkonzentrationen sind unter mikroskopischer Bestimmung der Zellzahl erstellt worden.

Bei jeder OD_{600} wurden die Zellsuspensionen durch Zugabe vom Medium soweit verdünnt, dass die Extinktion unterhalb von 0,5 lag. Darüber besteht keine lineare Beziehung mehr zwischen Extinktion und Konzentration.

5 Ergebnisse

5.1 Klonierung der Phenylalanin Dehydrogenase (PheDH)

5.1.1 Präparation genomischer DNA

Das *phedh*-Gen aus *Rhodococcus* sp. M4 (Hummel *et al.*, 1987) wurde mittels PCR mit genomischer DNA als Templat amplifiziert. Die genomische DNA wurde nach der Methode von van Soolingen (van Soolingen *et al.*, 1991) aus dem Stamm *Rhodococcus* sp. M4 isoliert. Diese Methode beinhaltet die enzymatische Vorbehandlung der Zellwand mit Lysozym und die Fällung der Proteine mit CTAB und Proteinase K als Denaturierungsmittel. Die Zugabe von CHCl_3 /Isoamylalkohol (23:1) führt zur Abtrennung der genomischen DNA.

Das DNA-Pellet wurde mit kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer bei 4°C aufbewahrt. (bei -20°C Lagerung würde die DNA beim Auftauen durch die Scherkräfte gespalten).

Die Reinheit sowie die Ausbeute der DNA wurde durch ein 0.5 %iges Agarose Gel mit Ethidiumbromid überprüft. Aus Abbildung 10 geht hervor, dass die nach dieser Methode präparierte genomische DNA hochmolekular und intakt war.

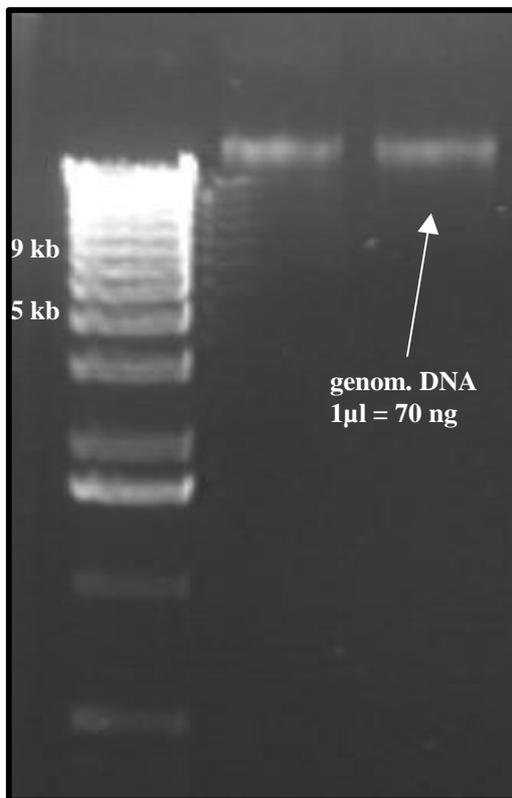


Abbildung 10: genomische DNA aus *Rhodococcus* sp. M4 nach Elektrophorese im 0.5 %igem Agarosegel.

5.1.2 Klonierung des PheDH-Gens mittels PCR

Die benötigten Primer für die 5'- und 3'-Enden des zu klonierenden *pheDH*-Gens wurden aus der veröffentlichten DNA-Sequenz (Brunhuber *et al.*, 1994) abgeleitet.

5'Primer (5'Phe-for)

5' ATG AGT ATC GAC AGC GCA CTG AAC

3'Primer (5'Phe-rev)

5' CTA CTA GGC AGT CGC TGT CGT TGT

An den 3'Primer wurden hinter die letzte Aminosäure des C-Terminus 2 Stopcodons angefügt, um eine effiziente Termination der Transkription zu gewährleisten.

Für die PCR wurde eine Verdünnungsreihe des DNA-Templates durchgeführt, um die optimale Ausgangskonzentration zu bestimmen. Dafür wurden zwei Versuchsreihen angesetzt. Die PCR-Ansätze wurden 7 min bei 94°C denaturiert, anschließend wurden 30 Zyklen wie aus Tabelle 2 ersichtlich durchgeführt. Die verwendeten Ansatzgrößen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2: PCR-Zyklen

Zyklusschritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Annealing	2	65
Polymerisation	1.5	72
Denaturierung der Stränge	2	94

Tabelle 3: PCR Protokoll zur Amplifizierung des PheDH-Gens. Variiert wurde die Konzentration der Template-DNA.

Template DNA	5'-ende	3'-ende	dNTP	Puffer	Taq-Polymerase	DMSO	H ₂ O
100 ng/μl	1μl	1μl	2μl	10μl	1μl	3	81μl
70 ng/μl	1μl	1μl	2μl	10μl	1μl	3	81μl
30 ng/μl	1μl	1μl	2μl	10μl	1μl	3	81μl

Durch die Verwendung der obengenannten Primer (5'Phe-for und 5'Phe-rev), die aus der N-terminalen bzw. C-terminalen Sequenz abgeleitet wurden, konnte ein spezifisches 1.1 kb-Fragment bei einer Annealing-Temperatur von 65°C amplifiziert werden (Abbildung 11). Um eventuelle Fehler, die bei Verwendung der Taq-Polymerase auftreten können zu minimieren,

wurde zur Klonierung des PheDH-Gens in der PCR eine DNA-Polymerase mit ‚proof reading‘-Funktion (high fidelity®- Polymerase) (Roche), Fehlerrate $1.3 \cdot 10^{-6}$ verwendet.

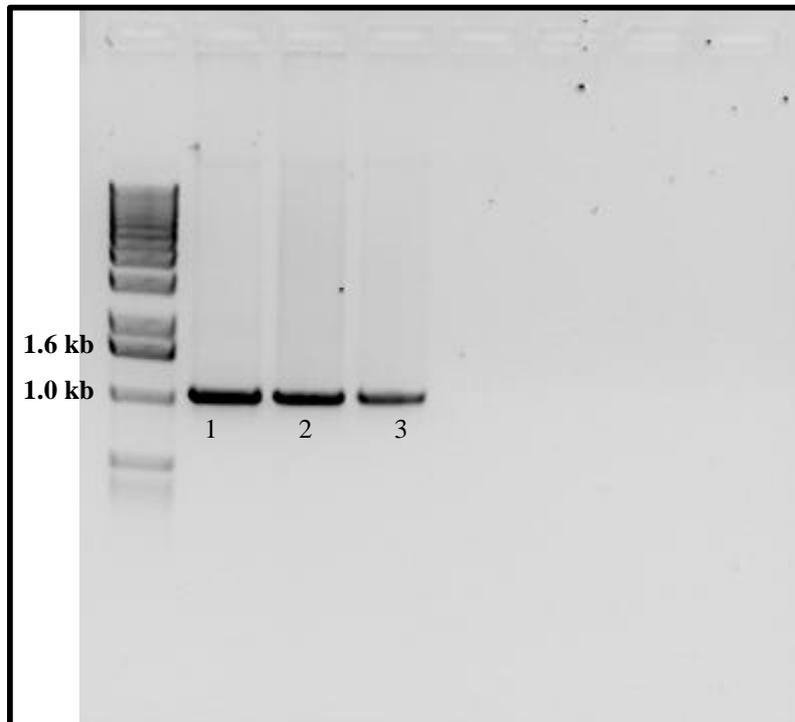


Abbildung 11: Ergebnis der PCR Reaktionen, die Abbildung zeigt ein Fragment mit einer Größe von etwa 1100 bp, als Marker wurde die Gibco KB-Leiter verwendet. Von den PCR-Ansätze wurden 7 μ l auf ein 0.8 % Agarosegel aufgetragen, 1-3 entsprechen den Ansätze in Tabelle 2.

5.1.3 Klonierung des PheDH Gens in den pUC-18

Das *phedh*- Gen wurde in die „multiple cloning site“ des pUC18-Vektors über glatte Enden an der SmaI- Restriktionsschnittstelle (CCCGGG) kloniert. Das Verhältnis zwischen Vektor und Insert lag bei 1:3. Für eine erfolgreiche Ligation wurden 200 ng DNA eingesetzt.

Der Vektor wurde an der SmaI -Schnittstelle geschnitten und um eine Religation des linearen Plasmids zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen abgespalten. Die Dephosphorylierung wurde durch alkalische Phosphatase (SAP, Shrimp Alkaline Phosphatase) durchgeführt, und in die Ligation eingesetzt (Abbildung 12).

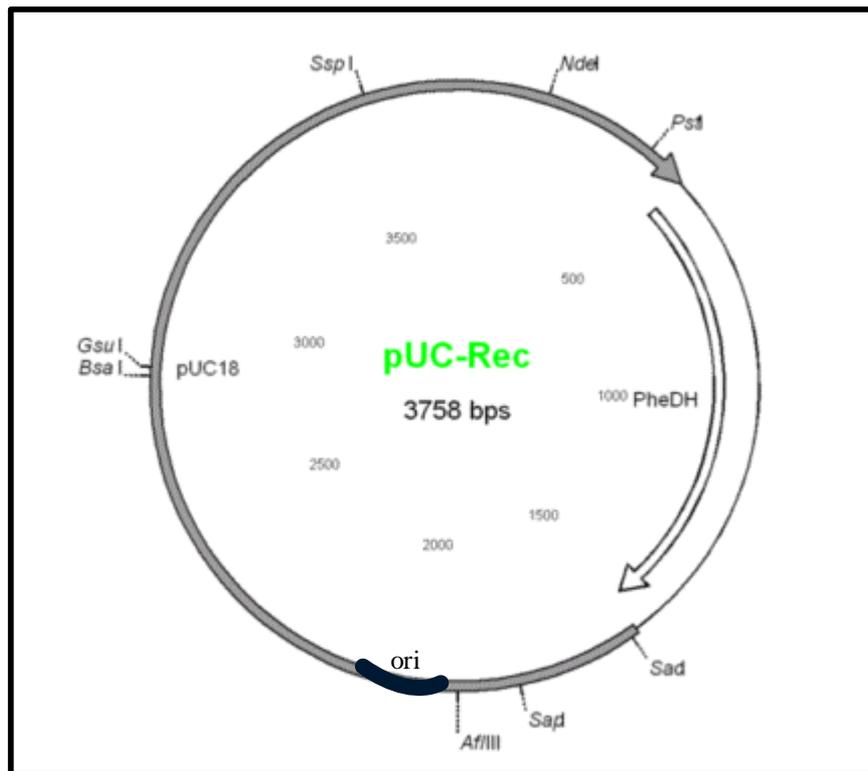


Abbildung 12: Vektorkarte des pUC18 -PheDH

Der Vektor enthält folgende Strukturelemente:

- ☞ ein regulierbares Promotor/Operator Element bestehend aus dem tac-Promotor und einer lac Operon Sequenz lac Z', die das Gen für die β -Galactosidase komplementiert
- ☞ ein Gen für die β -Lactamase, die dem plasmidhaltenden Stamm Ampicillinresistenz gewährt
- ☞ eine multiple cloning site, die das Einklonieren von Fremd-DNA [hier PheDH] erlaubt
- ☞ den Replikationsursprung ori

Tabelle 4: Ligationsansatz zur Klonierung der PheDH im pUC18-Vektor

Genfragment	50-200 ng 10 μ l
pUC18-Vektor	50 ng
2X Ligationspuffer	10 μ l
DTT	1 μ l
T ₄ -Ligase	1 μ l
H ₂ O	ad 20

Das PCR-Fragment wurde 5'-phosphoryliert und der 3' Überhang mittels Klenow-Fragment ergänzt, so dass glatte Enden entstanden. Nach Reinigung der DNA aus dem Enzymansatz

wurde eine Ligation durchgeführt und in kompetente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert. Nach Ausplattierung auf einer LB_{amp} Agarplatte wurden ca. 150 Kolonien erhalten.

5.1.4 Sequenzierung des *phedh*-Gens

Von den durch die Transformation erhaltenen Kolonien wurden exemplarisch 20 Kolonien ausgewählt und über Nacht in 5ml LB_{amp} Medium inkubiert. Aus der hochgewachsenen Kultur wurde eine Schnellisolierung der Plasmid-DNA durchgeführt. Mit der isolierten Plasmid-DNA wurde eine Restriktionsanalyse mit SacI und BamHI durchgeführt, die auf einem 0.8 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurde.

Die Sequenz der PheDH aus *Rhodococcus* sp. M4 ist in Abbildung 13 dargestellt.

```
ATGAGTATCGACAGCGCACTGAACTGGGACGGGGAAATGACGGTCACCCGATTCGACCG
GGAGACTGGTGCCCATTTTCGTCATTCGACTCGATTTCGACCCAACCTCGGACCGGGCGGCCG
GAGGCACCAGAGCCCGCACAGTACTCACAGCTGGCGGACGCCCTCACCGACGCCGGCAA
TTGGCGGGGGCGATGACGTTGAAGATGGCAGTGAGCAACCTTCCGATGGGCGGGGGCAA
ATCCGTCATTGCGCTTCCTGCGCCGCGTCATTCGATCGATCCGAGCACGTGGGCACGCA
TCCTCCGAATCCACGCCGAGAACATCGACAAGTTGTCCGGCAACTACTGGACCGGACCG
GACGTCAACACCAATTCGGCAGACATGGATACTCTGAACGACACCACCGAGTTCGTGTT
CGGACGGTCGCTCGAACCGCGCGCGGGTTCGAGCGCGTTCACCACCGCCGTTGGCG
TGTTTCGAGGCGATGAAGGCGACCGTCGCGCACCGTGGGCTGGGCTCACTCGACGGTTTG
ACGGTCTTGGTCCAAGGACTGGGGGCAGTCGGAGGATCATTTGGCATCCCTGGCCGCCGA
AGCGGGTGCGCAACTCTGGTGGCAGACACCGACACCGAGCGAGTAGCGCACGCTGTTG
CGTTGGGCCACACAGCGGTTGCCCTCGAGGACGTTCTGTCCACCCCGTGTGATGTCTTC
GCACCCTGCGCAATGGGCGGCGTCATCACCACCGAGGTGGCGCGAACACTCGACTGTTT
CGTCGTGGCCGGTGCCGCCAACAACGTCATCGCCGACGAGGCCGCCTCGGACATCCTGC
ACGCACGCGGAATTCTGTACGCTCCCGACTTCGTGGCCAACGCCGGCGGTGCCATCCAC
CTCGTAGGCCGGGAGGTTCTCGGTTGGTCCGAGTCGGTTGTCCACGAACGAGCAGTTGC
CATAGGCGACACCCTGAATCAGGTCTTCGAGATCTCCGACAACGACGGCGTCACCCCGG
ACGAGGCCGCCCGCACTCTCGCTGGACGGCGCGCCCGGAGGCCTCGACAACGACAGCG
ACTGCCTAGTAA
```

Abbildung 13: DNA-Sequenz der Phenylalanin Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. M4 mit zwei Stopcodons.

5.1.5 Expression des rec*PheDH*-Gens in *E.coli*

5.1.5.1 Klonierung der PheDH im Expressionsvektor PET16b

Zur Klonierung des rec*PheDH*-Gens in einen Expressionsvektor wurden durch entsprechendes Primerdesign Restriktionsschnittstellen an beiden Enden des Gens eingeführt. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine Klonierung des Gens in der gewünschten Orientierung downstream des Promotors. Außerdem kann durch die Wahl der Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende des Gens der Abstand des Startcodons ATG zum Promotor und damit auch zur Ribosomenbindungsstelle auf dem Plasmid beeinflusst werden. Die verwendeten Expressionsvektoren pET11a und pET16b tragen eine NdeI Restriktionsschnittstelle vor dem Startcodon des lacZ-Gens. Daher wurde an das 5'-Ende des rec*PheDH*-Gens eine NdeI-Restriktionsschnittstelle eingefügt. An das 3'-Ende des Gens wurde eine BamHI-Restriktionsschnittstelle hinter dem Stopcodon angehängt.

Der pET16b-Vektor enthält neben einem starken Promotor einen His-Tag upstream der MCS. Durch die Klonierung der *PheDH* über die Schnittstellen NdeI/BamHI wird der His-Tag am 3'-Ende des Gens angefügt, sodass die exprimierte *PheDH* einen His-Tag am N-Terminus besitzt. Dafür wurden folgende Primer für eine PCR konstruiert:

5'-For NdeI-Schnittstelle

CGGCATATGAGTATCGACAGCGCACTG

5'-Rev BamHI-Schnittstelle

GCGGATCCCTACTAGGCAGTCGCTGTC

Mit den konstruierten Primern wurde das Insert aus dem rec-pUC18 amplifiziert und in die Expressionsvektoren pET-16b und pET-11a an der NdeI/BamHI ligiert. Die Strategie zur Expression der PheDH ist in Abbildung 14 dargestellt.

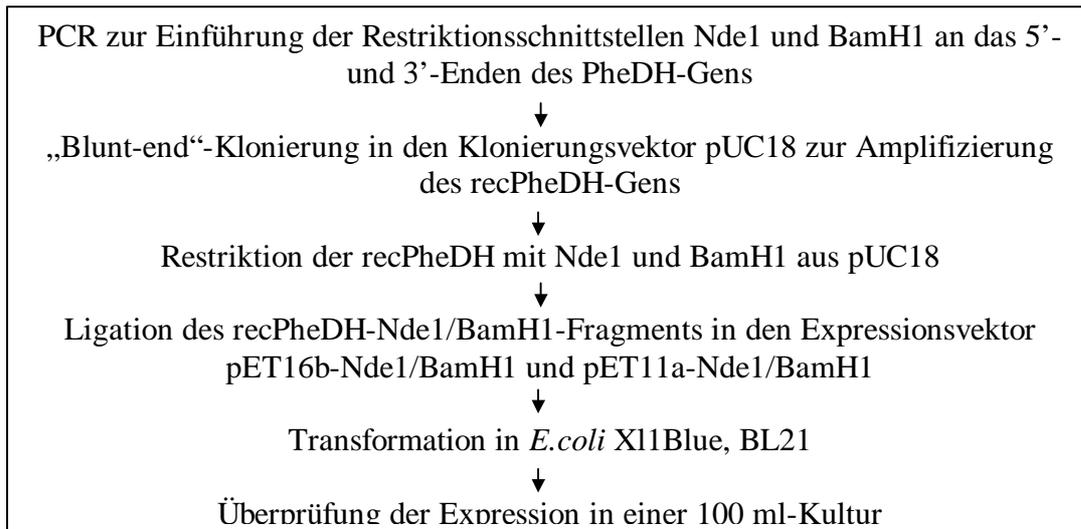


Abbildung 14: Fließschema zur Klonierung des recPheDH-Gens in die Expressionsvektoren PET11a oder PET 16b

Nach der Vermehrung der rekombinanten Vektoren (pET-16b und pET-11a) im BL21-Stamm wurde eine Schnellisolierung des Plasmids durchgeführt und dieses mit NdeI/BamHI zum Nachweis des *PheDH*-Gens verdaut. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt.

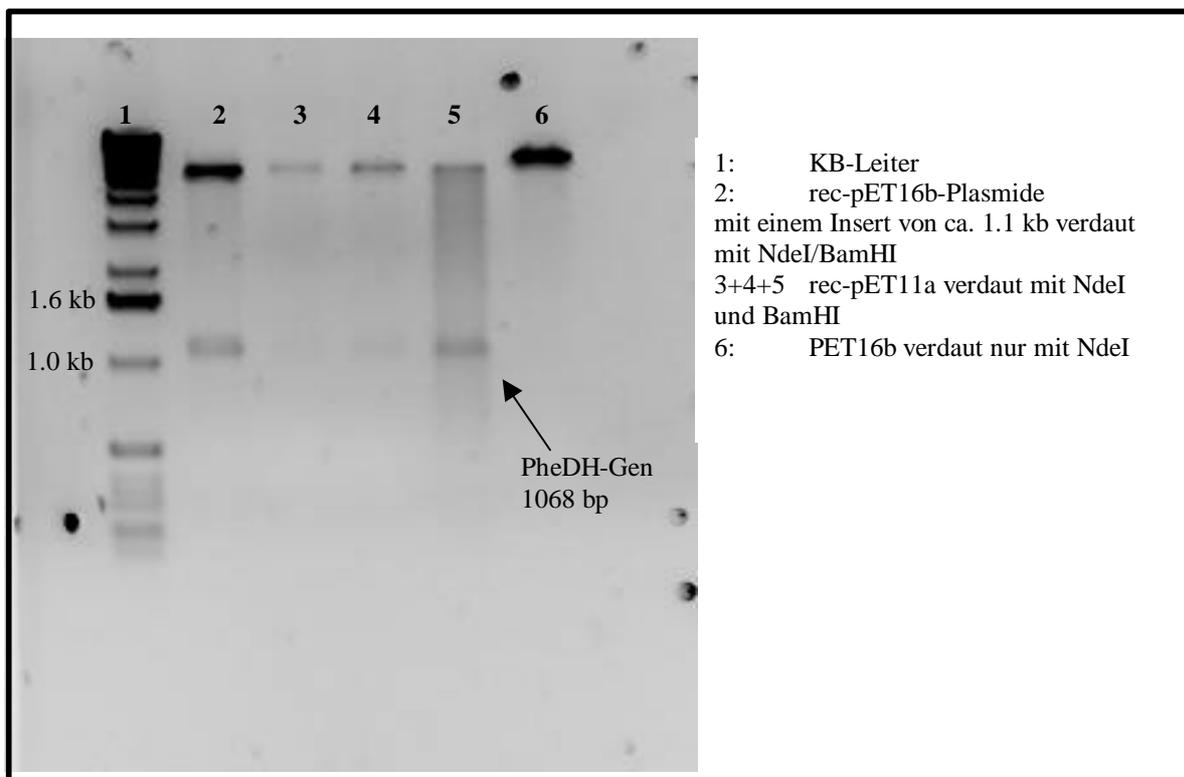


Abbildung 15: Agarose-Gel zur Überprüfung der Restriktion der recpET-16b- und 11a-Vektoren. Bei einer Größe von etwa 1100 bp tritt eine Bande des geschnittenen Inserts auf Bahn 2 pET-16b und Bahn 5 pET-11a. Als Marker wurde eine KB-Leiter (Gibco) verwendet Bahn 1. Der Ansätze wurden mit NdeI/BamHI behandelt.

5.1.5.2 Expression der PheDH im PET-System

Die Induktion der rekombinanten Stämme erfolgte bei einer OD_{600} sowohl mit 0.5 als auch 1.5 mM IPTG bei 37°C. Das SDS-Gel (Abbildung 16) zeigt eine breite Bande bei 39 kDa, die der PheDH entspricht. Es wurde aber keine Enzymaktivität nachgewiesen. Eine Analyse des exprimierten Proteins auf einem SDS-Gel (12.5 %ig) zeigte die Bildung von Einschlusskörpern (inclusion bodies).

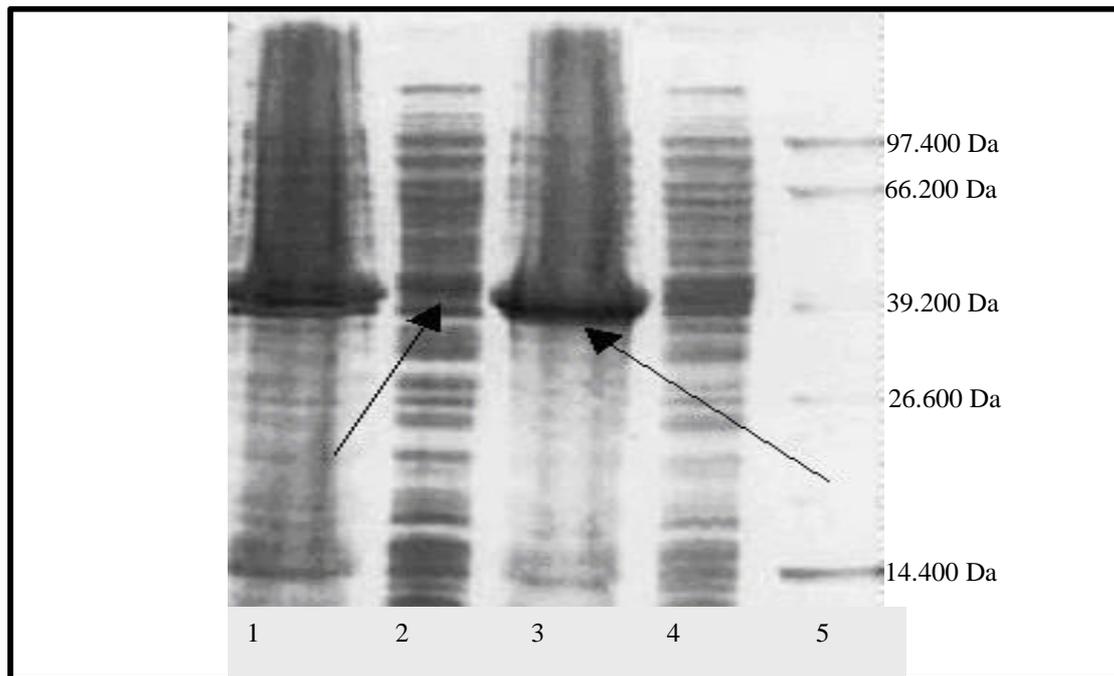


Abbildung 16: SDS-Gel zur Überprüfung der Expression. Bei einer Größe von etwa 39 kDa tritt eine Bande auf. Bahn 1: Rohextrakt aus dem rec-pET16b in *E. coli* BL21 das Rohextrakt wurde nicht abzentrifugiert. Bahn 2: Überstand des abzentrifugierten Rohextrakts aus rec-pET16b in *E. coli* BL21. Bahn 3: Rohextrakt aus dem rec-pET11a in *E. coli* BL21. Bahn 4: Überstand des abzentrifugierten Rohextrakts aus rec-pET11a in *E. coli* BL21. 5: Marker

Um die Bildung von inclusion bodies zu minimieren, wurde das *PheDH*-Gen in weitere Plasmide ohne His-Tag (pTRC99a, pBtac, pKK223-3) kloniert. Auch die Klonierung in diese Vektoren führte zu inclusion bodies. Die Induktion der rekombinanten Zellen durch niedrigere IPTG-Konzentrationen bzw. die Anzucht bei erniedrigten Temperaturen (bis 25°C) konnte dieses Problem nicht lösen. Ein weiterer Ansatzpunkt war die Manipulation auf genetischer Ebene. Inclusion bodies könnten durch eine schwächere Transkription bzw. Translation verhindert oder zumindest minimiert werden. Diesem Gedanken folgend wurde die *PheDH* einerseits in einen anderen Expressionsvektor mit schwächerem Promotor

umkloniert. Andererseits wurde der Abstand zwischen dem Startcodon und der Ribosomenbindungsstelle variiert.

5.1.5.3 Klonierung des PheDH-Gens in pkk223-3

Die optimale Expression eines Enzyms erreicht man normalerweise, wenn das Startcodon des dazugehörigen Gens zwischen 7 und 9 bp von der Ribosomenbindungsstelle entfernt ist (Esipov *et al.*, 1999; Tedin *et al.*, 1997). Diese Klonierungsstrategie wurde für die PheDH in dieser Arbeit auch mit mehreren Vektoren, pTRC99A, pET16b, pET11a und pBtac, durchgeführt. Die Klonierungen führten in allen Fällen zu einer starken Expression des Proteins, das aber, wie oben dargestellt, in unlöslicher Form (inclusion bodies) vorlag. Unlösliche Proteine können durch eine zu schnelle Expression gebildet werden, die den Proteinen nicht genügend Zeit und Raum zur Faltung lässt. Für die Vermeidung der Bildung von unlöslichen Proteinen wurden physikalische bzw. biochemische Methoden (Temperatur, Induktion, Schüttelgeschwindigkeit) (Shin *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997) während des Wachstums variiert. Dafür wurden die rekombinanten Zellen bei 25°C bzw. 30°C inkubiert sowie eine Inkubation bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 80 rpm, die eindeutig niedriger liegt als üblicherweise mit 140 rpm, durchgeführt. Durch diese Parameter konnte das Wachstum negativ beeinflusst werden, das aber nicht zur Vermeidung der „inclusion bodies“ führte. Eine Induktion mit verschiedenen IPTG- Konzentrationen (0,1mM-1,5 mM) erzielte ebenso keine positiven Ergebnisse.

Wie bereits oben angedeutet kann durch entsprechende Manipulation auf genetischer Ebene eine schwächere Transkription bzw. Translation erreicht werden, was zu einer langsameren und schwächeren Expression führt. Diesen bleibt dann genug Zeit und Raum zur Faltung und man erhält zwar weniger, dafür aber aktives Enzym. Um dies zu erreichen, erfolgte die Klonierung an der SmaI-Schnittstelle im Expressionsvektor pKK223-3 mit einer „nicht optimalen“ Entfernung von 14 bp des Startcodons zur Ribosomenbindungsstelle. Dadurch ist die Translation schwächer mit dem bereits oben erklärten Effekt. Zusätzlich dazu besitzt das verwendete Plasmid pKK223-3 einen schwächeren Promotor als beispielsweise die oben verwendeten pET Systeme, was zu einer weiteren Abschwächung der Expression führt. In Abbildung 17 ist die Vektorkarte dargestellt.

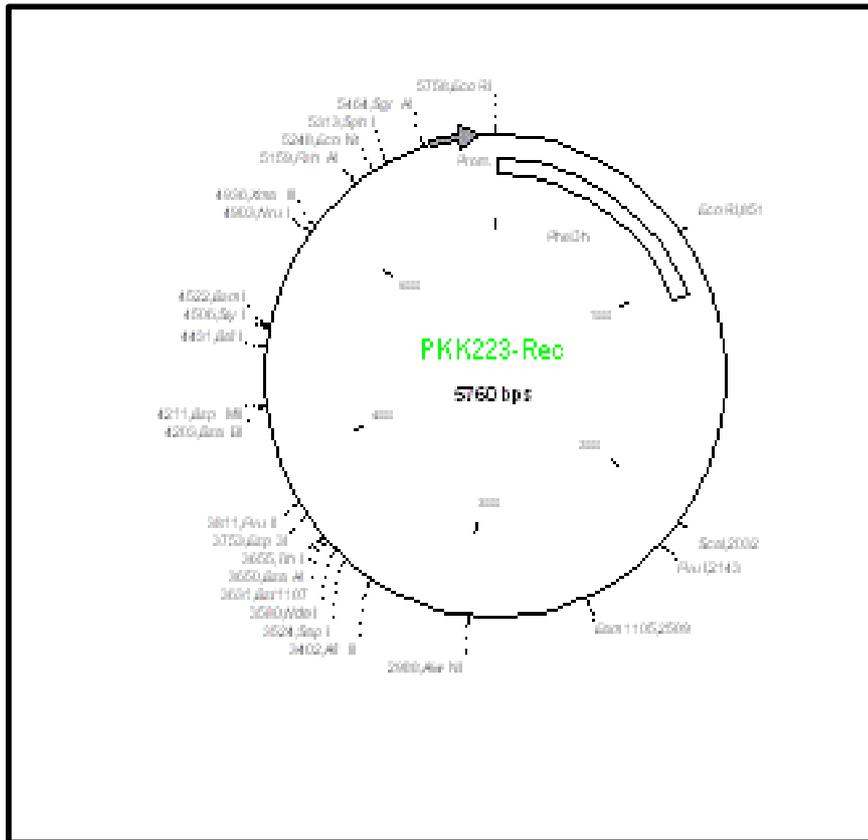


Abbildung 17: Vektorkarte des pKK-223-3recPheDH. Das PheDH-Gen wurde an der SmaI-Schnittstelle im Expressionsvektor pKK-223-3 mit einem Abstand zur Ribosomenbindungsstelle von 14bp ligiert.

Der Vektor enthält folgende Strukturelemente:

- ☞ ein regulierbares Promotor/Operator Element bestehend aus dem tac-Promotor. Dadurch kann die Expression über IPTG, das den Repressor des lac-Operons inaktiviert, induziert werden
- ☞ abwärts der Klonierungsstelle den rrnB Transkriptionsterminator, der das Ende der Transkription signalisiert
- ☞ eine „multiple cloning site“ für die Insertion von Fremd-DNA [hier rec-PheDH], dadurch wird das lacZ-Gen inaktiviert und eine blau-weiß-Selektion rekombinanter Klone ermöglicht
- ☞ den Replikationsursprung [Ori] und das Gen für die β -Lactamase, die die Ampicillinresistenz bereitstellt
- ☞ die lacZ Ribosomenbindungsstelle

Um die Klonierung des PheDH-Gens an einer „nicht optimalen“ Entfernung des Startcodons zur ribosomalen Bindungsstelle durchführen zu können, wurde das *recPheDH*-Gen in die „multiple cloning site“ des pKK223-3 Expressionsvektors über glatte Schnittstellen an der SmaI Restriktionsschnittstelle [CCCGGG] ligiert. Dabei wurde zunächst der Vektor mit dem Restriktionsenzym SmaI geschnitten und anschließend mit einer alkalischen Phosphatase inkubiert, um eine 5'-Dephosphorylierung zu erreichen. Das amplifizierte *recPheDH*-Gen wurde mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und mittels Agarosegelsaufreinigung gereinigt. Die benötigten Primer für die 5'- und 3'-Enden sind:

5'Primer (5'Phe-for)

5' ATG AGT ATC GAC AGC GCA CTG AAC

3'Primer (5'Phe-rev)

5' CTA CTA GGC AGT CGC TGT CGT TGT

An den 3'-Primer wurden hinter die letzte Aminosäure des C-Terminus 2 Stopcodons angefügt, um eine effiziente Termination der Translation zu gewährleisten.

Die Vektor-DNA konnte über Phenol/Chloroform Fällungen wiedergewonnen werden und wurde für die Ligation mit dem aufgereinigten *recPheDH*-Gens eingesetzt. Für die anschließende Transformation wurden kompetente *E. coli* HB101 bzw. JM-105 Zellen hergestellt (Hanahan, 1983) und verwendet.

Einige der Transformanden wurden über Nacht in 5 ml LB_{amp} inkubiert, und aus der hochgewachsenen Kultur Plasmid-DNA isoliert. Mit den durch Schnellisolierung gewonnenen Plasmiden wurde eine Restriktionsanalyse mit EcoRI durchgeführt. 5 µL des Ansatzes wurden auf einem Agarosegel (0,8 %) elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 18).

In der „multiple cloning site“ des pKK223-3-Vektor befindet sich vor der SmaI-Schnittstelle, über die die PheDH kloniert wurde, eine EcoRI-Schnittstelle. Da sich im Gen an Position 821 ebenfalls eine EcoRI-Schnittstelle befindet, führt ein Verdau mit EcoRI zu einem Fragment von etwa 830 bp.

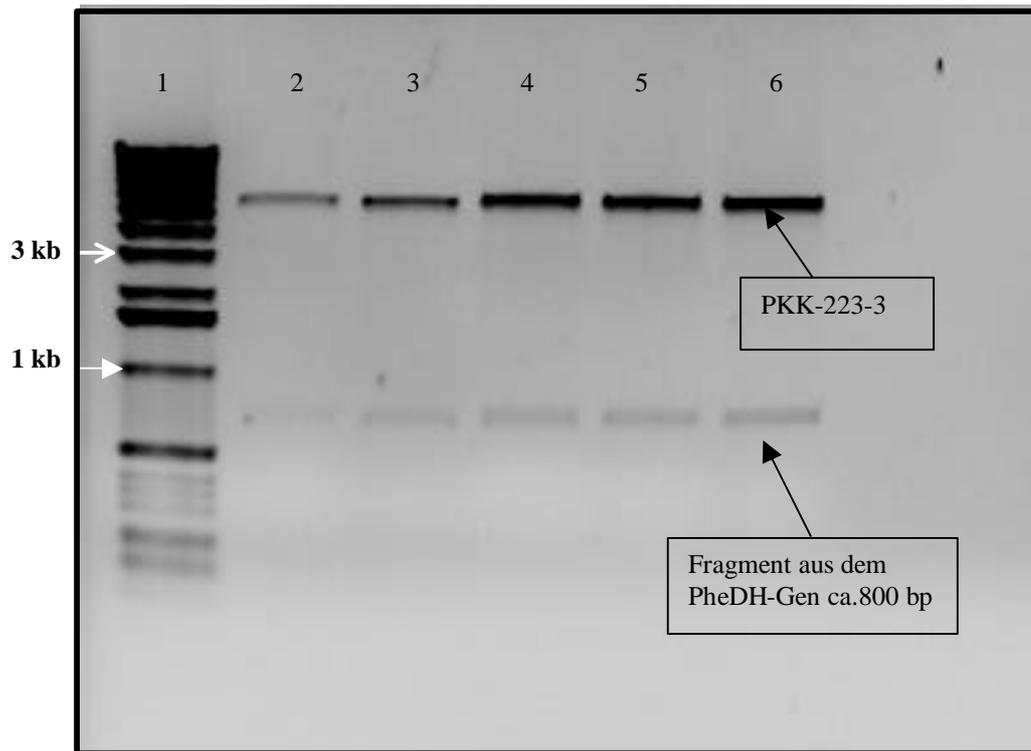


Abbildung 18: rec-pKK223-3-PheDH verdaut mit EcoRI. 1: KB-Marker, 2-6 recPhe-pKK223-3 verdaut mit EcoRI (verschiedene Konzentrationen). Nach einer Restriktionsanalyse taucht eine Bande mit der erwarteten Größe von ca. 800bp auf.

5.1.5.4 Expression der recPheDH im pKK223-3

Das beschriebene Expressionssystem wurde zunächst in weitere *E. coli* Stämme (Tabelle 5) transformiert und hinsichtlich ihrer Expressionsrate sowie der nachweisbaren spezifischen Aktivität im zellfreien Rohextrakt untersucht. Das Ergebnis der Expressionsuntersuchung ist in Tabelle 5 dargestellt. Es wurden zwei weitere Stämme ausgewählt [JM105 und UT5600] und in 100 ml Kulturen [+amp] kultiviert. Beim Erreichen einer OD_{600} von 0.5 wurden sie mit 1 mM IPTG induziert. Nach 7 h wurde die Expression abgebrochen und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Aus den Daten wird ersichtlich, dass in allen untersuchten Stämmen eine Expression der NAD-abhängigen Phenylalanin Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. M4 nachzuweisen war. Die höchsten spezifischen Aktivitäten im zellfreien Rohextrakt konnten mit dem *E. coli* JM105 erzielt werden. Infolgedessen wurde dieser Stamm für alle weiteren Untersuchungen und für die Klonierung und Expression der Mutanten verwendet.

Tabelle 5: Expressionsresultate der rekombinanten *E.coli* Stämme. Die Aktivitäten wurden im Rohextrakt „30 %iger Aufschluss“ gemessen.

	Aktivität U/ml Rohextrakt	Spez.Aktiv U/mg im Rohextrakt
<i>Rhod.sp.</i> M4	100 U/ml	7
UT5600	420U/ml	46
HB101	550 U/ml	61
JM105	2000 U/ml	250

5.1.6 Optimierung der Induktionsparameter

Zur Optimierung der Expression der *recPheDH* in *E. coli* wurden neben der Auswahl eines geeigneten Vektor-Wirt-Systems die Induktionsparameter variiert, um eine effiziente Proteinexpression zu erzielen.

Einerseits wurde die Induktorkonzentration zwischen 0 und 3 mM IPTG (?-D-Isopropylthiogalaktosid) bei einem konstanten Induktionszeitpunkt ($OD_{600} = 0.6$) variiert (Abbildung 19). Die Untersuchung führte zu dem Ergebnis, dass mit einer IPTG-Konzentration zwischen 0.7mM und 1.2 mM eine optimale Expression zu erzielen war. In der Kontrollexpression ohne IPTG-Induktion konnte nur geringe PheDH-Aktivität (35 U/ml) im Rohextrakt nachgewiesen werden. Folglich unterdrückte der lac I-Repressor die Expression des PheDH-Gens im nichtinduzierten Zustand fast vollständig. Dies ist von Vorteil, da die Expression des Fremdproteins eine Belastung des Zellstoffwechsels bedeutet und zu einer erheblich geringeren Zellausbeute führt.

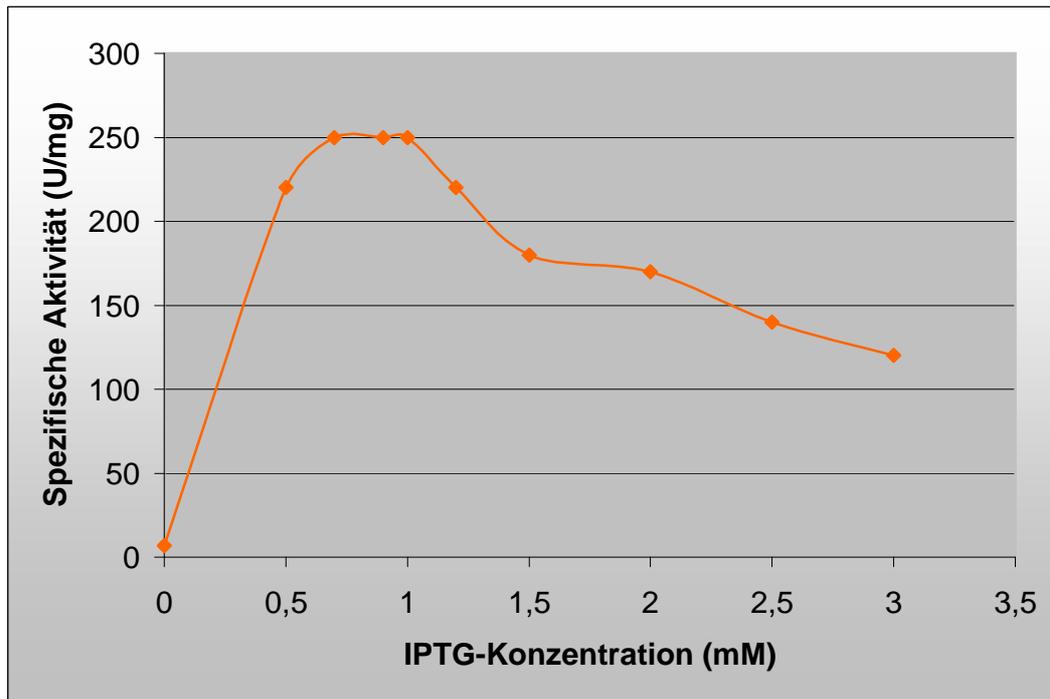


Abbildung 19: Variation der IPTG-Konzentration bei der Induktion von pkk-223-3-PheDH/ JM105. Die Kulturen wurden mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen zwischen 0 und 3 mM induziert. Die spezifische Aktivität wurde im Rohextrakt gemessen.

Darüberhinaus wurde der Zeitpunkt der Induktion nach Inokulation variiert, wobei alle Kulturen mit 1 mM IPTG induziert worden sind. Die Zellen wurden 24 h nach Inokulation geerntet und die spezifischen Aktivitäten in den zellfreien Rohextrakten bestimmt. Die Ergebnisse der Induktionsuntersuchungen sind in Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellt. Es zeigt sich, dass der Zeitpunkt der Induktion einen großen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat.

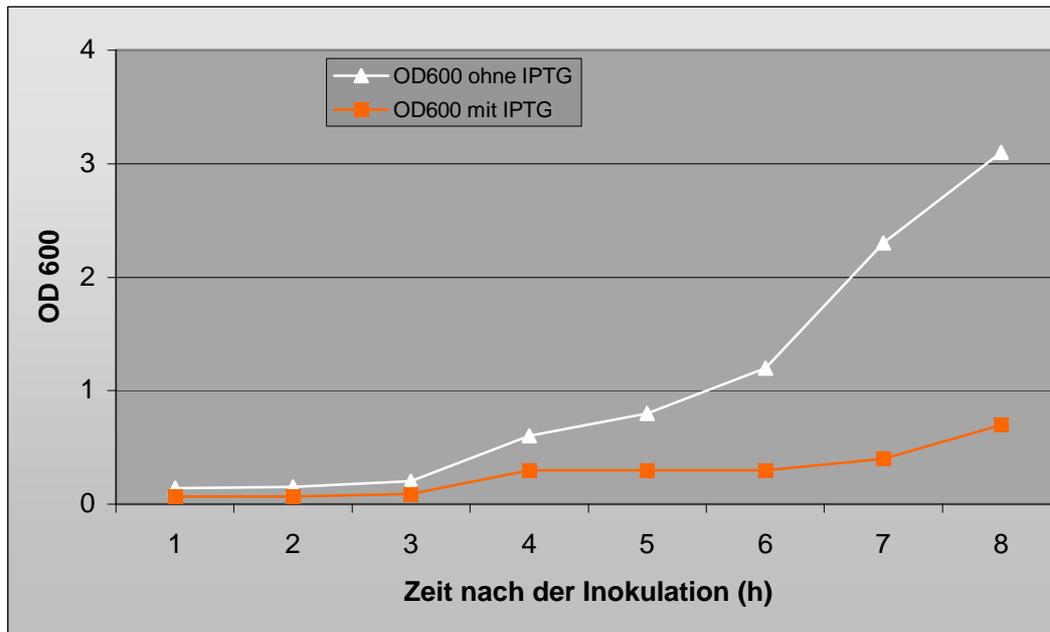


Abbildung 20: Wachstumsverhalten für *E. coli* nach der Induktion

Bei der Betrachtung des Verlaufs der OD_{600nm} im untersuchten Zeitraum fällt auf, dass in der Kultur, die zum Zeitpunkt der Inokulation mit 1 mM IPTG induziert worden ist, nur eine geringe Zunahme der OD_{600nm} zu betrachten war (Abbildung 20). Hingegen zeigt die Kontrollkultur ohne IPTG eine deutliche Zunahme der Zelldichte.

Eine Variation des Induktionszeitpunktes für die Erzielung der maximalen Induktion wurde durchgeführt (Abbildung 21). Aus Abbildung 21 ist zu entnehmen, dass die maximale Induktion des pKK223-3-PheDH im *E. coli* JM105 3 ½ h von der Inokulation erzielt werden konnte. Dieser Zeitpunkt entspricht einer OD_{600} von 0,5-0,55, d.h. die Zellen befanden sich während der IPTG- Zugabe am Anfang der logarithmischen Wachstumsphase.

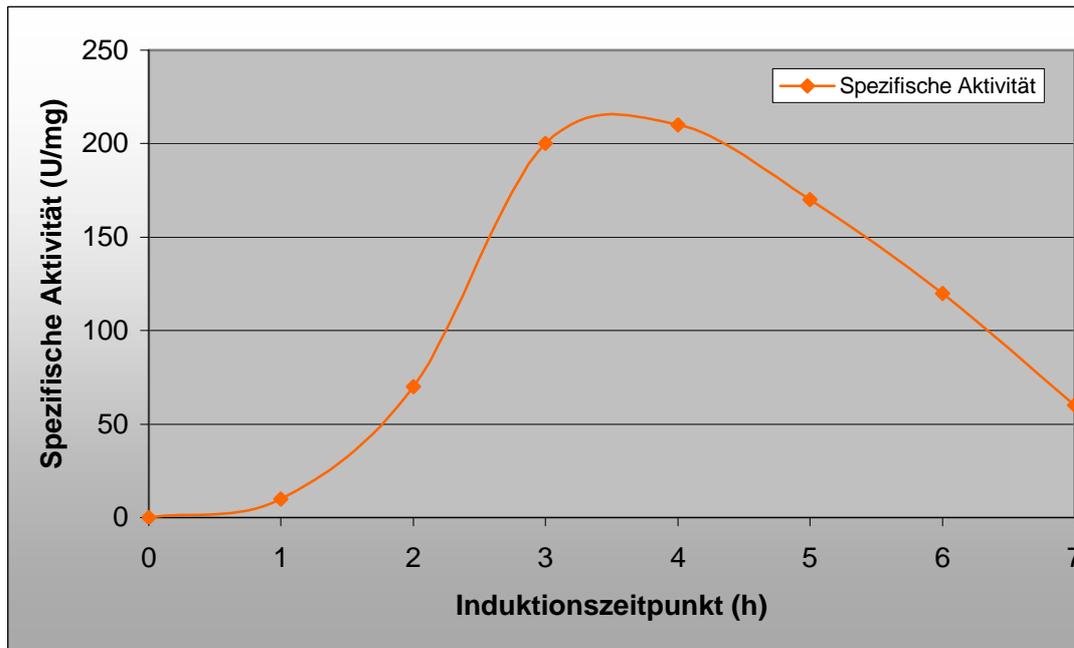


Abbildung 21: Variation des Induktionszeitpunktes in Expressionskulturen von pkk-223-3-PheDH/JM105. Die Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 1 mM IPTG induziert. Die spezifische Aktivität wurde im Rohextrakt gemessen.

5.1.7 Reinigung der recPheDH aus *E. coli* JM105

Die Reinigung der recPheDH aus *E. coli*-Rohextrakten erfolgte in Anlehnung an das Reinigungsprotokoll der PheDH aus *Rhodococcus* sp. M4 (Hummel *et al.*, 1987). Zunächst wurden die Bakterienzellen durch Disintegration mit Glasperlen aufgeschlossen. Im Anschluß daran erfolgte ein zusätzlicher Reinigungsschritt zu den Literaturangaben durch eine Hitzedenaturierung der Begleitproteine in Gegenwart von 5 % (w/v) L-Phenylalanin und Entfernung des L-Phenylalanin mittels Gelfiltrationschromatographie. Die nach dieser Methode präparierte recPheDH-Fraktion konnte über Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose FF bis zur Homogenität gereinigt werden. Abbildung 22 (Bahn 1+2) zeigt die Auftrennung der gereinigten recPheDH in einem SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung.

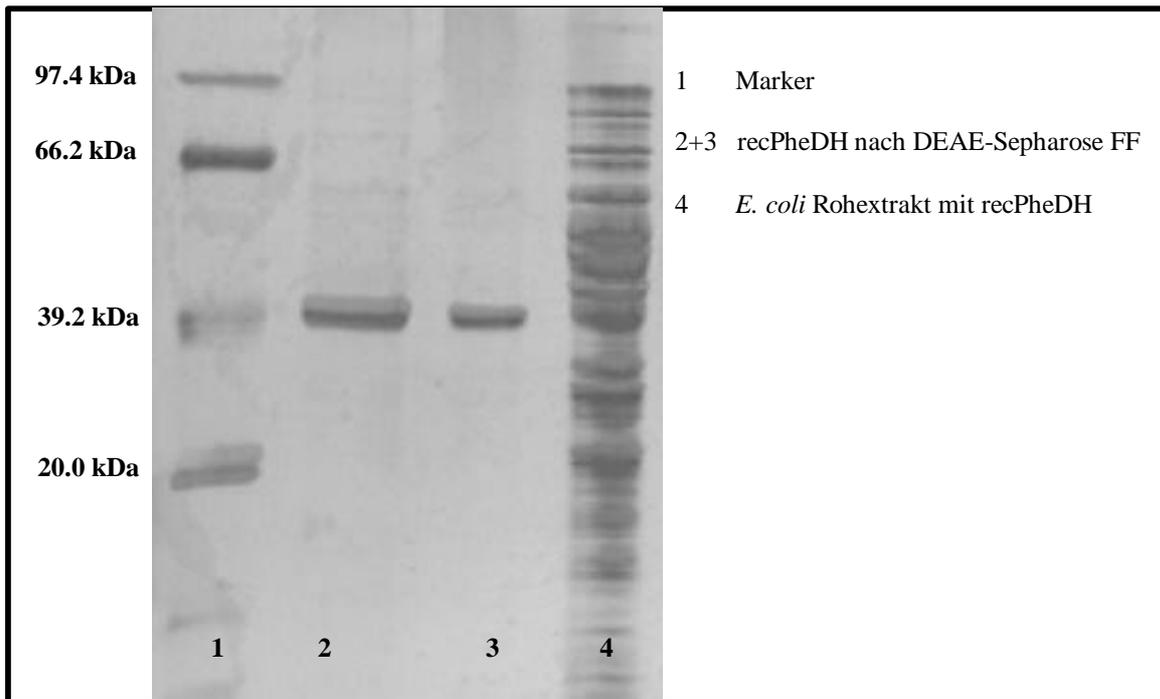


Abbildung 22: SDS-PAGE (12.5 %, Silberfärbung) zur Überprüfung der Reinheit der recPheDH nach DEAE-Sepharose FF-Chromatographiegel. 1 Marker, 2+3 recPheDH nach DEAE-Sepharose FF, 4 Rohextrakt aus *E.coli*.

Mit dem vorliegenden Reinigungsprotokoll (Tabelle 6) konnte die recPheDH bis zur Homogenität gereinigt werden. Im Gegensatz zur Reinigung der PheDH aus *Rhodococcus* sp. M4 (Hummel *et al.*, 1987) und PheDH aus *Rhodococcus maris* K-18 (Misono *et al.*, 1989), die 3 bzw. 8 Schritte erfordert, waren bei der Reinigung der rec-PheDH nur zwei Schritte nötig.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Reinigung der recPheDH aus *E.coli*-Rohextrakt

Reinigungsschritt	Aktivität [U/ml]	Proteingehalt [mg/ml]	Spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungs- faktor
Rohextrakt	2000	8	250	100	1
Hitzedenaturierung + Sephadex G25	2300	6.6	348	86	1.4
DEAE-Sepharose FF	121	0,16	756	58	3
Aufkonzentrierung (Centriprep 10)	4500	7	690	51	3

5.1.8 Substratspektrum und K_M -Werte

Die Phenylalanin Dehydrogenase katalysiert die oxidative Desaminierung von L-Phenylalanin und mehrerer anderer L-Aminosäuren und die reduktive Aminierung von Phenylpyruvat und p-Hydroxyphenylpyruvat. Das Enzym benötigt NAD^+ als natürliches Coenzym.

Verschiedene Aminosäuren und 2-Ketosäuren sind als Substrate für die Wildtyp-PheDH vom *Rhodococcus* sp. M4 bekannt (Tabelle 7) (Hummel *et al.*, 1987). In dieser Arbeit wurden die biochemischen Eigenschaften (Tabelle 8) der Wildtyp-PheDH mit der Rec-PheDH verglichen und eine 100 %ige Ähnlichkeit festgestellt. Das bedeutet, dass beide Enzyme identische Eigenschaften besitzen.

Tabelle 7: Untersuchte Substrate der Rec-PheDH.

Substrat	V_{max}	K_M
Phenylpyruvat	100	$1.6 \cdot 10^{-4}$
p-Hydroxyphenylpyruvat	5	$2.3 \cdot 10^{-3}$
Indolpyruvat	3	$7.9 \cdot 10^{-3}$
2-Keto-4-methylmercaptobutyrat	33	$2.1 \cdot 10^{-3}$
A: Reduktive Aminierung: Der Wert des V_{max} ist relativ zum Phenylpyruvat als 100		
Substrat	V_{max}	K_M
L-Phenylalanin	100	$7.2 \cdot 10^{-4}$
L-Tyrosin	12	$3.4 \cdot 10^{-3}$
L-Tryptophan	2	$1.7 \cdot 10^{-2}$
L-Methionin	4	$4.8 \cdot 10^{-4}$
B: Oxidative Desaminierung: Der Wert des V_{max} ist relativ zum L-Phe		

Tabelle 8: Kinetische Parameter für die Rec-PheDH

Reduktive Aminierung	
KM (PPy)	0.13 mM
KI (PPy)	7.34 mM
KI (Phe)	2.96 mM
KM (NADH)	0.13 mM
KI (NAD ⁺)	1.27 mM
KM (NH ₄ ⁺)	387 mM
Oxidative Desaminierung	

KM (Phe)	0.87 mM
KI (Phe)	17.85 mM
KI (PPy)	0.07 mM
KM (NAD)	0.27 mM
KI (NADH)	0.002 mM

5.1.9 Temperaturstabilität

Es wurde eine Desaktivierungskinetik zur Ermittlung der Temperaturstabilität durchgeführt.

Die Proben wurden bei Temperaturen zwischen 20 und 50°C inkubiert und in bestimmten Zeitintervallen (1 h, 2 ½ h, und 36 h) zur Bestimmung der Restaktivität Aliquots entnommen.

In Abbildung 23 ist die Bestimmung der Aktivität nach 36 h bei verschiedenen Temperaturen dargestellt.

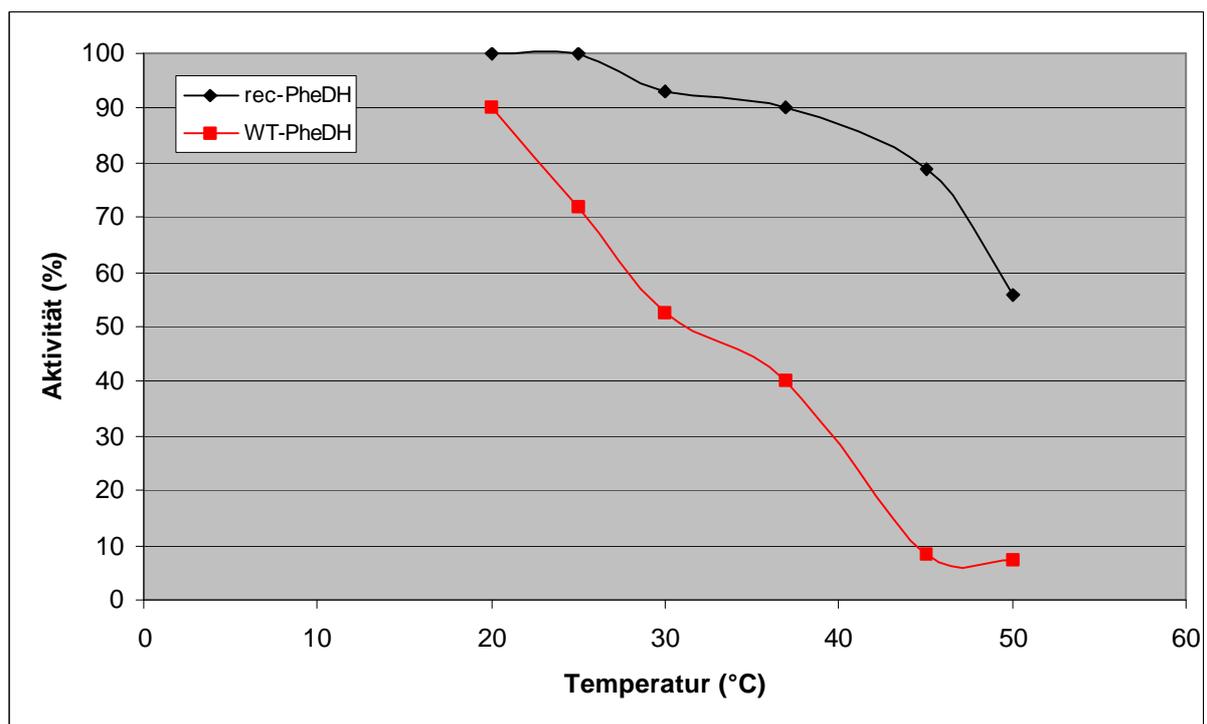


Abbildung 23: Temperaturstabilität der rec-PheDH im Vergleich zur WT-PheDH im Rohextrakt.

Nach 36 h konnten bei 37°C noch 90 % Restaktivität der rec-PheDH gemessen werden. Im Vergleich dazu wurden nur noch 56 % Restaktivität bei einer 36 stündigen Inkubation der rec-PheDH bei 50°C ermittelt. Die Wildtyp-PheDH zeigte nach 36h bei 30°C nur noch etwa 50 % Restaktivität .

5.1.10 Temperaturoptimum

Die Reaktionstemperatur wurde direkt in der Küvette gemessen. Die Ansätze wurden auf die jeweiligen Messtemperaturen (20-50°C) temperiert, anschließend das Enzym hinzugegeben und die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gemessen.

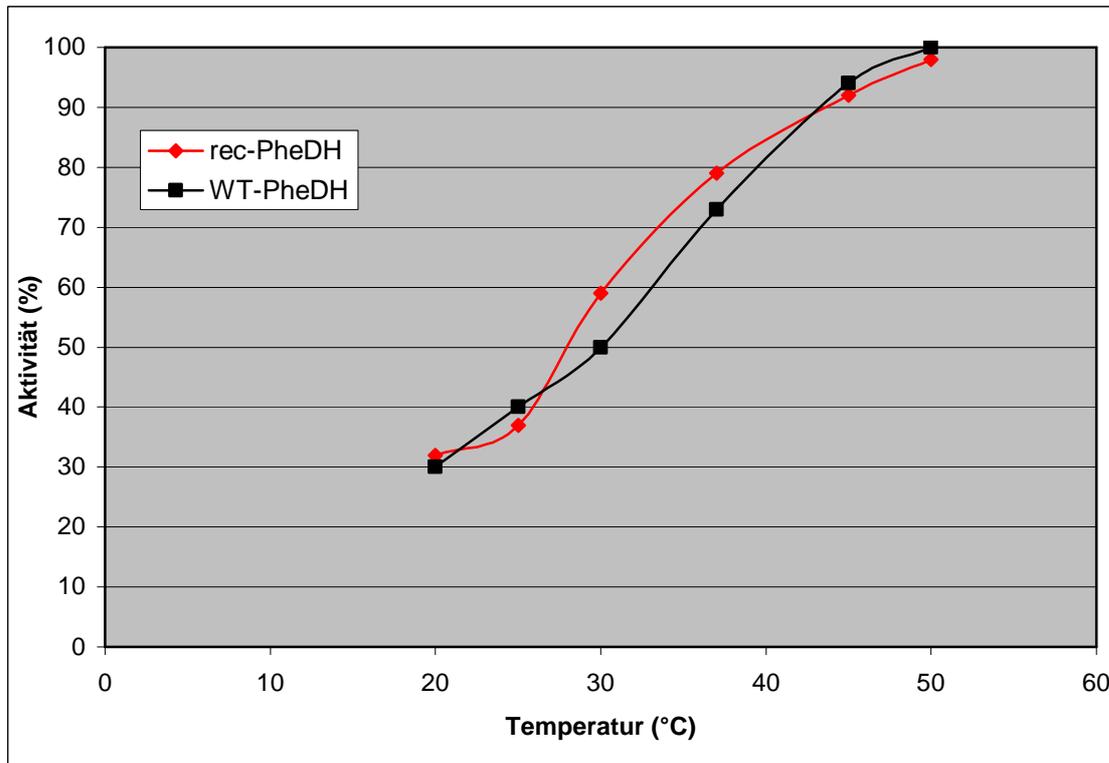


Abbildung 24: Temperaturoptimum der recPheDH im Vergleich zur WT-PheDH, Enzym-Präparate aus dem Rohextrakt JM105. 100 % bei der rec-PheDH entsprechen 270 U/mg, und im WT-PheDH 24 U/mg.

Die optimale Temperatur sowohl für die rec-PheDH als auch für WT-PheDH liegt bei 50°C, die Enzymtests und Synthesereaktionen wurden jedoch aus Stabilitätsgründen bei 30°C durchgeführt.

5.1.11 pH-Optimum

Die meisten Enzyme zeigen bei einem charakteristischen pH-Wert ihre maximale Aktivität, oberhalb und unterhalb dieses Wertes nimmt die Aktivität ab.

Eine mögliche Erklärung für die Abhängigkeit der Enzymaktivität ist, dass saure und basische Aminosäuren pH-Wert-abhängig ionisiert oder nicht ionisiert vorliegen. Ausserdem beeinflusst die Protonenkonzentration bei Beteiligung von H^+ an der Reaktion ihr thermodynamisches Gleichgewicht. Für die Bestimmung des pH-Optimums der rec-PheDH wurde der Enzymtest bei verschiedenen pH-Werten von 5.0-11 durchgeführt. Dabei wurde

der Tris/HCl-Puffer im Bereich von pH-Wert 7-10 mit NaOH bzw. HCl eingestellt. Für niedrige sowie extrem hohe pH-Werte wurde der Puffer Glycyl-Glycin benutzt. Dieser besitzt in diesen Bereichen eine hohe Kapazität.

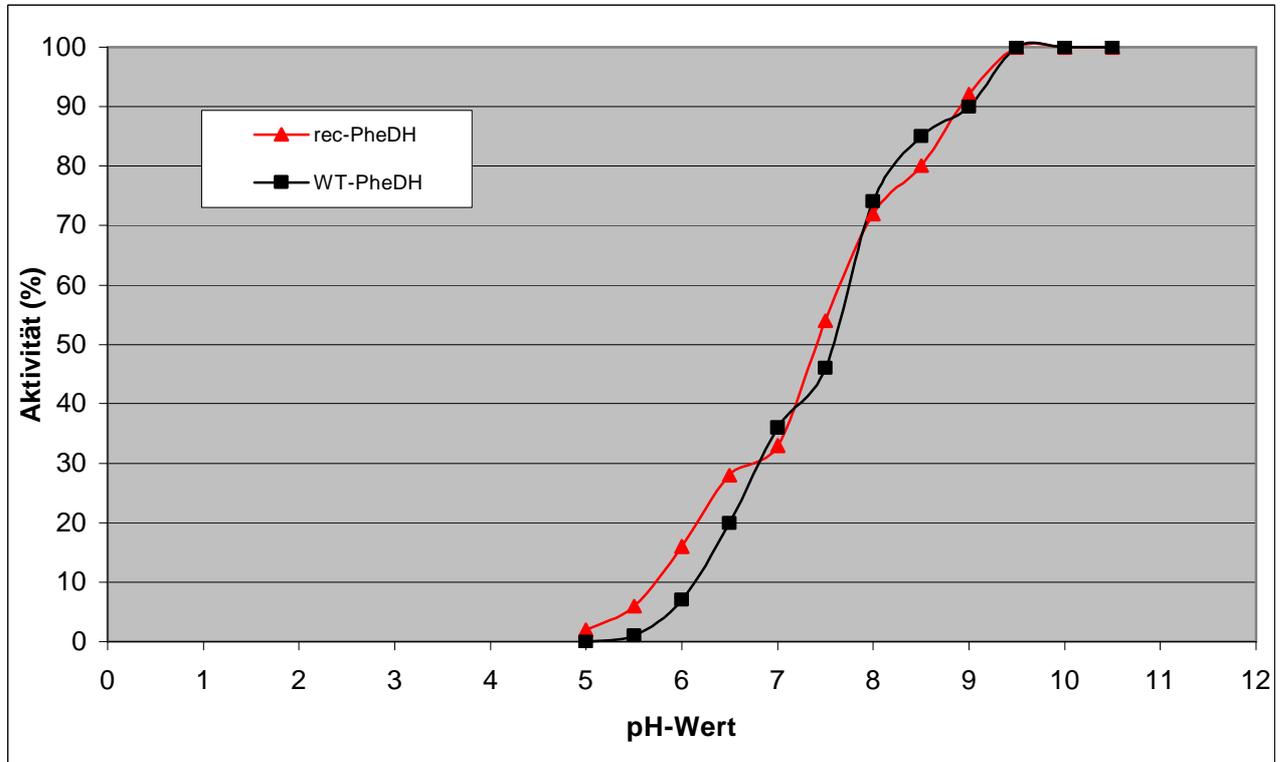


Abbildung 25: pH-Optimum der rec-PheDH für die reduktive Aminierung. 100 % bei der rec-PheDH entsprechen 190 U/mg, und im WT-PheDH 16 U/mg. Die Messung wurde bei 30°C durchgeführt.

5.2 Hochzelldichte Fermentation (HZD)

5.2.1 Zuführung von Nährstoffen, Nebenproduktbildung und Wachstum

Der als konservierte 1 ml Kultur bei -80°C gelagerte rekombinante Stamm *E. coli* JM 105 wurde als Vorkultur in 400 ml LB amp-Medium bei 37°C 18 h inkubiert. Damit wurde ein 10L Fermenter (Hochzelldichte Medium) 4 %ig angeimpft.

Die Form der Nährstoffzuführung ist ein kritisches Parameter bei der HZD-Fermentation, da nicht nur die maximal erreichbare Zelldichte, sondern auch die Zellproduktivität beeinflusst wird (Lee, 1996). Denkbar sind sowohl konstante als auch kontinuierlich veränderbare Fütterungsraten.

Beide Möglichkeiten der Nährstoff-Zuführung wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf Wachstumsrate, erreichbare End-Zelldichte und Acetatbildung des PheDH- Produktionsstammes *E. coli* JM105 (rec-pKK-223-3-PheDH) untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 26 und 27 dargestellt.

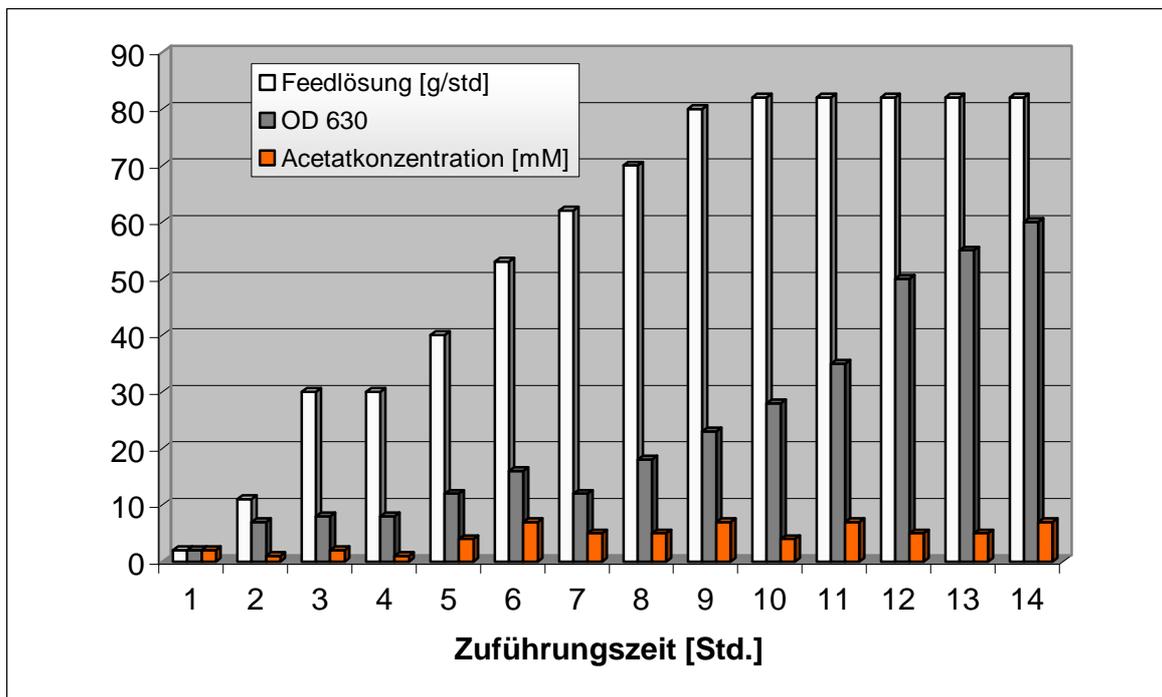


Abbildung 26: Wachstumsverhalten und Acetatbildung durch *E. coli* JM105 [rec-pKK-223-3-PheDH] bei linearer Erhöhung der Glucosezufuhr in HZD-Medium mit Hefeextraktzusatz bei 30°C . Die Acetatbildung wurde mittels HPLC bestimmt.

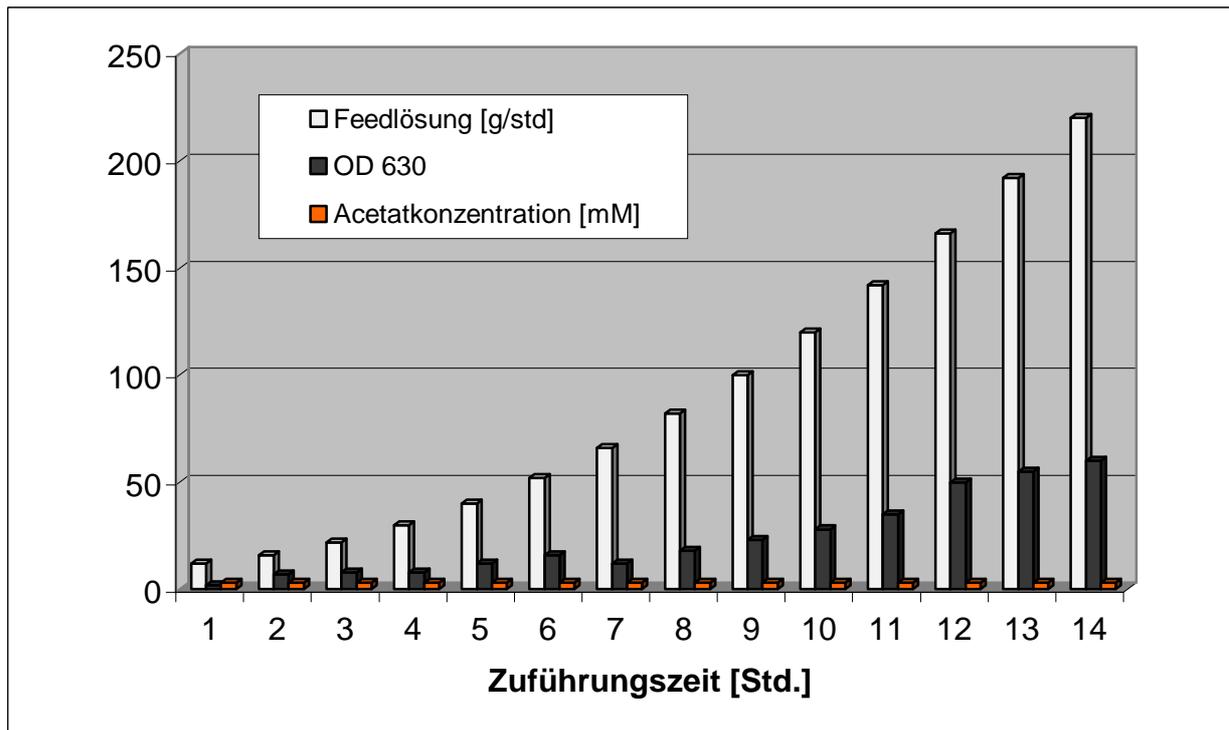


Abbildung 27: Wachstumsverhalten und Acetatbildung durch *E. coli* JM105 [rec-pKK223-3-PheDH] in HZD-Medium mit Hefeextraktzusatz bei 30°C und exponentieller Erhöhung der Glucosezufuhr.

Anders als die erreichte End-Zelldichte während der Nährstoffzuführung über 14 Stunden, waren unterschiedliche Konzentrationen des gebildeten Acetats bei den zwei verschiedenen Zuführungssystemen zu beobachten. Während Acetat bei linearer Zuführung der C-Quelle ständig gebildet wurde, war bei exponentieller Zuführungsstrategie kein Acetat nachweisbar. Daher wurden weitere Experimente mit exponentieller Zuführung der C-Quelle durchgeführt.

Nach Literaturangaben von Riesenberg (Riesenberg, 1991) und Fieschko (Fieschko, 1989) erfolgt die Bildung wachstumsinhibierender Nebenprodukte wie Acetat in komplexen Medien, bei Wachstumsraten oberhalb von $0,2 \text{ h}^{-1}$ (Riesenberg *et al.*, 1991) und in definierten Medien bei Wachstumsraten oberhalb von $0,35 \text{ h}^{-1}$. Mit abnehmender spezifischer Wachstumsrate steigt die Expression des rekombinanten Proteins (Fieschko, 1989). Daher war für die Kultivierung des Expressionsstammes JM105 eine spezifische Wachstumsrate von $0,2 \text{ h}^{-1}$ angebracht.

5.2.2 Bestimmung des Induktionszeitpunkts

Abbildung 28 zeigt den Einfluss des Induktionszeitpunkts auf die Systemproduktivität. Dies wurde mittels zweier Experimente abgeschätzt, die die Zunahme der Volumenaktivität an PheDH und die Plasmidkopienzahl nach Induktion am Anfang bzw. in der Mitte der Fütterungsphase bestimmten. Die Ergebnisse wiesen daraufhin, dass ähnlich zu Versuchen in Schüttelkultur eine signifikante Abhängigkeit der recPheDH-Expression vom Induktionszeitpunkt besteht.

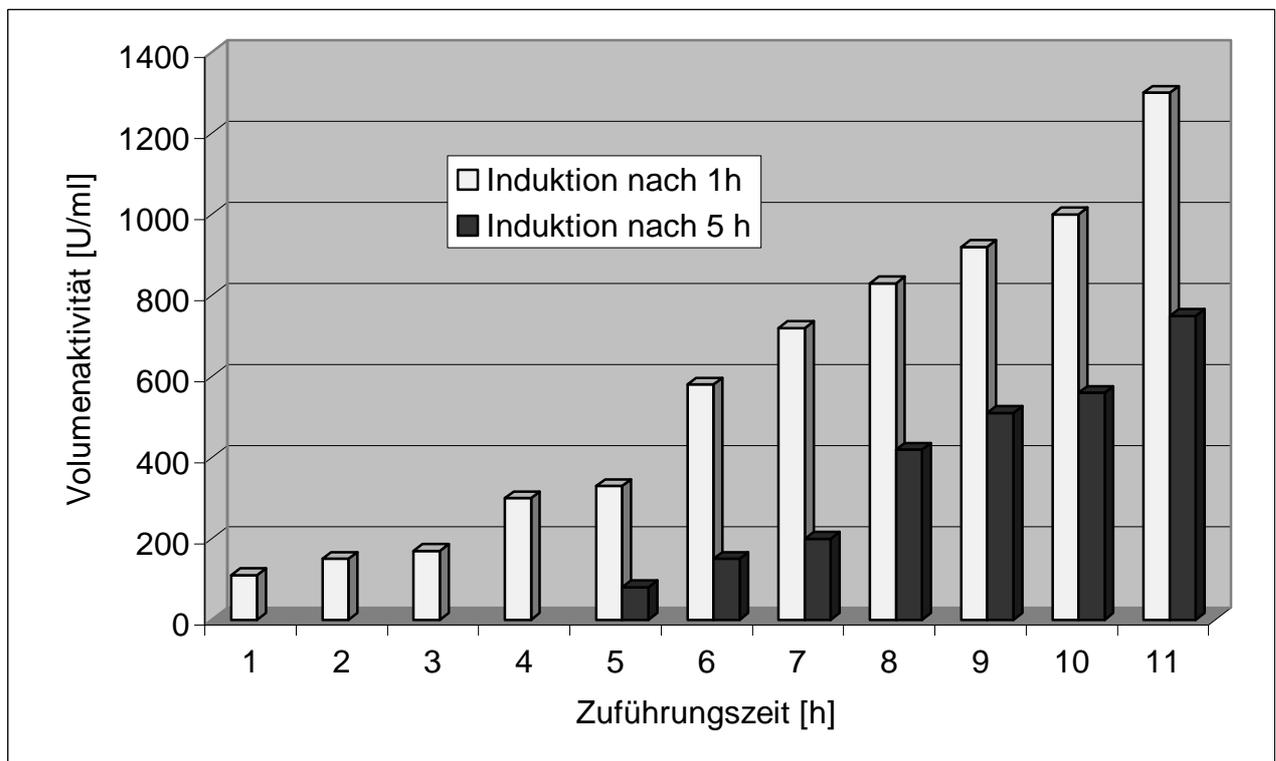


Abbildung 28: Entwicklung der PheDH-Volumenaktivität in Abhängigkeit vom Induktionszeitpunkt während der Zufütterungsphase.

Die Entwicklung der Plasmidkopienzahl, erkennbar an der Zunahme der Plasmidmenge aus Präparationen gleicher Zellkonzentration wurde im Agarosegel überprüft (Abbildung 29).

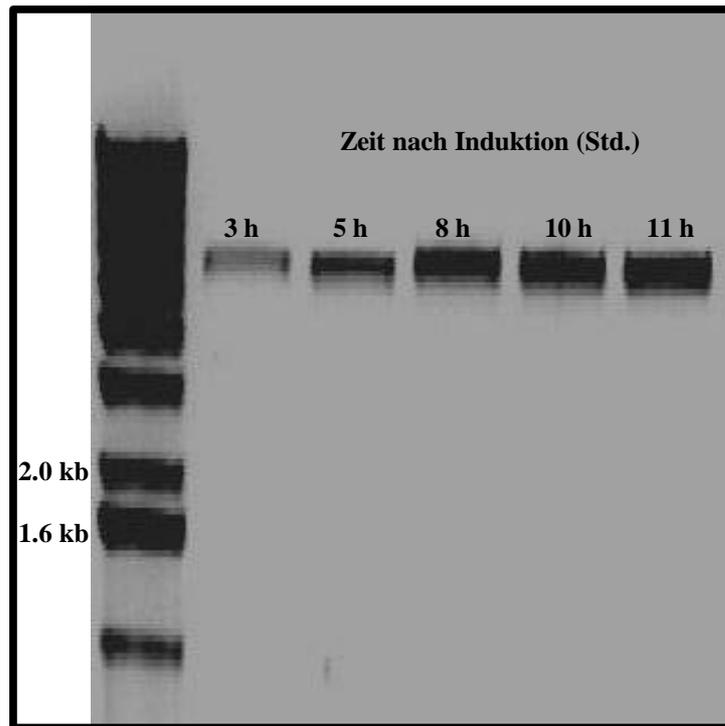


Abbildung 29: 0.8 %iges Agarosegel zum Nachweis der Konzentrationszunahme an rec-pKK-223-3 bei Induktion 1h nach Beginn der Glucose-Zuführung während der Fermentation.

Aus Abbildung 29 ist die Erhöhung der Plasmidkopienzahl zu entnehmen. Eine Abnahme der Menge an Plasmiden war bei einer Induktion in der Mitte der Zufütterungsphase Abbildung 30 zu beobachten.

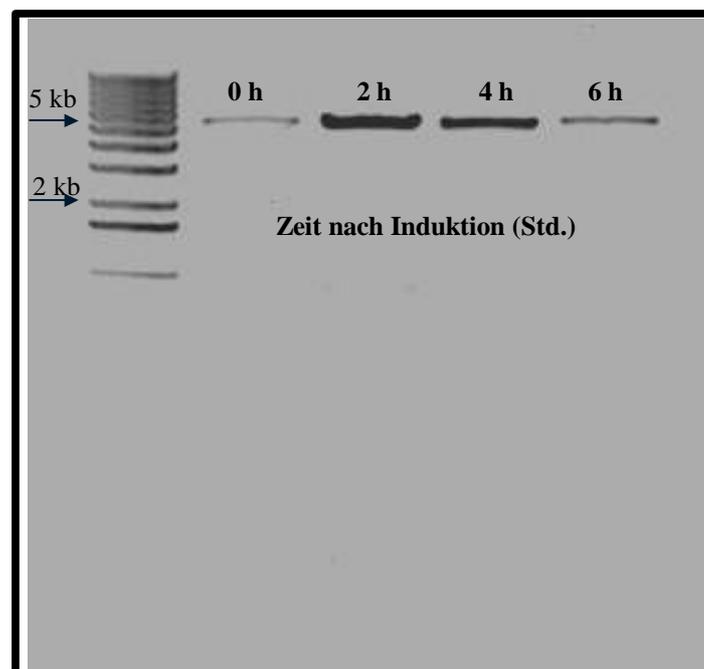


Abbildung 30: Zu- und Abnahme der Plasmidkopienzahl bei Induktion 5 h nach Beginn der Glucosezuführung.

5.3 Klonierung des malic enzymes

5.3.1 Präparation genomischer DNA

Das malic enzyme- Gen wurde mittels PCR mit genomischer DNA als Template amplifiziert. Die genomische DNA aus *E. coli* K12 wurde durch enzymatische Vorbehandlung der Zellwand mit Lysozym und Fällung der Proteine mit CTAB gewonnen. Die Reinheit der DNA wurde durch ein 0.5 % Agarose Gel überprüft. Die präparierte genomische DNA war hochmolekular und intakt.

Das DNA-Pellet wurde in TE-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

5.3.2 Genisolierung und Klonierung des malic enzymes im recPhe-pKK-223-3

Für die Amplifikation des malic enzymes aus der genomischen DNA des *E. coli* K12, wurde der 5'Forward-Primer aus der bekannten N-Terminus-Sequenz abgeleitet (Mahajan *et al.*, 1990; Stols & Donnelly, 1997). Da der C-Terminus des NAD-abhängigen malic enzymes aus *E. coli* K12 (zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeiten) nicht veröffentlicht war, wurde mit Hilfe des 5'Forward Primers ein Einzelstrang amplifiziert, und die genomische DNA, die als Template im PCR-Ansatz vorlag, mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Somit konnte der Einzelstrang erhalten und gewonnen werden, das dann für eine zweite PCR verwendet werden konnte. Da die Taq-Polymerase ca. ein Kb pro Minute amplifiziert, wurde eine Elongationszeit im PCR-Zyklus von 1,7 min gewählt. Somit konnte ein ca. 1,6-1,8 Kb großer Einzelstrang, der der Größe des malic enzymes entspricht, amplifiziert werden. In einer zweiten PCR wurden drei Ansätze vorbereitet, bei denen als Primer sowohl der 5'-Forward-Primer als auch je ein 5'-Reverse-Primer (siehe unten) Verwendung fanden.

1: 5'-Forward: N'-Malic-pst

5' CTGCAGAGCCCAGGGATGGATATTC 3'

2: 5'-Reverse A

TTATTATTATTATTA

3: 5'-Reverse B

CTACTACTACTACTA

4: 5'-Reverse C

TCATCATCATCATCA

Konzentration jeweils 100 pmol/μl

Die Primer für den C-Terminus wurden aus den Stopcodons abgeleitet. Da das Stopcodon des malic enzymes zum Zeitpunkt der Klonierung nicht bekannt war, wurden 3 verschiedene Primer, denen die 3 Stopcodons entsprechen, konstruiert (2-4). Mit einer Kombinationen aus dem bekannten 5'-Forward-Primer (1) und je einem Reverse-Primer (5'-ReverseA-C) wurden 3 PCR-Ansätze durchgeführt (Abbildung 31).

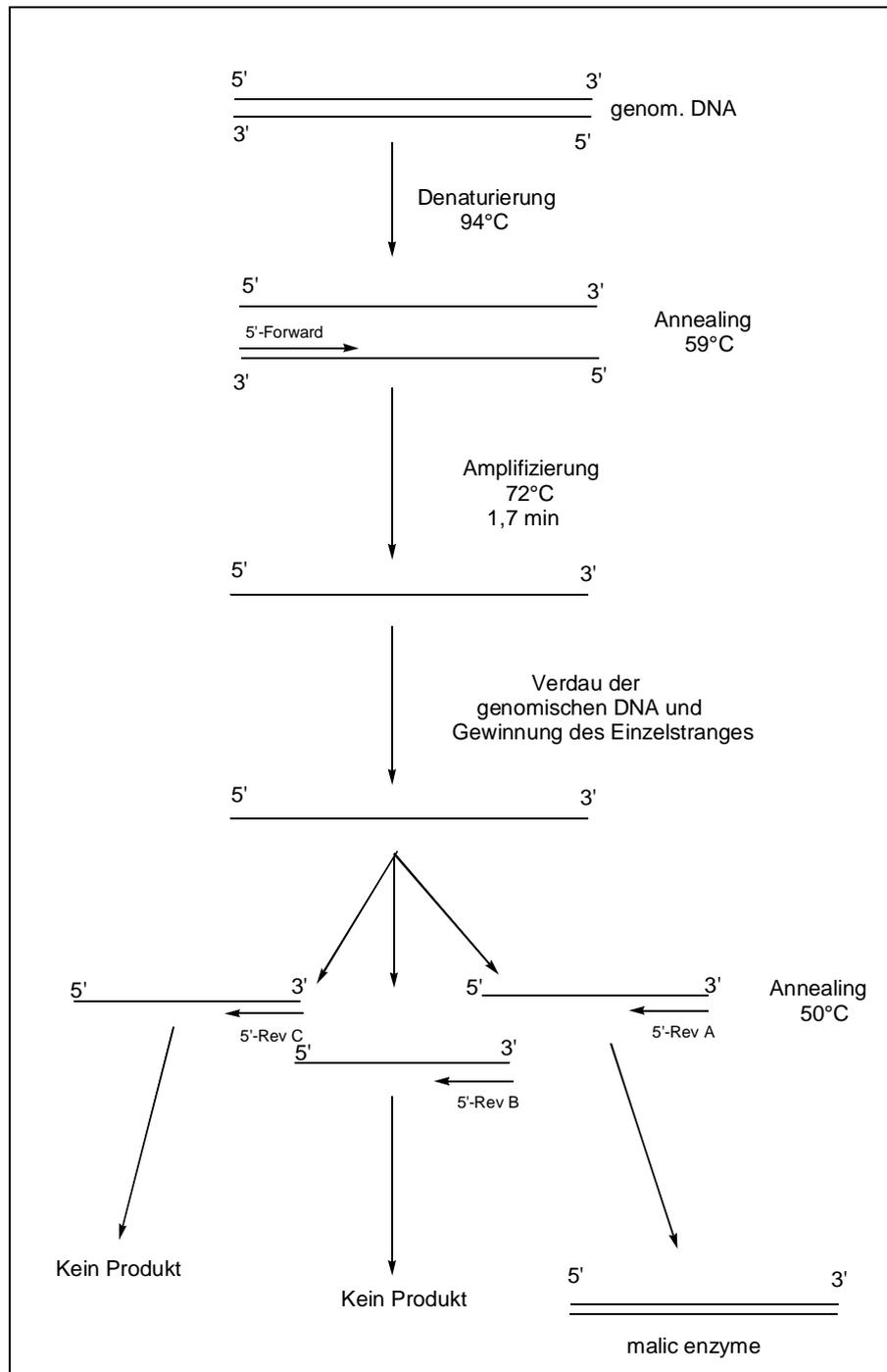


Abbildung 31: Neue PCR-Strategie zur Amplifikation des malic enzymes. Es wurde ein Einzelstrang amplifiziert, der als Template für eine zweite PCR dient.

Da das Triplet für die Stopcodons mehrmals im Gen vorkommt, wurden durch diese Methode bei der Amplifikation des Einzelstranges entsprechend mehrere Fragmente amplifiziert. Aufgrund der bekannten Größe des malic enzyme-Gens konnte ein Fragment aus dem Gel isoliert und für die Ligation eingesetzt werden. Die restlichen Banden sind Teilfragmente vom malic enzyme.

Mit dieser vollkommen neuen Methode konnte ein doppelsträngiges Fragment amplifiziert werden, das dann an der SmaI-Schnittstelle im pUC18 blunt ends ligiert und sequenziert wurde.

1	ATGGATATTC	AAAAAAGAGT	GAGTGACATG	GAACCAAAAA	CAAAAAACA	GCGTTCGCTT
61	TATATCCCTT	ACGCTGGCCC	TGTACTGCTG	GAATTTCCGT	TGTTGAATAA	AGGCAGTGCC
121	TTCAGCATGG	AAGAACGCCG	TAAC TTCAAC	CTGCTGGGGT	TACTGCCGGA	AGTGGTCGAA
181	ACCATCGAAG	AACAAGCGGA	ACGAGCATGG	ATCCAGTATC	AGGGATTCAA	AACCGAAATC
241	GACAAACACA	TCTACCTGCG	TAACATCCAG	GACACTAACG	AAACCCTCTT	CTACCGTCTG
301	GTAACAATC	ATCTTGATGA	GATGATGCCT	GTTATTTATA	CCCCAACCGT	CGGCGCAGCC
361	TGTGAGCGTT	TTTCTGAGAT	CTACCGCCGT	TCACGCGGCG	TGTTTATCTC	TTACCAGAAC
421	CGGCACAATA	TGGACGATAT	TCTGCAAAAC	GTGCCGAACC	ATAATATTAA	AGTGATTGTG
481	GTGACTGACG	GTGAACGCAT	TCTGGGGCTT	GGTGACCAGG	GCATCGGCCG	GATGGGCATT
541	CCGATCGGTA	AACTGTGCGT	CTATAACGCC	TGTGGCGGCA	TCAGCCCGGC	GTATACCCTT
601	CCGGTGGTGC	TGGATGTCGG	AACGAACAAC	CAACAGCTGC	TTAACGATCC	GCTGTATATG
661	GGCTGGCGTA	ATCCGCGTAT	CACTGACGAC	GAATACTATG	AATTCGTTGA	TGAATTTATC
721	CAGGCTGTGA	AACAACGCTG	GCCAGACGTG	CTGTTGCAGT	TTGAAGACTT	TGCTCAAAAA
781	AATGCGATGC	CGTTACTTAA	CCGCTATCGC	AATGAAATTT	GTTCTTTTAA	CGATGACATT
841	CAGGGCACTG	CGGCGGTAAC	AGTCGGCACA	CTGATCGCAG	CAAGCCGCGC	GGCAGGTGGT
901	CAGTTAAGCG	AGAAAAAAT	CGTCTTCCTT	GGCGCAGGTT	CAGCGGGATG	CGGCATTGCC
961	GAAATGATCA	TCTCCAGAC	CCAGCGCGAA	GGATTAAGCG	AGGAAGCGGC	GCGGCAGAAA
1021	GTCTTTATGG	TCGATCGCTT	TGGCTTGCTG	ACTGACAAGA	TGCCGAACCT	GCTGCCTTTC
1081	CAGACCAAAC	TGGTGCAGAA	GCGCGAAAAC	CTCAGTGACT	GGGATACCGA	CAGCGATGTG
1141	CTGTCACTGC	TGGATGTGGT	GCGCAATGTA	AAACCAGATA	TTCTGATTGG	CGTCTCAGGA
1201	CAGACCGGGC	TGTTTACGGA	AGAGATCATC	CGTGAGATGC	ATAAACACTG	TCCGCGTCCG
1261	ATCGTGATGC	CGCTGTCTAA	CCCGACGTCA	CGCGTGGAAG	CCACACCGCA	GGACATTATC
1321	GCC TGGACCG	AAGGTAACGC	GCTGGTCGCC	ACGGGCAGCC	CGTTTAAATCC	AGTGGTATGG
1381	AAAGATAAAA	TCTACCCTAT	CGCCCAGTGT	AACAACGCCT	TTATTTTCCC	GGGCATCGGC
1441	CTGGGTGTTA	TTGCTTCCGG	CGCGTCACGT	ATCACCGATG	AGATGCTGAT	GTCGGCAAGT
1501	GAAACGCTGG	CGCAGTATTC	ACCATTGGTG	CTGAACGGCG	AAGGTATGGT	ACTGCCGGAA
1561	CTGAAAGATA	TTCAGAAAGT	CTCCCGCGCA	ATTGCGTTTG	CGGTTGGCAA	AATGGCGCAG
1621	CAGCAAGGCG	TGGCGGTGAA	AACCTCTGCC	GAAGCCCTGC	AACAGGCCAT	TGACGATAAT
1681	TTCTGGCAAG	CCGAATACCG	CGACTACCGC	CGTACCTCCA	TCTAA	

Abbildung 32: DNA-Sequenz des malic enzymes aus *E. coli* K12.

```

1 MDIQKRVSDM EPKTKKQ RSL YIPYAGPVLL EFPLL NKGSA FSMEERRNFN LLGLLPEVVE
61 TIEEQAERAW IQYQGFKTEI DKHIYLRNIQ DTNETL FYRL VNNHLDEMMP VIYTP TVGAA
121 CERFSEIYRR SRGVFISYQN RHNMD DILQN VPNHNIKVIV VTDGERILGL GDQGIGGMI
181 PIGKLSLYTA CGGISPAYTL PVVLDVGTNN QQLLNDPLYM GWRNPRITDD EYYEFVDEFI
241 QAVKQRWPDV LLQFEDFAQK NAMPLLNR YR NEICSFNDDI QGTAAVTVGT LIAASRAAG
301 QLSEKKIVFL GAGSAGCGIA EMII SQTQRE GLSEEAARQK VFMVDRFGLL TDKMPNLLPF
361 QTKLVQKREN LSDWDTSDV LSLLDVVRNV KPDILIGVSG QTGLFTEEII REMHKHCPRP
421 IVMPLSNPTS RVEATPQDII AWTEGNALVA TGSPFNPVWV KDKIYPIAQC NNAFIFPGIG
481 LGVIASGASR ITDEMLMSAS ETLAQYSPLV LN GEGMVLPE LKDIQKVSRA IAFAVGKMAQ
541 QQGVAVK TSA EALQQAIDDN FWQAEYRDYR RTSI

```

Abbildung 33: Proteinsequenz des malic enzymes aus *E. coli* K12 abgeleitet von der DNA-Sequenz.

Die Proteinsequenz des malic enzymes aus *E. coli* wurde mit verschiedenen Sequenzen aus der Datenbank „National Center for Biotechnology Information“ verglichen (Abbildung 34) und hohe Homologie festgestellt. Dabei konnten unterschiedliche Sequenzbereiche der einzelnen Proteine in der Datenbank der „National Center for Biotechnology Information“ als charakteristisch für malic enzyme identifiziert werden. Eine starke Homologie findet man in der Coenzym-Bindungsstelle des malic enzymes verschiedener Ursprünge.

	10	20	30	40	50	60
NADP_Salmonella	-----	MDEQLKQ	SALDFHE	FVPVPGKI	QVSPTKPLAT	QRDLALAYSPGVAAPCLEIE
NADP_Ecoli	-----					
Mdh_Pasteurella	-----	MDAQLRQAAL	DFHEFP	TPGKIEV	TPTKSLAT	QRDLALAYSPGVAAPCLEIQ
NAD_Brucella		MTKKPSSP	STRSDFE	AALFFHRY	PKPGKLEI	QATKPLGNQRDLALAYSPGVAAPCLAIH
NAD_Ecoli	-----	MDIQKRVSD	MEPKTKK	----	QRSLYIPYAG	PVLLLEFPLL
	70	80	90	100	110	120
NADP_Salmonella		KDPLAAYKY	TARGNLVAVI	SNGTAVL	LGLGNIGALAG	KPVMEGKGVLFKKFAGIDVFDIEV
NADP_Ecoli		-----				
Mdh_Pasteurella		ADPAASYRY	TSRGNLVA	VI SNGTAVL	LGLGNIGALAG	KPVMEGKGVLFKKFAGVNVFDIEI
NAD_Brucella		DDPATAAEY	TARGNLVA	VV SNGTAVL	LGLGNIGALAS	KPVMEGKAVLFKKFADIDVFDIEI
NAD_Ecoli		KGSAFSME	ERRNFNLL	GLLP----	EVVETIEEQA	ERAWIQYQG--FKTEIDKHIYLRNI
	130	140	150	160	170	180
NADP_Salmonella		DELDPDKF	INVVAAL	EPTFGGIN	LEDIKAPECF	YIEQKLRERMNIPVFHDDQHGTAIIST
NADP_Ecoli		-----				
Mdh_Pasteurella		DERDPDKL	VDIIASLE	PFTFGGIN	LEDIKAPECF	YIEQKLRERMKIPVFHDDQHGTAIISA
NAD_Brucella		DAHEINR	IVDVVSA	LEPTFGGIN	LEDIKAPECF	EVVEEQLRERMNIPVFHDDQHGTAIIVA
NAD_Ecoli		QDTNETL	FYRLVNN	HLDEMMP	VIYTP TVGAA	CERFSEIYRRSRGVFISYQNRHNMDLILQ
						::* . *

```

                190      200      210      220      230      240
NADP_Salmonella  AAILNGLRVVEKNISDVRMVVSGAGAAAIACMNL LVALGMQKHNIIVVCD SKGVIYKGR EP
NADP_Ecoli      AAILNGLRVVEKNISDVRMVVSGAGAAAIACMNL LVALGLQKHNIIVVCD SKGVIYQGR EP
Mdh_Pasteurella AAILNGLRIVKKDIAKVKLIASGAGAASIACLNLLVSLGLPRENIIVCD SKGVI F HGRDE
NAD_Brucella    SAVLNGLELAGKKIEEAKIVTSGAGAAALACLNLLVNLGAKRENIWVCDIEGVVYDGRNT
NAD_Ecoli       NVPNHNIKVIIVVTDGERILGLGDQGIGGMGIPIGKLSLYTACGGISPAYTLPVVL DVG--
                . . . . . . . . . . * . . . . . : * . * . * : .

                250      260      270      280      290      300
NADP_Salmonella  NMAETKAAYAVDDSGKR TLDEVIDGADIFLGCSPKVL TQEMVKKMARAPMILALANPEP
NADP_Ecoli      NMAETKAAYAVDDGKR TLDDVIEGADIFLGCSPKVL TQEMVKKMARAPMILALANPEP
Mdh_Pasteurella RMDETKKLYAIEDNGKR TLAEVINDADIFLGC SAAGTLTQDMVKTMAANPLILALANPDP
NAD_Brucella    LMDRWKEVYAQKTD-ARTLADVIIGADVFLGLSAGV LKPELLKQMAEKPLIMALANPKP
NAD_Ecoli       -----TNNQQLLNDPLYMGWRNPRITDDEYYEFVD--EFIQAVKQRWP
                * : : . : : * . . : : : : * * : : *

                310      320      330      340      350      360
NADP_Salmonella  EILPPLAKEVRPDAI ICTGRSDYPNQVNNVLCFPFI FRGALDVGATAINEEMKLA AVRAI
NADP_Ecoli      EILPPLAKEVRPDAI ICTGRSDYPNQVNNVLCFPFI FRGALDVGATAINEEMKLA AVRAI
Mdh_Pasteurella EILPPLAKAVRPDAIVCTGRSDYPNQVNNVLCFPFI FRGALDVSATAINEEMKLA AVHAI
NAD_Brucella    EIMPEEARAARADAMICTGRSDFPNQVNNVLCFPYI FRGALDVGATVINEEMKLA AVRAI
NAD_Ecoli       DVLLQFEDFAQKNAMPLLN R-----YRNEICS---FNDDIQGTAAVTVGTLIAASRAAG
                : : : . : : * . * : * : : * : : : * : : *

                370      380      390      400      410      420
NADP_Salmonella  AELAHAEQSEVVASAYGDQDL SFGPEYIIPKPFDPRLIVK IAPAVAKAAMD SGVATRP IA
NADP_Ecoli      AELAHAEQSEVVASAYGDQDL SFGPEYIIPKPFDPRLIVK IAPAVAKAAMESGVATRP IA
Mdh_Pasteurella ADLALAEQSEVVT SAYGETEL SFGPEYLIPKPFDPRLIVK IAPAVAKAAMD SGVATRP IK
NAD_Brucella    ASLAREEPSDVAARAYS GDTPTFGPDYIIPSPFDQRLILR IAPAVAKAAMETGVATRP IE
NAD_Ecoli       GQLSEKKIVFLGAGSAG-----CGIAEMIISQTQREGLSEEAAR
                ..* : : : : . . . . . ** : . : * : : .

                430      440      450      460      470      480
NADP_Salmonella  DFDAYIDKLT E FVYKTNLFMKPIFSQARKD--PKRVVLP EGE EARVLHATQELITLGLAK
NADP_Ecoli      DFDVYIDKLT E FVYKTNLFMKPIFSQARKA--PKRVVLP EGE EARVLHATQELVTLGLAK
Mdh_Pasteurella DFDAYIEKLTQ FVYKTNLFMKPVFAQAKQN--KKRVLLT DGE ESRVLHAVQE IATLGIAT
NAD_Brucella    DMEAYLDRLNR FVFRSGLIMKPVFAAARTQGAPMRVIYADGEDERVLRAAQVVI EERIAA
NAD_Ecoli       QKVFVMDRFGLLT DKMPNLLP--FQTKLVQ---KRENLS DWD TDSVLSLLDVVRN-VKP
                : : : : : : : : * . * . . : : : : : : :

                490      500      510      520      530      540
NADP_Salmonella  P I L I G R P S V I E M R I Q K L G L Q I K A G V D F E I V N N E S D P R F K E Y W S E Y Y Q I M K R R G V T Q E Q A Q
NADP_Ecoli      P I L I G R P N V I E M R I Q K L G L Q I K A G V D F E I V N N E S D P R F K E Y W T E Y F Q I M K R R G V T Q E Q A Q
Mdh_Pasteurella P I L L G R P S V I A Q K I K Q L G L H I Q E G R D F E L V D I E N N P Y F E E C Y K Y H N L L K R K G I T P A G A Q
NAD_Brucella    P I L V G R P Q V V E T R L R R Y G L K I R P G T D F E L I N P E D D P R Y R D Y V D L Y L S Y T G R Q G V T P E A A R
NAD_Ecoli       D I L I G V S G Q T G L F T E E I I R E M H K H C P R P I V M P L S N P -----T-----
                *** . . . : : : : : : : : *

                550      560      570      580      590      600
NADP_Salmonella  R A M I G N H T A I G A I M V Q R G E A D A M I C G T I G D Y H E H F S V V K A V F G Y R D G V H T A G A M N A L L L P
NADP_Ecoli      R A L I S N P T V I G A I M V Q R G E A D A M I C G T V G D Y H E H F S V V K N V F G Y R D G V H T A G A M N A L L L P
Mdh_Pasteurella R K M L H N P T V I G A T L L Q L G K A D A M L C G L V G P Y A S H L S N I K E V I G V Q P C V P T P A T V N G L V L P
NAD_Brucella    T I V R T N S T A I A A L A V M R D E A D A M I C G L E G R F E R H L R V V R Q L I G K V P G I R D Y S A L S L L I S Q
NAD_Ecoli       ----SRVEATPQDI IAWTEGNALVATGSPFPNPVVKDKIYPIAQCNNAFIFPGI GLGVIA
                . . . : : : * : : . . . : : :

```

	610	620	630	640	650	660
NADP_Salmonella	SGNTFIADTYV	NEDPTPEQLAEI	AVMAAETVRR	FGIEPKVALL	SHSNFGSSNSL	SASKMR
NADP_Ecoli	SGNTFIADTYV	NDEPDAEELAEI	ITLMAAETVRR	FGIEPRVALL	SHSNFGSSDCP	SSSKMR
Mdh_Pasteurella	TGNLFIADTYV	NHNPTAQELAEI	ITMAANEVSR	FGIEPKVALV	SHSNFGTFFDDP	SAVKMR
NAD_Brucella	RGALFLITD	TYVNAEPDANEI	EMAVLAAREI	SRFGIEPKAALV	SHSNFGSKESAS	SAEKMR
NAD_Ecoli	SGASRITD	-----	EMLMSASETLA	QY---S-PLV	LNGEGMVLPEL	KDIQKVS
	* : : *	* : : * : : *	: : : : : :	. : : . . . :	: . . *	
	670	680	690	700	710	720
NADP_Salmonella	ETLERVREERAP	DLMIDGEMHGDA	ALVESIRNDR	MPDSPLKGAAN	ILVMPNMEAA	RISYNL
NADP_Ecoli	QALELVREERAP	ELMIDGEMHGDA	ALVEAIRNDR	MPDSSLKGSAN	ILVMPNMEAA	RISYNL
Mdh_Pasteurella	EVLHLVKEKAP	DLIIDGEMHCDV	ALNEKLRQD	IMPDSPLKGAAN	LLVMPNMEAA	RISLNL
NAD_Brucella	QAAAILAEKAP	DLES D GEMHGDA	ALSQTLRDR	VFPNSRLKGEAN	LLVFPNLDAA	NITLNV
NAD_Ecoli	RAIAFAVGKMA	QQQGVAVKTS	AEALQQAIDD	NFWQAEYRD	YRRTSI	-----
	. . : : .	. * : : : * :	. . . :		
	730	740	750	760	770	
NADP_Salmonella	LRVSSSEGVTV	GPVLMGVSKPV	HVLTPIASVRR	IVNMVALAV	VEAQTTP	-----
NADP_Ecoli	LRVSSSEGVTV	GPVLMGVAKPV	HVLTPIASVRR	IVNMVALAV	VEAQTQPL	-----
Mdh_Pasteurella	LQGTATP-I	TVGPIILGMN	KPVHILTSAS	SVRRIINMVA	IAAANVEPT	C-----
NAD_Brucella	VKAVTDA-L	HVGPILLGAT	RPAHILTPSV	TSRGVVNMTA	LAVVEALQKN	ASNRRQN
NAD_Ecoli	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 34: Alignment der Aminosäuresequenz verschiedener malic enzymes. NADP- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* (Parkhill et al., 2001), Mdh *Pasteurella multocida* (May et al., 2001), NAD-*Brucella melitensis* (DeVecchio et al., 2002), NADP-*E.coli* (Blattner et al., 1997).

5.4 Konstruktion eines Expressionsvektors mit heterologer Expression

Aus der Sequenz des amplifizierten Fragmentes (Abbildung 32) wurden Primer mit integrierten Restriktionsschnittstellen und ein Codon für die ribosomale Bindungsstelle konstruiert. Nach der Amplifikation des malic enzymes aus dem rekombinanten pUC18 wurde das PCR-Fragment in den rekombinanten recPhe-pKK-223-3-Expressionsvektor hinter der PheDH-Sequenz an der PstI und HindIII-Restriktionsschnittstellen kloniert (Abbildung 35 und Abbildung 37).

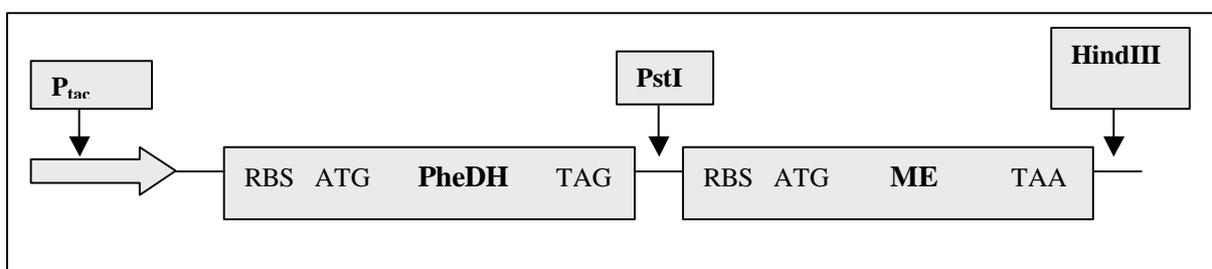


Abbildung 35: Konstruktion des Plasmids für eine heterologe Expression zur L-Phe Synthese mittels Ganzzellumsetzung.

5'-Forward: N'-Malic-pst

5' CTGCAGAGCCCAGGGATGGATATTCAAAAA 3'

Konzentration 100 pmol/ μ l

5'-Reverse: C'-Malic-Hin

5' AAGCTTTTAGATGGAGGTACGGCGGTAGTC 3'

Konzentration 100 pmol/ μ l

In Tabelle 9 sind die Konzentrationen aufgeführt, die für die Isolierung des malic enzyme-Gens erforderlich sind.

Tabelle 9: PCR Protokoll zur Amplifizierung des malic enzymes aus dem rekombinanten pUC18-Plasmid. Variiert wurden die Konzentrationen der Template-DNA.

Template DNA recpUC18	N'-Malic-pst Prim 1	C'-Malic-Hin Prim 2	dNTP	Puffer	Taq-Polymerase	H ₂ O
50ng/ μ l	1 μ l	1 μ l	2 μ l	10 μ l	1 μ l	83 μ l
25ng/ μ l	1 μ l	1 μ l	2 μ l	10 μ l	1 μ l	83 μ l
10ng/ μ l	1 μ l	1 μ l	2 μ l	10 μ l	1 μ l	83 μ l

Ein Zyklus besteht aus:

Denaturierungsschritt : 94°C

Annealingschritt: 59°C

Amplifizierungsschritt: 72°C

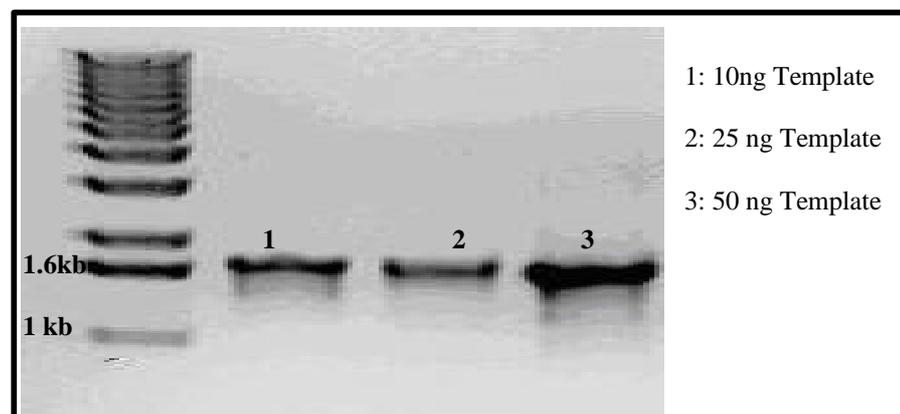


Abbildung 36: PCR-Ausbeute des malic enzyme-Gens bei verschiedenen Konzentrationen an Template-DNA (rec-pUC18).

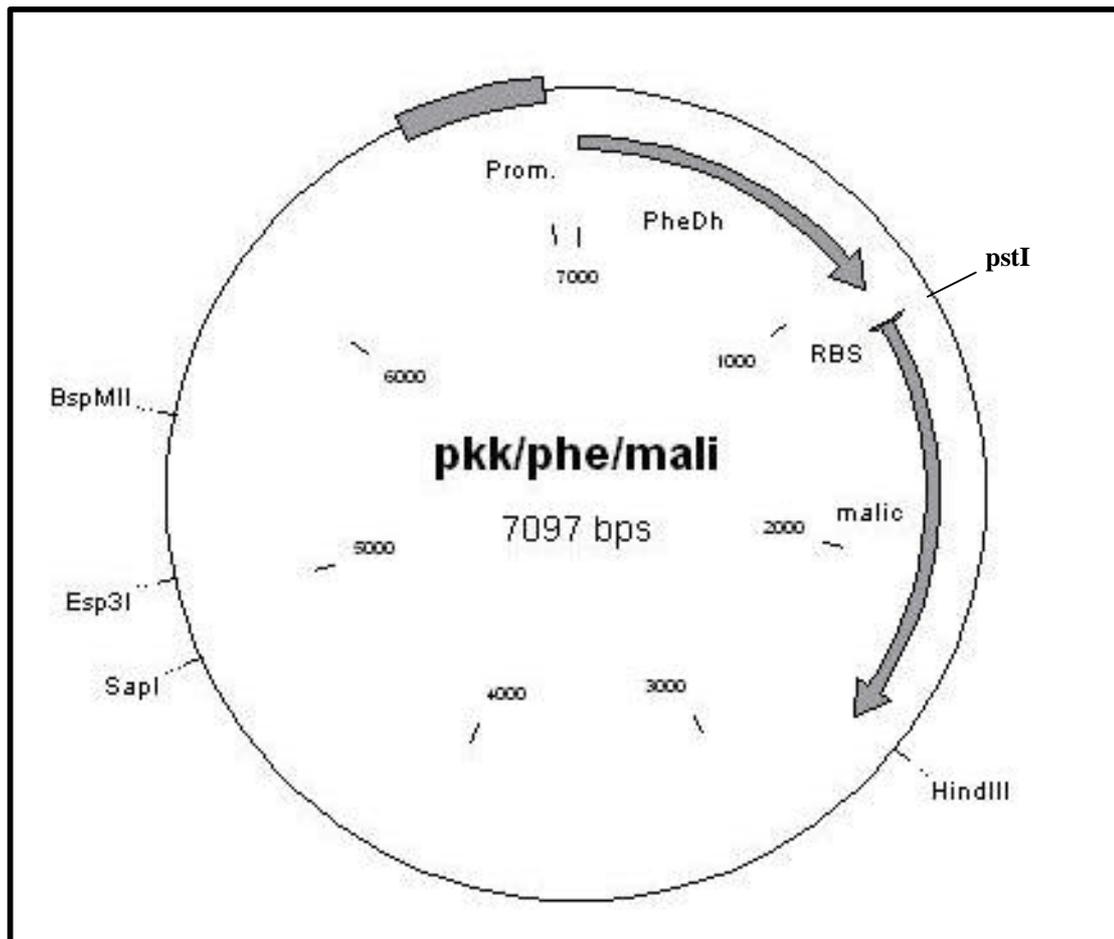


Abbildung 37: Vektorkarte des rec-pKK-223-3 PheDH-malic. malic enzyme wurde 3' zur PheDH an der PstI- und HindIII-Schnittstelle mit eigener Ribosomenbindungsstelle kloniert.

Das neue Konstrukt des rekombinanten Plasmids wurde in kompetente *E. coli*-Zellen JM 105 bzw. HB 101 transformiert.

Mit der Klonierung des malic enzyme 3' zur PheDH an der PstI- und HindIII-Schnittstelle mit eigener ribosomalen Bindungsstelle konnte eine Expression beider Enzyme gleichzeitig erfolgen.

5.4.1 Coexpression der PheDH und des malic enzymes

Von den positiven Klonen wurden einige zur Expression ausgewählt. Eine Einzelkolonie der jeweiligen Klone wurde in 5 ml LB_{amp} -Medium überimpft, und nach Erreichen von OD₅₈₀ = 0,6 mit 1 mM IPTG induziert. Die Induktion erfolgte über Nacht und die geernteten Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen.

Der rekombinante Stamm HB101 zeigt eine malic enzyme- Aktivität von 100 U/ml und ebenso eine PheDH –Aktivität von 130 U/ml. Die Aktivität beider Enzyme im rekombinanten Stamm JM 105 ist eindeutig höher und liegt bei ~ 600 U/ml für malic enzyme und ~1200 U/ml für die PheDH.

Die beiden rekombinanten Stämme wurden im 10 L Fermenter kultiviert und die Aktivität beider Enzyme bestimmt.

Tabelle 10: Aktivitätsbestimmung der exprimierten Enzyme in einem 10 L Fermenter mit LB-Medium als batch-Fermentation.

	Aktivität PheDH		Aktivität malic enzyme	
	(U/ml)	(U/mg)	(U/ml)	(U/mg)
<i>E. coli</i> HB101	400	33	220	22
<i>E. coli</i> JM105	1300	118	640	71

Aus den Daten der Expression (Tabelle 10) ist zu entnehmen, dass der *E. coli* Stamm JM 105 deutlich bessere Aktivität für beide Enzyme zeigt, daher wurden alle weiteren Versuche mit diesem Stamm durchgeführt.

Die Qualität der Expression hängt unter anderem vom Alter der kompetenten Zellen ab, die dafür eingesetzt werden. Ebenso spielt die Behandlung in der Herstellung von kompetenten Zellen eine große Rolle bei der Expression. Beide kompetente Stämme, sowohl JM 105 als auch HB 101, wurden gleichzeitig hergestellt. Daher sind Fehler, die auf o.g. Faktoren zurückzuführen sind, ausgeschlossen.

5.4.2 Optimierung der Aktivität

Um die maximale Aktivität der erhaltenen Rohextrakte ausschöpfen zu können, wurden mehrere Parameter untersucht und variiert.

Beide heterolog exprimierten Enzyme zeigen bei unterschiedlichen Bedingungen beste Stabilitätseigenschaften. Von Interesse war es, die optimalen Eigenschaften für beide Enzyme im gleichen System zu ermitteln. Die nachfolgenden Versuche wurden mit Blick auf diese Tatsache durchgeführt.

Optimierung des Aufschlusspuffer

1 g Zellen JM₁₀₅ wurde in 0,1 M Tris- bzw. 0,1 M Kpi-Puffer mit/ohne BSA (1,5 g/l) 30 %ig aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte mit Ultraschall bei 70 cont. Cycles. Zusätzlich zu den Puffern wurden 1,5 g/l BSA zur Stabilisierung der Enzyme zugegeben.

Tabelle 11: Aktivitätsvergleich in Abhängigkeit des Aufschlusspuffers

	0,1M Tris		0,1M Kpi	
	- BSA	+ BSA	- BSA	+ BSA
PheDH	520 U/ml	610 U/ml	730 U/ml	1100 U/ml
malic enzyme	430 U/ml	720 U/ml	320 U/ml	610 U/ml

Der Zusatz an BSA führte in beiden Fällen zu einer Steigerung der Aktivität. Ebenso beeinflusste der Aufschluß-Puffer die Aktivitäten. Hierbei war zu beobachten, dass der geeignete Aufschluß-Puffer für die einzelnen Enzyme verschieden war. Der Kpi-Puffer war für die PheDH besser geeignet als für das malic enzyme, da aber die Aktivitätsabnahme des malic enzymes im Kpi-Puffer relativ gering war, wurden die rekombinanten Zellen nach der heterologen Expression weiterhin in diesem Puffer aufgeschlossen.

Aufschlussdauer zur Untersuchung der Stabilität

Ebenso wurde die Aufschlussdauer überprüft und der kritische Punkt zur Stabilität der Enzyme während dieses Vorganges bestimmt. Aus den Daten in Abbildung 38 ist die optimale Aufschlussdauer zu entnehmen.

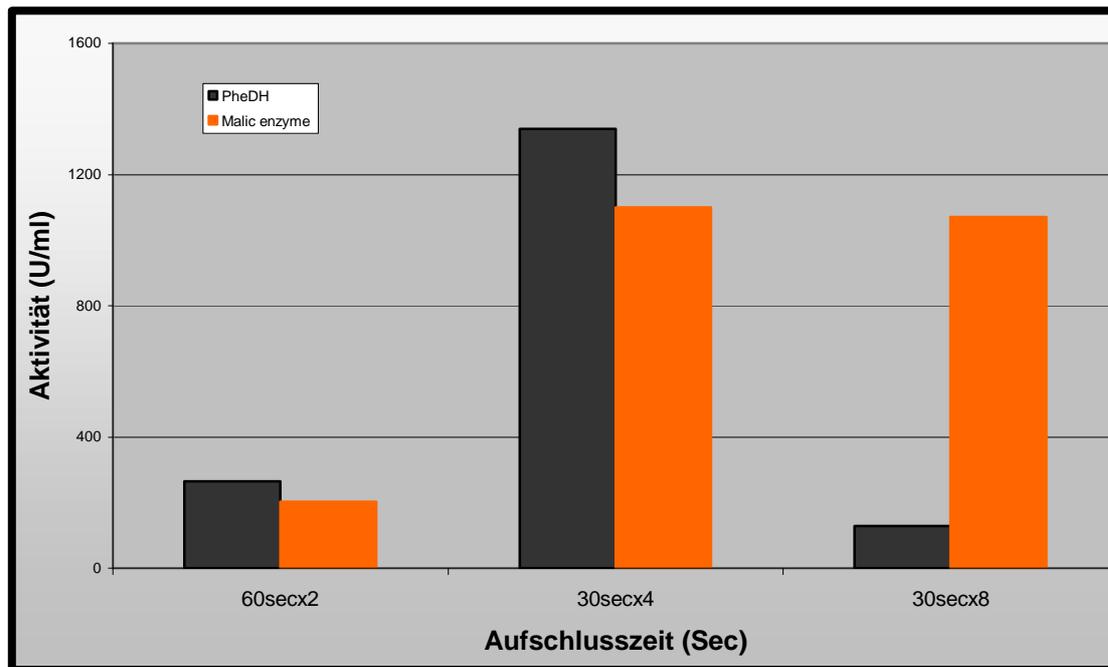


Abbildung 38: Stabilitätsbestimmung der PheDH bzw. des malic enzymes nach verschiedenen Aufschlusszeiten mittels Ultraschalls. Die Zellen wurden nach einer 60-, 30-sekundigen Behandlung zwischenzeitlich 30 Sekunden abgekühlt.

Für diesen Versuch wurde folgende Suspension verwendet:

- 1 g rekombinante Zellen (JM105)
- 3 ml Kpi-Puffer 0,1 M

Bei längerer Behandlung der Zellen mit Ultraschall nimmt die Aktivität der PheDH drastisch ab, wogegen die Aktivität des malic enzymes erhalten bleibt. Die idealen Aufschlussbedingungen für einen 25 %igen Aufschluß von 1 g rekombinantem *E. coli* JM105 sind daher 4 x 30 s Ultraschallbehandlung mit zwischenzeitlich 3 x 30s Abkühlung im Eisbad.

Bei längeren Behandlungen mit Ultraschall wird die Probe erhitzt, was zu einer Denaturierung der Enzyme führen kann. Die Proteinmenge wurde bei diesem Versuch bestimmt und ist aus Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Proteinbestimmung beider exprimierten Enzymen, PheDH und malic enzyme, nach Variation der Aufschlusszeit. Die Zellen wurden nach einer 60-, 30-sekundigen Behandlung zwischenzeitlich 30 Sekunden abgekühlt.

	60sec x 2	30sec x 4	30sec x 8
	Spez. Aktivität: U/mg	Spez. Aktivität: U/mg	Spez. Aktivität: U/mg
PheDH	30	105	16
malic enzyme	20	90	110

Bei einer Reinigung des malic enzymes bis zur Homogenität konnte eine spezifische Aktivität von 466 U/mg erreicht werden. Die Reinigungsschritte sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Aufreinigung des rekombinanten malic enzymes

	Volumen(ml)	Aktivität(U)	Protein(mg)	Spez.Aktivität(u/mg)	Ausbeute(%)	Faktor
Ultrazentrifugation	0.6	820	13	63	100	1
Hydroxyapatit	9	470	5	94	57	1.49
Q-Sepharose	7	496	2.1	236	60	3.74
Phenylsepharose	1.9	280	0.6	466	34	7.39

5.4.3 Km-Wertbestimmung

Für das Substrat und das Coenzym des malic enzymes wurden die K_M -Werte bestimmt. Die K_M -Werte wurden an homogenen oder partiell gereinigten rec-malic enzyme Proben bestimmt.

L-Malat: 0,29 mM

NAD⁺ 0,14 mM

5.4.4 Gekoppelte L-Phenylalanin Synthese unter Regeneration des Coenzym

NADH

Wichtige Faktoren für eine gekoppelte Reaktion sind das pH-Optimum sowie die Temperaturstabilität der beiden Enzymen. Zusätzlich zu der Stabilität der Enzyme spielen weitere Faktoren wie z.B. der Einfluss der verschiedenen Substrate auf die Enzyme eine Rolle.

In Bezug auf das pH-Optimum wurde eine Kinetik durchgeführt und die pH-Abhängigkeit der Synthese bestimmt. In Abbildung 39 ist die Zunahme der Aktivität bei steigendem pH-Wert zu entnehmen, wobei für die Synthese aus Gründen der Coenzymstabilität ein pH-Wert von 8.0 ausgewählt wurde, in dem beide Enzyme zwar nicht die höchste Aktivität zeigen, aber bei dem das Coenzym stabil bleibt.

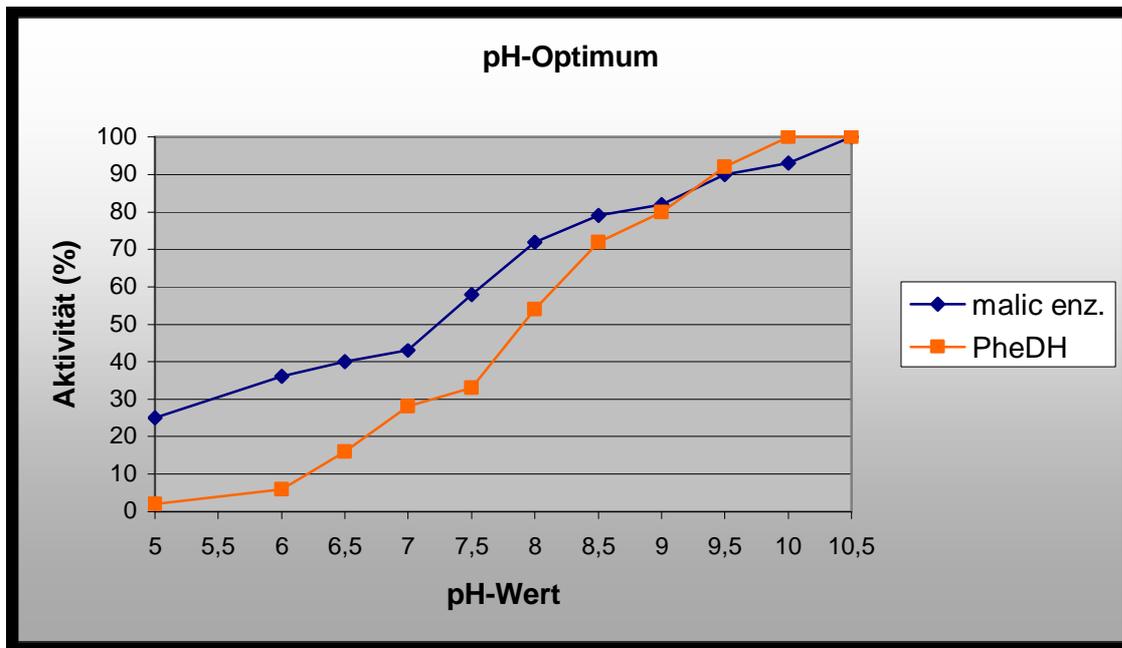


Abbildung 39: pH-Optimum von malic enzyme und der PheDH. Die Aktivität beider Enzyme nimmt bei Zunahme des pH-Wertes zu. Die Messungen wurden mit partiell gereinigtem Enzym durchgeführt. Für die Phenylalanin Dehydrogenase wurde die reduktive Aminierung gemessen.

Ein zweiter Faktor für die gekoppelte Enzymreaktion ist die geeignete Temperatur (Abbildung 40), bei der beide Enzyme für längere Zeit stabil erhalten bleiben. Daher wurde ein weiterer Versuch zur Bestimmung des Temperaturoptimums durchgeführt.

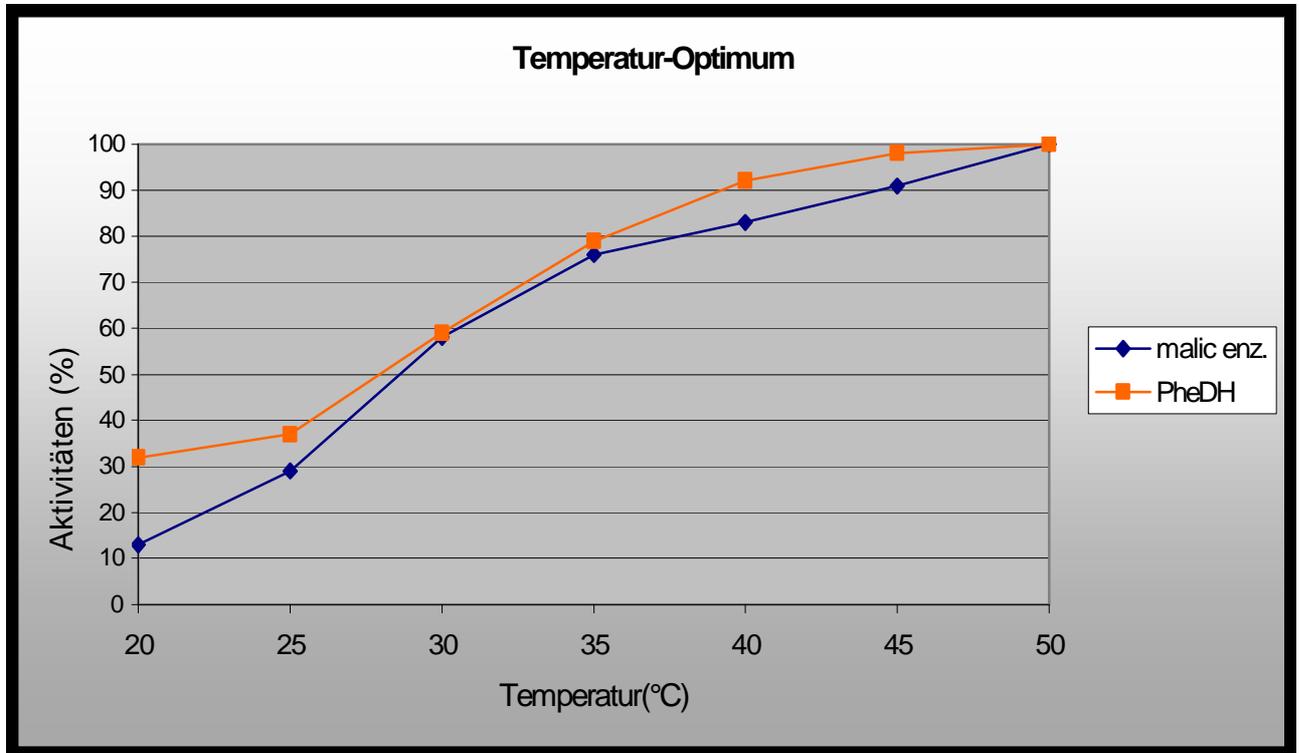


Abbildung 40: Temperaturoptimum. Die Messungen wurden bei pH 8,5 und in 0,1M HEPES-Puffer durchgeführt.

Wie aus Abbildung 40 zu entnehmen ist, liegt das Temperaturoptimum beider Enzyme bei 50°C. Bei 30°C beträgt die gemessene Aktivität nur 60 % davon.

Das malic enzyme ist für längere Zeit bei 45°C stabil. Da die PheDH aber bei diesem Temperaturwert instabil wird (Abbildung 23), wurden die Synthesen bei 30°C durchgeführt, damit die Stabilität beider Enzyme sowie des Coenzym über längere Zeit gewährleistet werden konnte.

Enzyme erreichen ihre optimale Aktivität im jeweils geeigneten Puffer. Beide Enzyme wurden mit zwei verschiedenen Puffern in je einem Reaktionsansatz getestet (Tabelle 14).

Tabelle 14: Vergleich der PheDH- bzw. der malic enzyme-Aktivität in verschiedenen Reaktionspuffern. Die Aktivitäten sind in Prozent vom Optimalen zu sehen.

	0,1M HEPES-Puffer (pH 8.0)	0,1M Tris-Puffer (pH 8.0)
PheDH	84 %	100 %
malic enz.	100 %	42 %

Da die Aktivität der PheDH in HEPES-Puffer nicht erheblich abnimmt, wurde die gekoppelte Enzymreaktion in diesem Puffer durchgeführt.

Mit der Bestimmung der Puffer-, pH- und Temperatur-Werte konnten geeignete Bedingungen und Medien für die Synthese von Phenylalanin durch eine gekoppelte Enzymreaktion mit Regeneration des Coenzym ausgewählt werden.

Eingesetzt wurden 30 mM Phenylpyruvat, 100 mM Ammoniumsulfat, 100 mM HEPES-Puffer, 70 mM L-Malat, 2 mM NAD⁺, 2 mM Mg²⁺, 25U PheDH (partiell gereinigt) und 30U malic enzyme. Die Proben werden mittels HPLC analysiert (Abbildung 41).

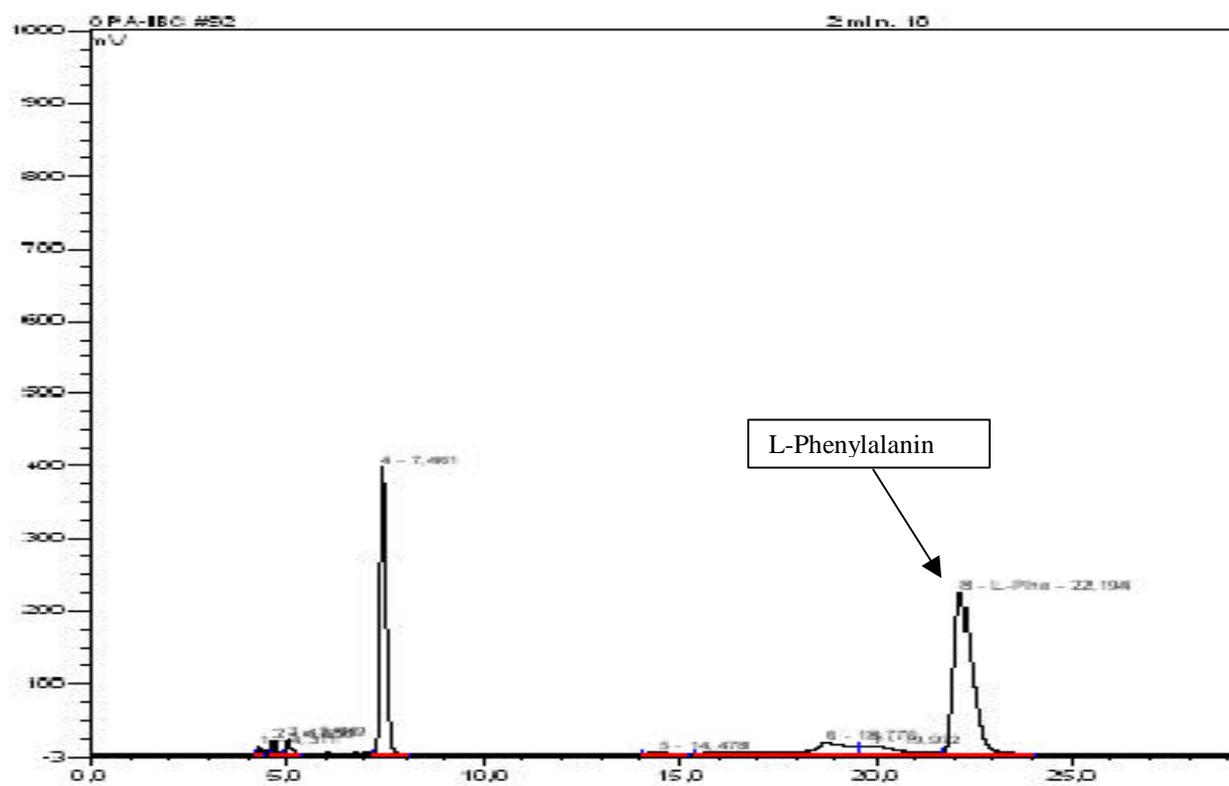


Abbildung 41: HPLC-Analytik zur Nachweis von in situ Regenerationsystems gebildeten L-Phenylalanin.

Die Synthese wurde über mehrere Stunden verfolgt (Abbildung 42). Nach 4 h waren ca. 50 % des eingesetzten Substrates Phenylpyruvat zu L-Phenylalanin umgesetzt.

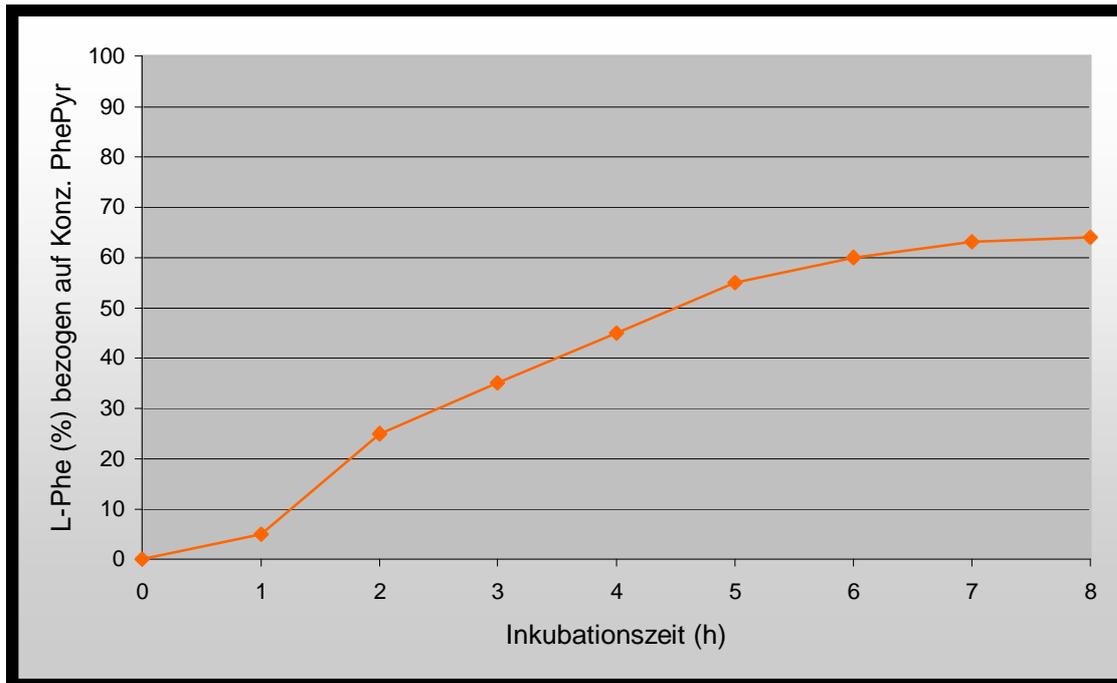


Abbildung 42: Bildungskinetik für L-Phe. Die Bildung von L-Phe wurde *in situ* durchgeführt.

5.5 Ganzzellumsetzung

Ein wesentlicher Vorteil der Ganzzellumsetzung liegt darin, dass auf die Präparation, möglicherweise Reinigung der Enzyme sowie den Zusatz an freiem Coenzym verzichtet werden kann. Als neue Parameter, die bei ganzen Zellen berücksichtigt werden müssen, kommen jetzt allerdings Transportprozesse durch die Zellmembran hinzu. Ein weiterer zu beachtender Faktor im Vergleich zur Verwendung isolierter Enzyme betrifft die Metabolisierung von Substraten.

Als Standard- Ansatz für die Ganzzellumsetzung wurde folgendes Medium verwendet:

0.1 M	HEPES-Puffer (pH 8.0)
40 mM	Phenylpyruvat
0.1 M	L-Malat
0.1 M	Ammoniumsulfat
2 mM	MgCl ₂

Die Umsetzung erfolgte bei 30°C und mit 1g rekombinanten *E.coli*-Zellen. Das gebildete Phenylalanin wurde mittels HPLC nachgewiesen (Abbildung 43).

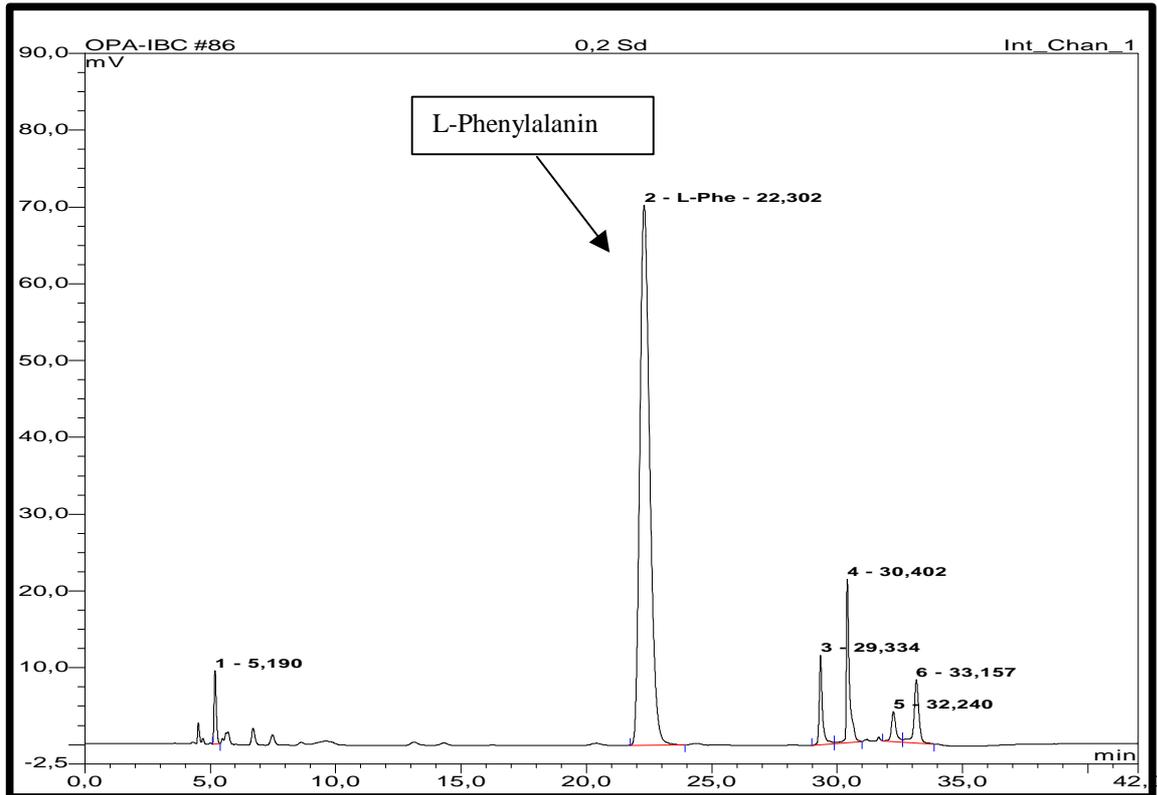


Abbildung 43: Produktnachweis nach einer 5 stündigen Umsetzung mit ganzen rekombinanten *E. coli* Zellen.

Die Bildung von L-Phe durch rekombinante *E.coli* -Zellen wurde über 20 h verfolgt und die Ausbeute bestimmt (Abbildung 44).

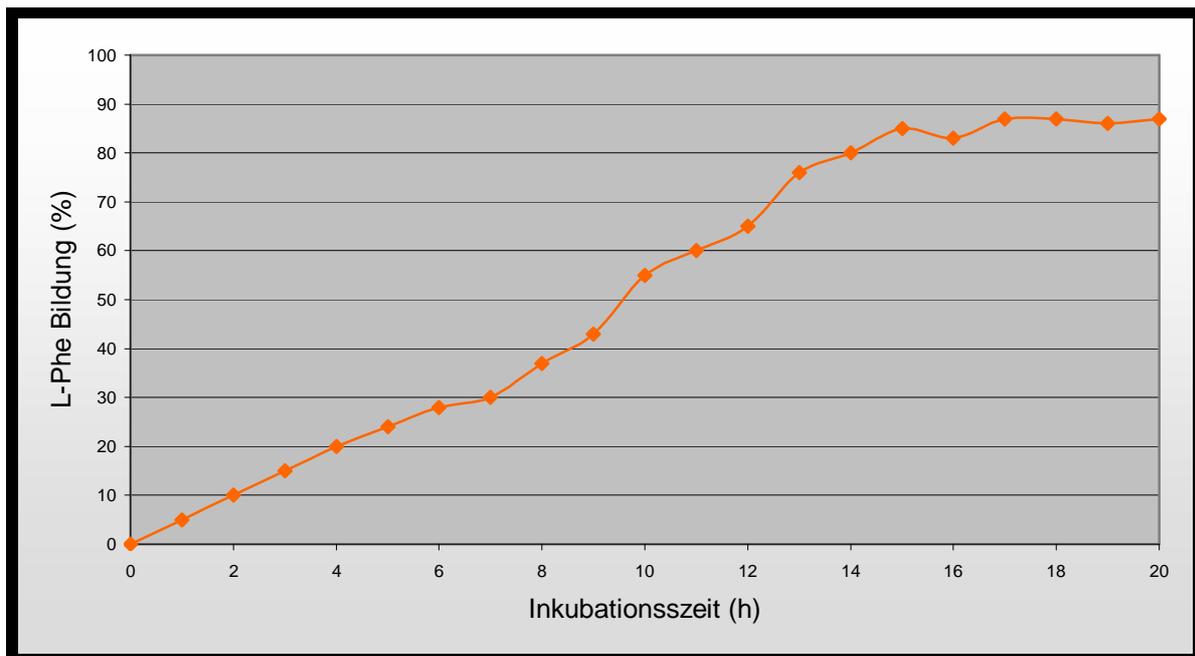


Abbildung 44: Ganzzellumsetzung zur Produktion von L-Phe. Die Bestimmung von L-Phe erfolgte mittels HPLC.

Eine Metabolisierung des entstandenen Produktes L-Phe konnte nach 20h Inkubation nicht nachgewiesen werden.

5.6 Gezielte Mutagenese

Im Rahmen der Dissertation sollten weiterhin PheDH- Mutanten erzeugt werden, die ein deutlich verändertes Substratspektrum als das der PheDH aufweisen.

Als Ausgangsgen für eine Mutagenese zur Amin- bzw. Lactat- Dehydrogenase wurde das Phenylalanin Dehydrogenase - Gen aus den folgenden Gründen ausgewählt:

- ☞ Gen ist verfügbar
- ☞ gutes Expressionssystem verfügbar
- ☞ Enzym zeigt eine hohe Aktivität (>2000 U/ml, 250 U/mg)
- ☞ Raumstruktur bekannt
- ☞ breites Substratspektrum
- ☞ Ergebnisse übertragbar auf LeuDH, AlaDH, GluDH

In Abbildung 45 ist der Reaktionsmechanismus der PheDH katalysierten reduktiven Aminierung von Phenylpyruvat dargestellt.

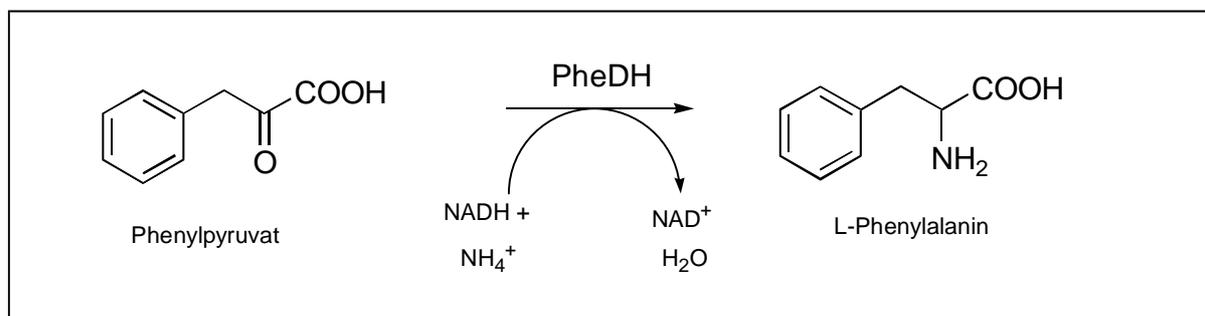


Abbildung 45: Reaktionsmechanismus der reduktiven Aminierung von Phenylalanin mittels PheDH.

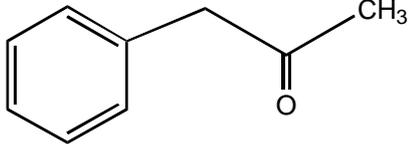
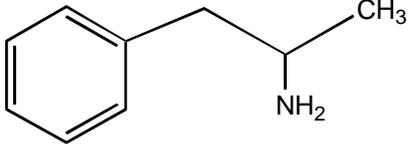
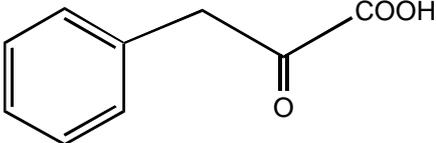
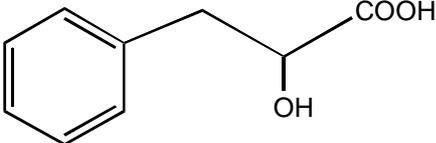
Für die Durchführung einer gezielten Mutagenese wurde die räumliche Struktur der PheDH mittels Computereinsatz modelliert und die Position des Substrates bestimmt (Abbildung 3).

Ziel ist die Erweiterung des Substratspektrums durch den Austausch von Lysin 66 durch weitere Aminosäuren, die sowohl in Größe, Hydrophobizität als auch Ladung variieren.

Durch eine gezielte Mutagenese von Lysin 66 gegen Isoleucin bzw. Arginin sowie Lysin 78 gegen Isoleucin wurde versucht, der Phenylalanin Dehydrogenase neue Aktivitäten auf weitere Substrate (Tabelle 15) zu verleihen. Die Lysinreste an Position 66 und 78 sind im

aktiven Kanal der PheDH lokalisiert. Interessant ist dieses, da Lysin 66 die Bindungsstelle für die Carboxylgruppe und Lysin 78 für die Ketogruppe im Substrat sind (Vanhooke *et al.*, 1999). Für die Umsetzung ähnlicher Substrate, welche aber eine Methylgruppe anstatt Carboxylgruppe besitzen, könnte der Austausch des basischen Lysins gegen eine neutrale Aminosäure wie z.B. Isoleucin zum Erfolg führen.

Tabelle 15: Möglichkeiten zur Substratumsetzung nach einer Mutagenese. Durch den Austausch des Lysins in Isoleucin (neutrale Aminosäure) könnte die Methylgruppe des Ketons akzeptiert werden und somit das Keton zum Amin umsetzen. Es wird eine direkte Hydrierung der Ketosäure zur Hydroxysäure bei einer Mutagenese des Lysin 66 in Arginin erwartet.

Substrat	Produkt
<p style="text-align: center;">Keton = Substrat</p>  <p style="text-align: center;">Reduktive Aminierung des Phenylacetons</p>	<p style="text-align: center;">Amin</p> 
<p style="text-align: center;">Ketosäure = Substrat</p>  <p style="text-align: center;">Reduktion der Ketosäure Phenylpyruvat</p>	<p style="text-align: center;">Hydroxysäure</p> 

5.6.1 Mutation des Lysin 66

Um eine veränderte Phenylalanin Dehydrogenase herstellen zu können, musste die Sequenz auf DNA-Ebene verändert werden. Die gezielte Mutagenese erfolgte nach dem Prinzip der überlappenden PCR (Ho *et al.*, 1989). Hierbei wurden Primer verwendet, die zwei DNA-Fragmente mit überlappenden Enden erzeugten. In einer zweiten PCR hybridisierten diese Fragmente, wobei das überlappende 3'-Ende jedes Stranges als Primer für die Synthese des Gegenstranges diente (Abbildung 46). Die Mutationen, die in die Oligonucleotid-Primer eingeführt wurden, fanden sich zu 100 % im Produkt wieder. Das resultierende Fusionsprodukt wurde durch weitere PCR mit den „äußeren“ Primern, die den gesamten Bereich einschließen, amplifiziert.

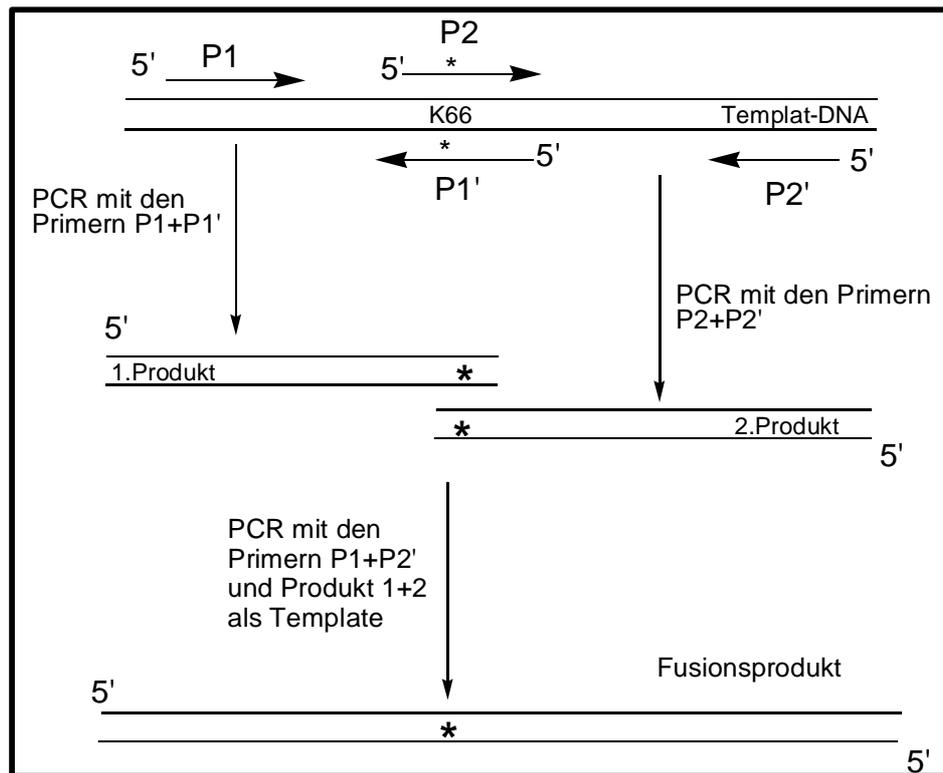


Abbildung 46: Schema zur Mutagenese mittels PCR nach der Methode der „overlapping extension“, ausgetauscht wurde das Lysin 66 gegen Isoleucin.

Mittels dieser Technologie wurde die Aminosäure Lysin 66 gegen Isoleucin ausgetauscht. Das erhaltene mutierte DNA-Fragment wurde „blunt ends“ in den pKK-223-3 an der SmaI-Schnittstelle kloniert (Abbildung 47). Die Auswahl dieses Plasmids und die Klonierung an der SmaI-Schnittstelle, die etwa 13 bp von der Ribosomenbindungsstelle entfernt ist, wurde zur Vermeidung von inclusion bodies gewählt, da bei Klonierungen der PheDH in anderen Plasmiden solche aufgetreten sind (5.1.5.3).

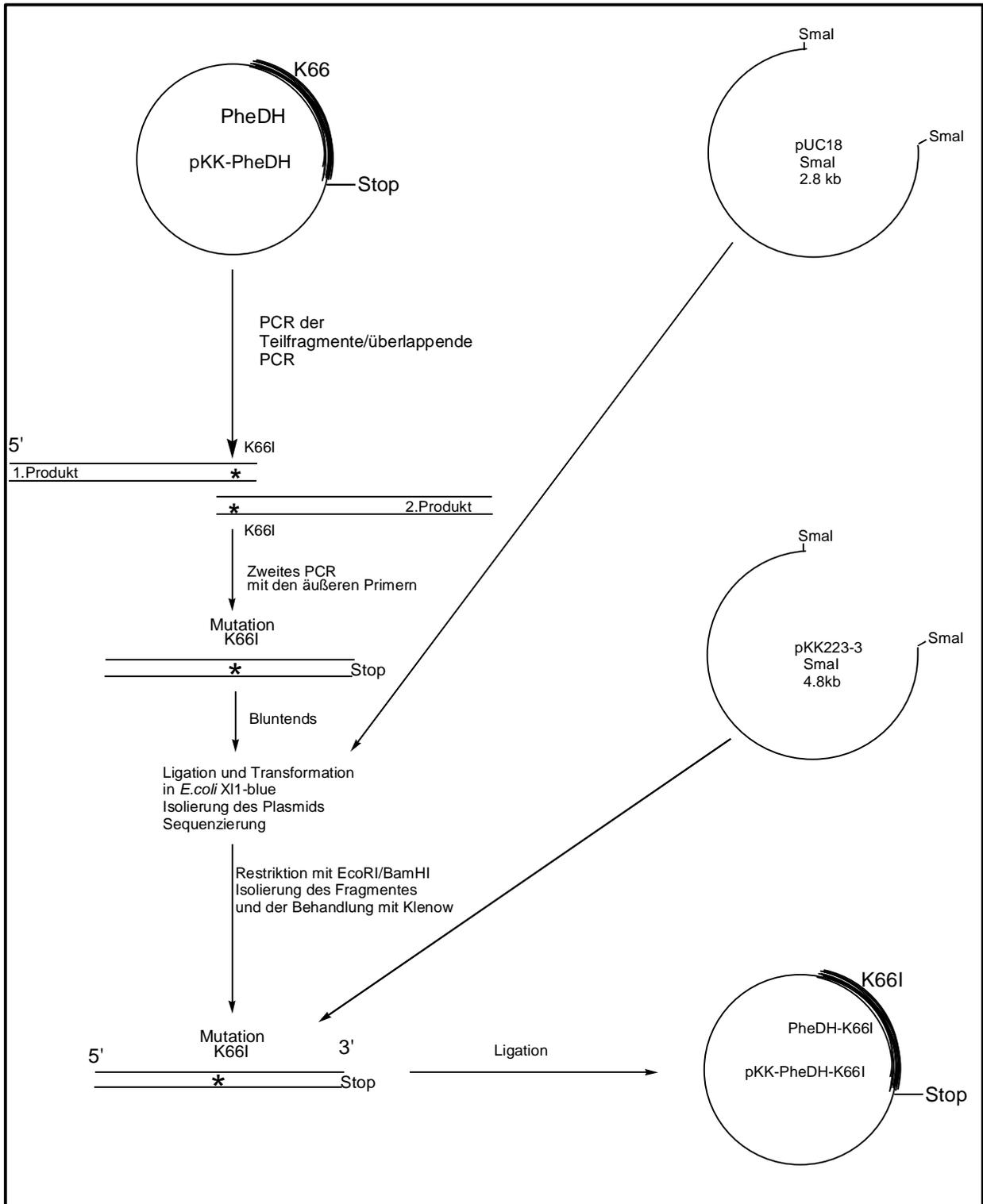


Abbildung 47: Klonierungsstrategie zur Einführung der Mutation PheDHK66I. Im ersten Schritt wurden zwei Fragmente amplifiziert, die die gleiche Mutation tragen; beim zweiten Schritt hybridisierten sie zum ganzen Gen. Somit konnte das amplifizierte Gen in den Expressionsvektor ligiert werden.

Auswahl der Primer

Dass Codons, die für die gleiche Aminosäure codieren, in den einzelnen Spezies unterschiedlich häufig verwendet werden, liegt an der unterschiedlichen Basenzusammensetzung in den DNAs verschiedener Organismen (Sharp *et al.*, 1988). Selbst innerhalb eines Organismus existieren zum Teil beträchtliche Unterschiede zwischen der Codonnutzung in Genen, die stark exprimiert werden, und solchen, die weniger häufig exprimiert werden. Diese Unterschiede können zur Genregulierung genutzt werden. Es gibt z.B. für selten genutzte Codons in der *E. coli*-Zelle auch nur geringere Mengen der passenden tRNA. Das hat zur Folge, dass mRNA von Genen mit vielen „seltenen“ Codons auch verzögert translatiert wird (Grantham *et al.*, 1981). Dies ist bei mutierten Proteinen, die überexprimiert werden sollen, nicht erwünscht.

Die ausgesuchten Codons wurden hinsichtlich dieses Kriteriums, wie oft dieses Codon in der Wt-PheDH genutzt wird, überprüft.

Für den Austausch von Lysin in Isoleucin wurde das Codon ATT unter Berücksichtigung der Codon-Usage von *E. coli* verwendet.

Mutagenese-Primer

P1' : GCT CAC TGC CAT **AAT** CAA CGT CAT CGC CCC

P2 : GGG GCG ATG ACG TTG **ATT** ATG GCA GTG AGC

Äußere Primer

P1 : ATC AAG GGG TAC ATC ATG AGT ATC GAC AGC

P2' : TTA CTA GGC AGT CGC TGT CGT TGT CGA GGC

Bei der Herstellung der beiden Teilfragmente der PheDH, die die gewünschten Mutationen tragen, bestand der Reaktionsansatz aus:

10 mM Tris pH 8.3

50 mM KCl

1.5 mM MgCl₂

jeweils 200 µM dATP, dCTP, dTTP, dGTP

20-40 pmol jedes Oligonucleotid-Primers

2.5 U Taq-Polymerase pro 100 µl Ansatz

10 ng Plasmid-DNA als PCR-Template (pKK-223-PheDH)

Die PCR Amplifikation wurde auf einem automatischen DNA-Thermal-Cycler (Robocycler, Fa. Stratagene) nach folgendem Programm durchgeführt:

- ☞ 3 min Denaturierung bei 94°C (zu Anfang des Programms)
- ☞ 1 min Denaturierung bei 94°C
- ☞ 1 min Annealing der Primer bei 65°C
- ☞ 1 min Extension (Verlängerung der Primer durch die Taq-Polymerase) bei 72°C
- ☞ zyklisches Wiederholen der letzten drei Schritte (25 x)
- ☞ 5 min Extension (nach Abschluss der Zyklen, um eine vollständige Verlängerung eventuell vorher abgebrochener DNA-Produkte zu gewährleisten)

Nach der PCR wurden die erhaltenen Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und isoliert (Abbildung 48). Die zweite PCR zur Überlappung der Fragmente enthielt equimolare Mengen beider Fragmente, wobei von dem kürzeren ca. 60ng eingesetzt wurden (die Menge des größeren Fragmentes wurde dementsprechend berechnet). Die Annealing- Temperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der resultierenden Überlappingsregion. Somit konnte ein großes Fragment von 1,1 kb amplifiziert werden (Abbildung 49).

Alle hergestellten Muteine wurden sequenziert und die Mutationen bestimmt. Die gezielte Mutagenese nach Ho et al. (Ho *et al.*, 1989) führte in den meisten Fällen sowohl zu niedriger Ausbeute des gewünschten Produktes als auch zu unerwünschten Mutationen. Nach einer Optimierung des PCR-Ansatzes in Bezug auf das Verhältnis der zu fusionierenden Fragmenten sowie der dNTP- Konzentrationen konnten sowohl gute Ausbeuten als auch gewünschte Mutationen erreicht und unerwünschte Mutationen vermieden werden.

Zur Einführung der Mutationen wurde nicht das ganze PheDH-Gen (1068 bp) amplifiziert, sondern nur ca. 891 bp bzw. 213 bp große Fragmente und dann hybridisiert und amplifiziert.

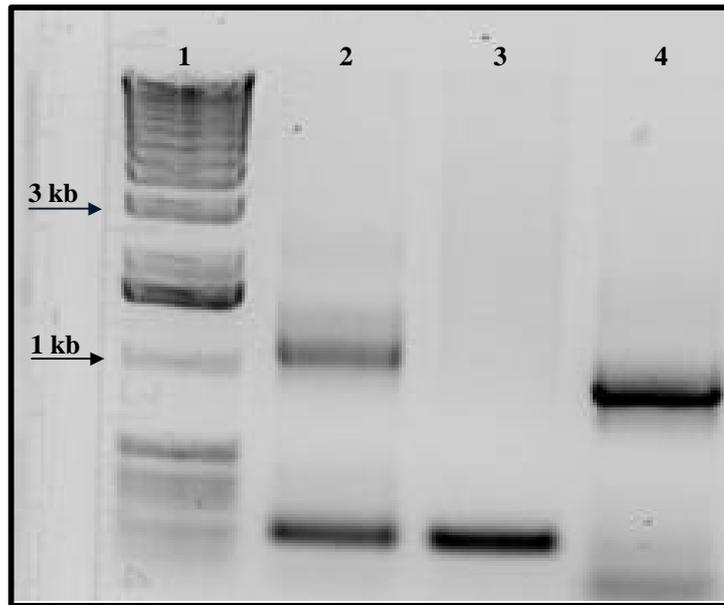


Abbildung 48: Agarosegelanalyse der PCR zur K66I- Mutagenese. Spur 1: kb-Leiter; Spur 2 unspezifische Amplifikation der Teilfragmente; Spur 3 und 4 sind gewünschte Amplifikate nach einer Optimierung der PCR- Bedingungen mit einer Größe von ca. 200 bp bzw. 900 bp.

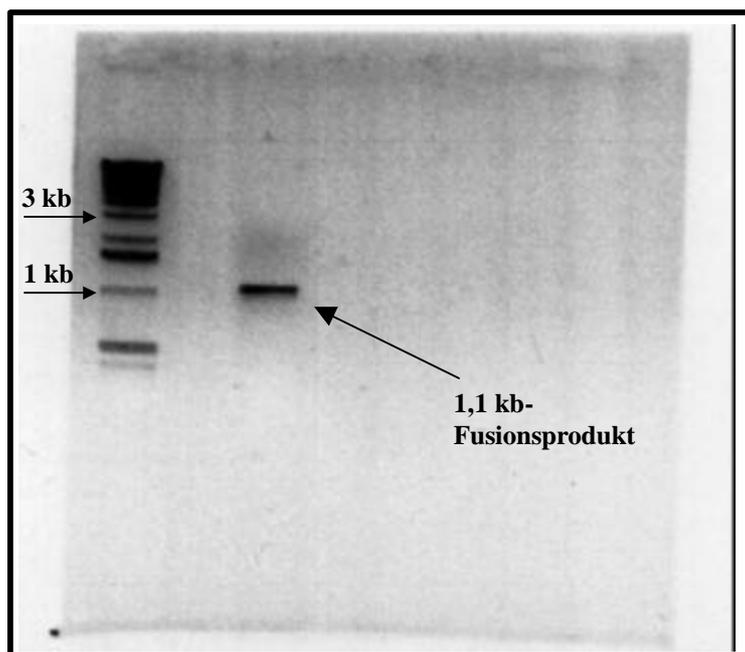


Abbildung 49: Sauberes PCR-Produkt nach der Fusion der beiden Fragmente (Abbildung 48; Bahn 3+4) mit einer Größe von 1.1 kb.

Die nach der zweiten PCR erhaltenen DNA-Fragmente, die die Mutation K66I enthalten sollten, wurden in den *Sma*I geschnittenen pUC18 bzw. pKK223-3 kloniert und vollständig sequenziert.

Die rekombinanten Klone wurden mittels Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein und die richtige Orientierung des Inserts geprüft. Mit einem positiven Klon wurde anschließend der Expressionsstamm JM105 transformiert und das PheDH-Mutein exprimiert.

5.6.2 Sequenzierung der K66I

Das neukonstruierte Mutein wurde sequenziert und den Austausch des Lysin 66 zu Isoleucin bestimmt.

```

ATGAGTATCGACAGCGCACTGAACTGGGACGGGGAAATGACGGTCACCCGATTCGACCGGGAGAC
TGGTGCCCATTTTCGTCATTTCGACTCGATTCGACCCAACCTCGGACCGGGCGCCGGAGGCACCAGAGC
CGCACAGTACTCACAGCTGGCGGACGCCCTACCGACGCCGGCAAATTGGCGGGGGCGATGACGT
TGATTATGGCAGTGAGCAACCTTCCGATGGGCGGGGGCAAATCCGTCATTGCGCTTCCTGCGCCGC
GTCATTTCGATCGATCCGAGCACGTGGGCACGCATCCTCCGAATCCACGCCGAGAACATCGACAAGT
TGTCGGCAACTACTGGACCGGACCGGACGTCAACACCAATTCGGCAGACATGGATACTCTGAACG
ACACCACCGAGTTCGTGTTTCGGACGGTCGCTCGAACCGGGCGGCGGGTTCGAGCGCGTTCACCA
CCGCCGTTGGCGTGTTTCGAGGCGATGAAGGCGACCGTCGCGCACCGTGGGCTGGGCTCACTCGACG
GTTTGACGGTCCTGGTCCAAGGACTGGGGGCAGTCGGAGGATCATTGGCATCCCTGGCCGCCGAAG
CGGGTGCCAACTCCTGGTGGCAGACACCGACACCGAGCGAGTAGCGCACGCTGTTGCGTTGGGC
CACACAGCGGTTGCCCTCGAGGACGTTCTGTCCACCCCGTGTGATGTCTTCGCACCCTGCGCAATG
GGCGGCGTCATCACCACCGAGGTGGCGCGAACACTCGACTGTTCCGTCGTGGCCGGTGCCGCCAAC
AACGTCATCGCCGACGAGGCCGCCTCGGACATCCTGCACGCACGCGGAATTCTGTACGCTCCCGAC
TTCGTGGCCAACGCCGGCGGTGCCATCCACCTCGTAGGCCGGGAGGTTCTCGGTTGGTCCGAGTCG
GTTGTCCACGAACGAGCAGTTGCCATAGGCGACACCCCTGAATCAGGTCTTCGAGATCTCCGACAAC
GACGGCGTCACCCCGACGAGGCCGCCCGCACTCTCGCTGGACGGCGCGCCCGGAGGCCTCGAC
AACGACAGCGACTGCCTAGTAA

```

Abbildung 50: Gensequenz des K66I- Muteins.

5.6.3 Expression der PheDH-Mutante K66I

Da *E. coli* JM-105 sich als geeigneter Stamm für die Expression der PheDH erwiesen hat, wurde das neuhergestellte PheDH-Mutein „pKK-223-K66I“ in diesen Stamm transformiert und zur Expression eingesetzt. Die Anzucht erfolgte in 250 ml LB-amp, induziert wurde mit 1mM IPTG bei einer OD₅₉₀ von 0,6. Der Aktivitätstest dieses Muteins erfolgte sowohl mit Phenylpyruvat (um die Restaktivität der PheDH zu überprüfen) als auch für die gewünschte Aktivität mit Phenylacetone als Substrat.

Erwartungsgemäß besitzt das Mutein keine Aktivität mehr gegenüber Phenylpyruvat als Substrat. Da die Bindungsstelle Lysin66 im aktiven Zentrum der PheDH zur Carboxylgruppe

des Phenylpyruvats (Abbildung 51a) durch eine Aminosäure mit neutraler Seitenkette „Isoleucin“ ausgetauscht (Abbildung 51b) wurde, verlor die PheDH die Aktivität auf reduktive Aminierung des Phenylpyruvats.

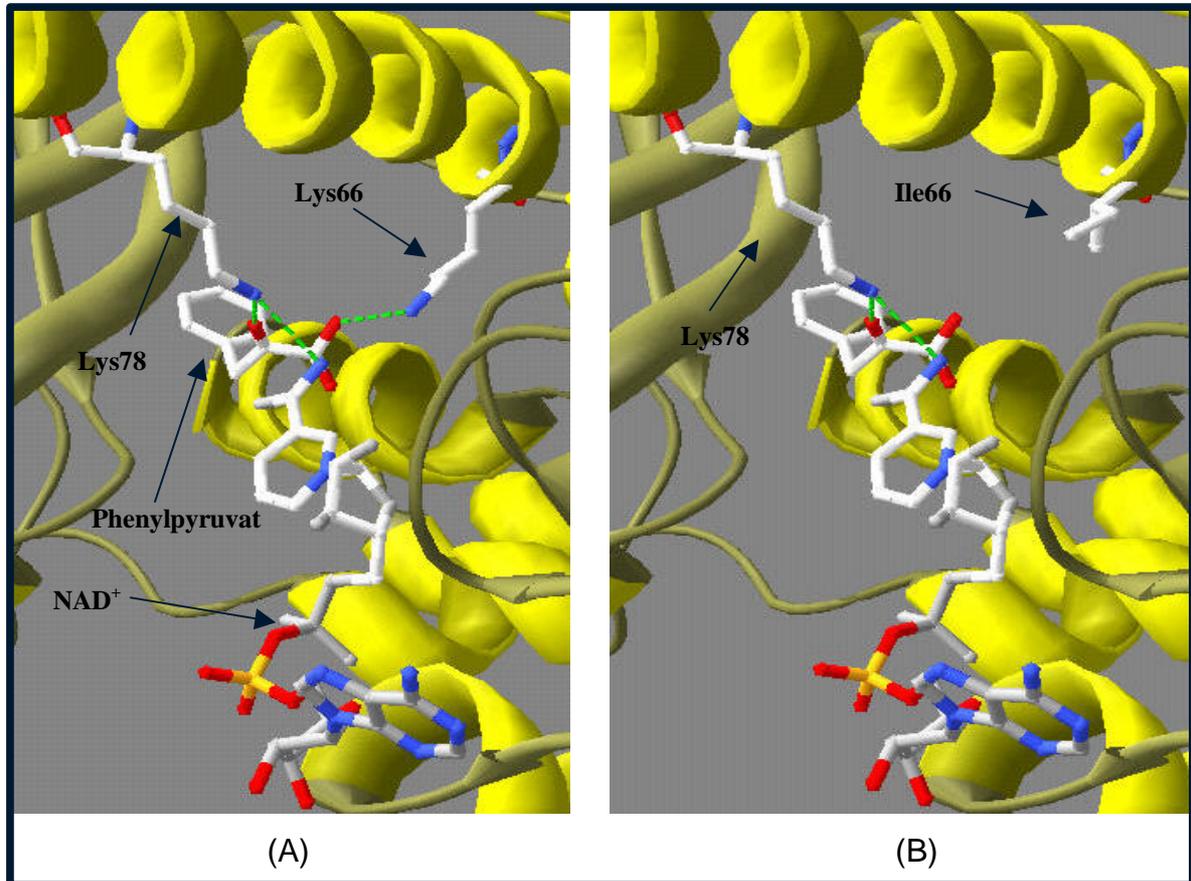


Abbildung 51: Das aktive Zentrum der PheDH und der Effekt des Lysin 66 durch den Austausch in Isoleucin. (A) Wechselwirkung zwischen Lysin 66 und der Carboxylgruppe des Substrates in der PheDH; (B) Mutein K66I, Lysin wurde gegen Isoleucin ausgetauscht, das keine Wasserstoffbindung zur Carboxylgruppe des Substrates bildet. Wasserstoffbindungen sind grün dargestellt.

Die Aktivität des neukonstruierten Muteins wurde auf eine Aminierung des Phenylacetons überprüft. In Abbildung 52 ist der Mechanismus der reduktiven Aminierung dargestellt.

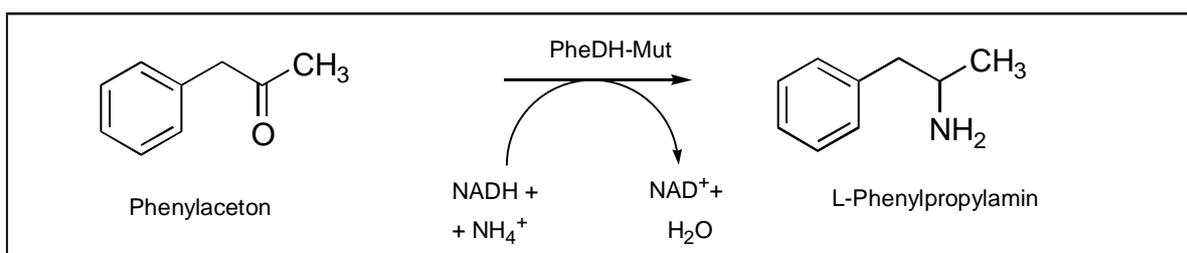


Abbildung 52: Reaktionsmechanismus der reduktiven Aminierung von Phenylaceton.

Eine Aktivität bezüglich des Phenylacetons konnte nicht nachgewiesen werden. Durch diesen Austausch konnte zwar die Ladung der Bindungsstelle zum Substrat verändert werden, aber für die Akzeptanz eines neuen Substrates, könnten neben der Mutagenese von Lysin 66 noch weitere Aminosäureaustausche notwendig sein. Da die räumliche Struktur ähnlicher Amin Dehydrogenasen wie die der gewünschten nicht bekannt sind, war es nicht möglich die weitere Optimierung durch gezielten Aminosäureaustausch durchzuführen.

Das Mutein K66I trägt die gewünschte Mutation (5.6.2), trotzdem konnte keine Aktivität bezüglich Phenylaceton festgestellt werden. Dies könnte konformationsbedingt sein, was zu der Überlegung führte, die Sequenz dieses Muteins ungezielt mittels Zufallsmutagenese (directed evolution) zu verändern. Daher wurde dieses Mutein als Template benutzt und für die weitere Optimierung eingesetzt.

5.6.4 Herstellung weiterer Muteine

Aufgrund der Überlegung, basische Aminosäuren durch neutrale auszutauschen, um eine Aminosäure Dehydrogenase in eine Amin Dehydrogenase umzuwandeln (zu diesem Zeitpunkt war die Kristallstruktur noch unbekannt), wurden die Muteine R210I bzw. R140I hergestellt.

Bei der Expression der Mutante R210I konnte kein aktives Protein nachgewiesen werden. Da Arginin bei dem benutzten pH-Wert eine positive Ladung aufweist und dadurch Interaktionen mit anderen Aminosäuren hervorruft, kann ein Abstoßungseffekt bei Austausch gegen eine neutrale Aminosäure (Isoleucin) auftreten.

Es wurde eine verminderte PheDH-Aktivität (83 % der ursprünglichen PheDH-Aktivität gegen Phenylpyruvat) bei dem exprimierten Protein der Mutante R140I beobachtet. Durch diesen Austausch konnte die Proteinfaltung verlangsamt und dadurch ein proteolytischer Abbau begünstigt werden. Vereinfacht: Das Mutein ist für Proteasen angreifbarer. Die gewünschte Amin Dehydrogenase Aktivität gegenüber Phenylaceton war nicht nachzuweisen.

Das Mutein PheDH-R210I zeigt keine Aktivität, weder die ursprüngliche PheDH Aktivität noch eine neue Amin Dehydrogenase Aktivität. Obwohl Arginin 210 nicht im aktiven Zentrum beteiligt ist, führt eine Deletion bzw. Substitution zum Verlust der PheDH-Aktivität.

5.6.5 Mutation von Lysin 66 zu Arginin und Lysin 78 zu Isoleucin

Ein Austausch von Lysin 66 gegen Arginin könnte theoretisch eine direkte Reduktion der Ketogruppe von Phenylpyruvat verursachen und somit eine Ähnlichkeit zum Lactat Dehydrogenase-Mechanismus führen (Hart *et al.*, 1987).

Dieser Fall einer direkten Reduktion der Ketogruppe ist bei Lactat-Dehydrogenasen zu beobachten. Um einen ähnlichen Mechanismus wie bei der Lactat-Dehydrogenase und damit eine Reduktion der Ketogruppe des Phenylpyruvats durch die PheDH zu erreichen, wurden die Bindungsstellen zum Substrat beider Enzymen verglichen. In der Lactat Dehydrogenase ist Arginin für die Bindung der Carboxylgruppe verantwortlich (Luyten *et al.*, 1989), wogegen in der PheDH wie bei allen Aminosäure-Dehydrogenasen Lysin diesen Part übernimmt.

Ein weiterer Unterschied ist, dass eine direkte Reduktion der Ketogruppe im Phenylpyruvat nicht stattfinden kann, weil die Entfernung zwischen dem C4 des Nicotinamidrings und der Ketogruppe am C² des Phenylpyruvat größer als 6 Å ist. Diese Entfernung wird durch die Bindung von Lysin 78 sowie Lysin 66 an die Ketogruppe bzw. an die Carboxylgruppe des Substrates, das dann umorientiert und von NADH entfernt wird, verursacht. Der dadurch vergrößerte Abstand verhindert einen direkten Hydridtransfer. Infolgedessen entsteht im ersten Schritt ein Imin, das erst im nächsten Schritt reduziert werden kann (Vanhooker *et al.*, 1999). Anders als bei der PheDH ist bei der Lactat-Dehydrogenase für die Bindung zur Ketogruppe des Substrates Histidin verantwortlich. Luyten *et al.* haben postuliert, dass durch den Austausch der Aminosäure Arginin 171 (Bindungsstelle zur Carboxylgruppe im Substrat) in der Lactat-Dehydrogenase gegen eine neutrale Aminosäure, die Reduktion des Substrates vermieden werden kann. Dieser Austausch Arginin 171 gegen Tyrosin bzw. Tryptophan führte nicht zur Verlust der LDH –Aktivität. Überraschenderweise war die Aktivität in diesen zwei Muteinen höher als in einem Mutein mit dem Austausch der basischen Aminosäure Arginin gegen das basische Lysin (Luyten *et al.*, 1989).

Es besteht eine Ähnlichkeit in der PheDH zur LDH in Bezug auf die Bindung zur Carboxylgruppe bzw. Ketogruppe des Substrates. Sowohl in der LDH als auch in der PheDH sind die beteiligten Aminosäuren basisch. Da nach Luyten *et al.* der Austausch der basischen Aminosäure (Bindungsstelle für die Carboxylgruppe im Substrat) keinen Einfluss auf die Orientierung brachte, wurde in dieser Arbeit ebenso die Bindung zur Ketogruppe untersucht. Durch die Mutation des Lysin 78 gegen Isoleucin könnte obiger Abstand verringert und die Umorientierung des Substrates verhindert werden, so dass eine Hydrierung der Ketogruppe stattfinden könnte.

5.6.6 PCR der K66R- Mutanten und deren Klonierung

Zur Klonierung der PheDH Mutante K66R wurde das gesamte Ursprungsplasmid (pKK-223-3-PheDH-Gen; Abbildung 53) mittels PCR amplifiziert (Deng & Nickoloff, 1992).

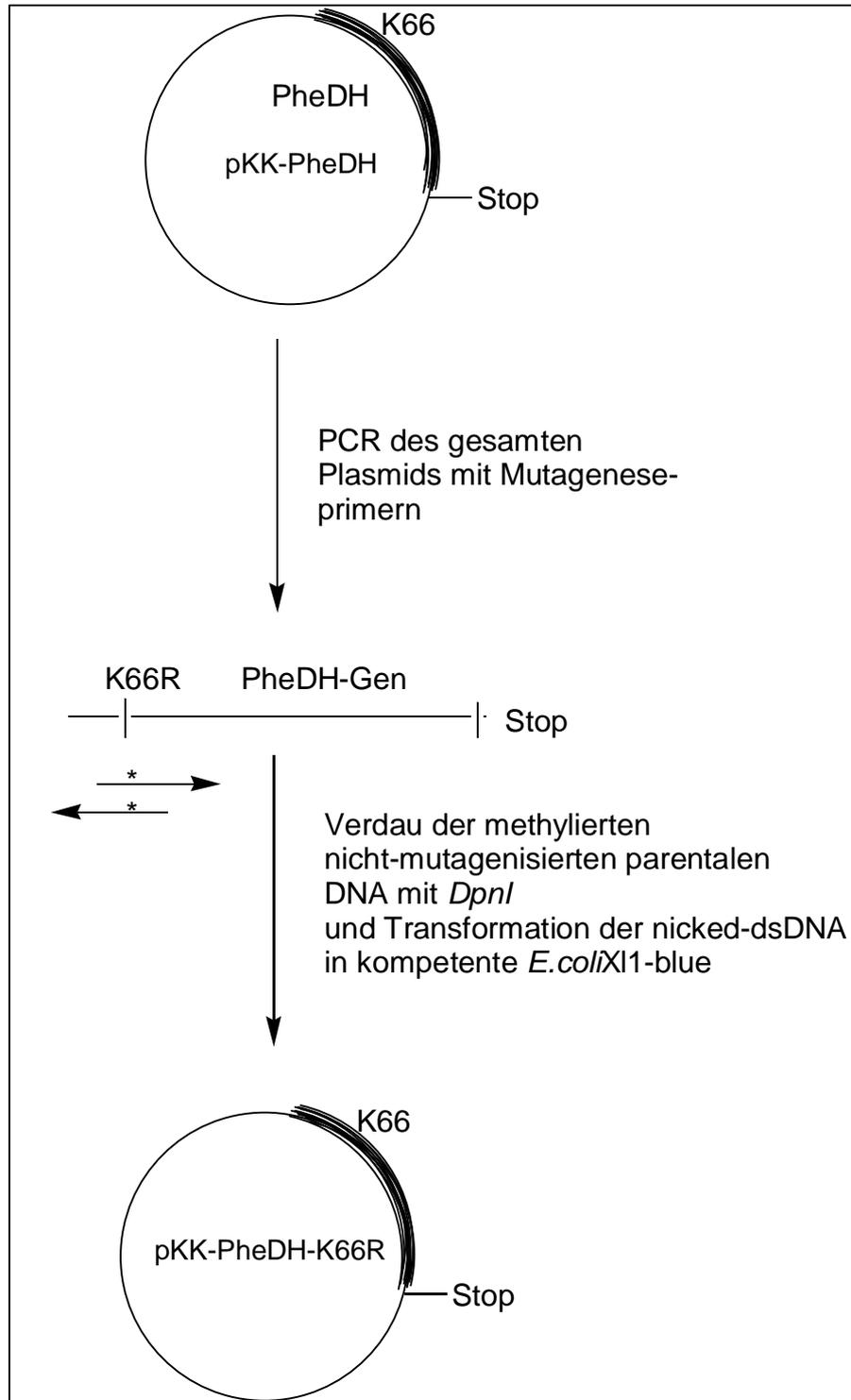


Abbildung 53: Klonierungsstrategie der PheDH-Mutanten am Beispiel der PheDH-K66R. Das ganze rekombinante Plasmid wird mittels Mutagenese-Primer amplifiziert und in *E. coli*-Zellen transformiert.

Beide Primer beinhalten die gewünschte Mutation.

P1: GCT CAC TGC CAT **TCT** CAA CGT CAT CGC CCC

P2: GGG GCG ATG ACG TTG **AGA** ATG GCA GTG AGC

Im Anschluß an die PCR wird die parentale Template-DNA mit dem Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut. *DpnI* erkennt ausschließlich methylierte DNA. Die verbliebene mutierte DNA wird in kompetente *E. coli* X11 Blue bzw. JM105 transformiert, wobei eventuelle Einzelstrangbrüche vom bakteriellen Reparatursystem behoben werden. Der Anteil mutierter Plasmide ist ? 80 % (Stratagene).

Positive Klone wurden sequenziert und ein fehlerfreies mutiertes Plasmid zur Expression eingesetzt.

5.6.7 Aktivitätsnachweis des PheDH-Muteins K66R und K78I

Die Muteine PheDH-K66R und K78I wurden in 200 ml Maßstab kultiviert und die Expression erfolgte ausschließlich in *E. coli* JM105. Während die Expression der rec-PheDH (pKK223-3-PheDH) in *E. coli* JM105 zu einem Anteil von ca. 13 % PheDH des löslichen Gesamtproteins führte, beträgt der Anteil der PheDH-K66R nur 10 % und der K78I etwa 4 % des löslichen Zellproteins.

Das natürliche Substrat der wt-PheDH ist Phenylpyruvat, das mit Zusatz von Ammoniumionen durch eine reduktive Aminierung zum Phenylalanin umgesetzt wird. Bei der Aktivitätsbestimmung des Muteins PheDH-K66R bzw. K78I wurde neben der reduktiven Aminierung auch ein Parallelversuch ohne Ammoniumzusatz durchgeführt, um zu prüfen, ob eine direkte Reduktion stattfinden kann, was auf einen Reaktionsmechanismus analog der Lactat Dehydrogenase hinweisen würde.

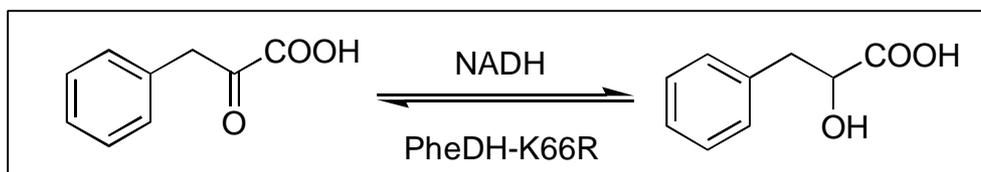


Abbildung 54: Reaktionsmechanismus zur Umsetzung der Ketosäure Phenylpyruvat zur Hydroxysäure Phenyllactat.

Eine Veränderung der PheDH durch den Austausch des Lysin 66 in Arginin führte nicht zur drastischen Abnahme der PheDH-Aktivität. Bei diesem Mutein K66R waren etwa 90 % der PheDH Aktivität noch nachweisbar. Die gewünschte Erweiterung des Substratspektrum durch

gezielte Mutagenese, konnte nicht erreicht werden. Das basische Lysin wurde zwar durch die Mutagenese durch die basische Aminosäure Arginin ausgetauscht, dies hat aber nicht zu einem geänderten Reaktionsablauf (Reduktion statt reduktiver Aminierung) geführt.

Durch den Austausch der basischen Aminosäure Lysin gegen eine neutrale Aminosäure im Mutein K78I, ist die ursprüngliche PheDH- Aktivität verloren gegangen. Die gewünschte Aktivität mit einem direkten Hydridtransfer konnte ebenso durch diesen Austausch nicht erreicht werden.

Tabelle 16: Zusammenfassung der hergestellten Mutanten und deren neue Eigenschaften . (O) getestet aber keine Aktivität, (-) nicht getestet. Die Restaktivität bezieht sich auf der rec-PheDH.

Mutante	Reduktive Aminierung	Reduktion	Reduktion
	Phenylpyruvat	Phenylpyruvat	Phenylaceton
K 78 I	O	O	-
K 66 R	90 % Restaktivität	O	O
K 66 I	O	-	O
R 210 I	O	-	O
R 140 I	83 % Restaktivität	O	O

5.7 Zufallsmutagenese

In dieser Arbeit wurde bereit die gezielte Mutation der K66I, K66R und K78I beschrieben. Diese Austausche führten zu keiner Erweiterung des Substratspektrums bzw. detektierbaren Expression eines aktiven Enzyms. Da die gezielte Mutagenese nicht zu den gewünschten Aktivitäten geführt hat, wurde eine Zufallsmutagenese durchgeführt. Als Template wurden sowohl die rekombinante PheDH als auch in einer zweiten Versuchsreihe die Muteine K66I und K66R als DNA-Template eingesetzt.

Die error-prone PCR-Methode für die Zufallsmutagenese wurde für die Erzeugung der Mutanten verwendet. Dafür wurde das folgende PCR-Protokoll verwendet:

10 µl	10x Mutagenese Puffer inkl. MgCl ₂
10 µl	10x Mutagenese-dNTP-mix
0-10 µl	5 mM MnCl ₂ (0-0.5 mM Endkonz.)
2 fmol	Template-DNA (ca. 7.5 ng eines 5.7 kb Plasmid)
je 40 pmol	upstream and downstream primer
1µl	Taq- Polymerase
ad 100µl	Millipor- A-dest

Mit Mineralöl überschichten

Mutagenese Puffer:

70 mM	MgCl ₂
500 mM	KCl
100 mM	Tris-HCl, pH 8.3 bei 25°C
0,1 % (W/V)	Gelatine

Mutagenese dNTP-mix (10x):

2 mM	dGTP
2 mM	dATP
10 mM	dTTP
10 mM	dCTP

Mit der Optimierung des PCR-Protokolls und dem Einsatz bestimmter Konzentrationen an dNTPs bzw. MnCl₂ konnten 2-4 Mutationen eingeführt werden. Falsche Konzentrationen an MgCl₂ führten bei der PheDH-Amplifikation aufgrund des GC-Gehaltes zu unkontrollierter Zahl an Mutationen.

Es wurden etwa 12.000 Kolonien aus der Zufallsmutagenese sowohl gegen Phenylacetone als auch Phenylpyruvat getestet. Die Aktivität gegen Phenylpyruvat wurde sowohl bezüglich reduktiver Aminierung (mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) als auch bezüglich einfacher Reduktion ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ überprüft. Aufgrund der hohen Zahl an erzeugten Mutanten wurde ein schneller Farbttest zum Screening der Klone entwickelt.

5.8 Entwicklung eines Farbttestes als Screeningmethode

Bei der Zufallsmutagenese produziert man eine große Zahl an Enzymvarianten, die einzeln auf Aktivität getestet werden müssen. Eine einfache Methode ist eine Überprüfung der Enzymaktivität direkt in den Zellen. Dafür wurde ein Farbttest entwickelt.

Er beruht auf der Aufnahme und Umsetzung von Farbstoffen durch ganze lebende Mikroorganismen. Das Ausstreichen bzw. Sprühen von Farbstofflösungen auf Agarplatten mit Bakterienkolonien führt zur Aufnahme dieses Farbstoffes, der dann umgesetzt wird. Durch den Farbumschlag, der durch die folgende Umsetzung verursacht wird, können positive Zellen erkannt werden.

NAD^+ bzw. NADP^+ -abhängige Enzyme sind durch diese Methode nachweisbar.

Eine Mischung aus INT und PES (siehe unten) wird auf eine Agarplatte, die die zu untersuchenden Bakterien enthält, gegeben. Das Substrat befindet sich im Agar. Für die Induktion ist IPTG erforderlich. Nach Zugabe der Farbstofflösung wurde die Agarplatte mit Öl beschichtet (um die Re-Oxidation des gebildeten reduzierten Tetrazoliums zu vermeiden) und für 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Der Farbstoff wird dadurch aufgenommen und umgesetzt. Der Farbumschlag ist ein Nachweis für die Aktivität des Enzyms.

Substrat (L-Phenylalanin)	20 mM
INT (oder TNBT)	25 mg
PES	2 mg/ 100ml Puffer
TEA pH 7.0	50 mM

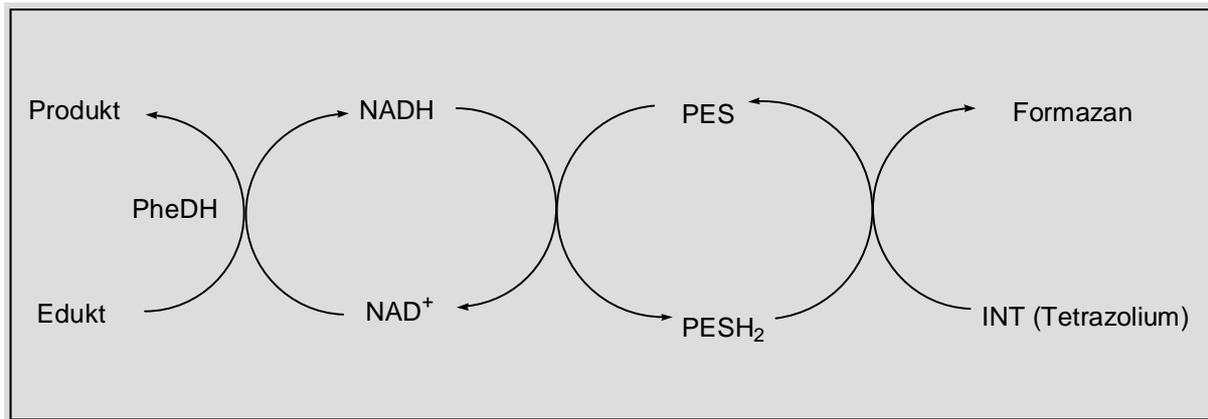


Abbildung 55: Reaktionsschema zum Verlauf des Farbtests.



Abbildung 56: Farbttest auf Agarplatten mit ganzen Zellen. Die gelben Zellen enthalten PheDH-Aktivität

Zum Auffinden der gewünschten Mutanten wurde Phenylalanin als Donor zur Reduktion des Coenzym NAD⁺ eingesetzt. Da die in dieser Arbeit hergestellten Mutanten unter anderem auf Amin-Dehydrogenase Aktivität überprüft werden sollten, konnte diese Methode nicht eingesetzt werden, da das einzusetzende Substrat Phenylpropylamin nicht kommerziell erhältlich und die Synthese dieses Substrates nicht etabliert ist.

Die Screeningsmethode wurde für den Nachweis der K66R-Muteine mit Phenyllactat und L-Phenylalanin als Substrate verwendet.

5.8.1 K66R –Muteine

Etwa 20.000 durch die Zufallsmutagenese hergestellten Kolonien wurden untersucht und ca.75% der Kolonien zeigten Expression einer aktiven PheDH. Die neuen Muteine behielten haben die PheDH-Aktivität und zwei Muteine davon zeigten zusätzlich die gewünschte Aktivität auf Reduktion von Phenylpyruvat. Die neuen positiven Muteine wurden auf die Reduktion des Phenylpyruvats ohne Ammoniumionen überprüft, wodurch eine Hydroxysäure als Produkt entsteht. Einige positiv gescreenten Muteine sind in Abbildung 57 dargestellt.

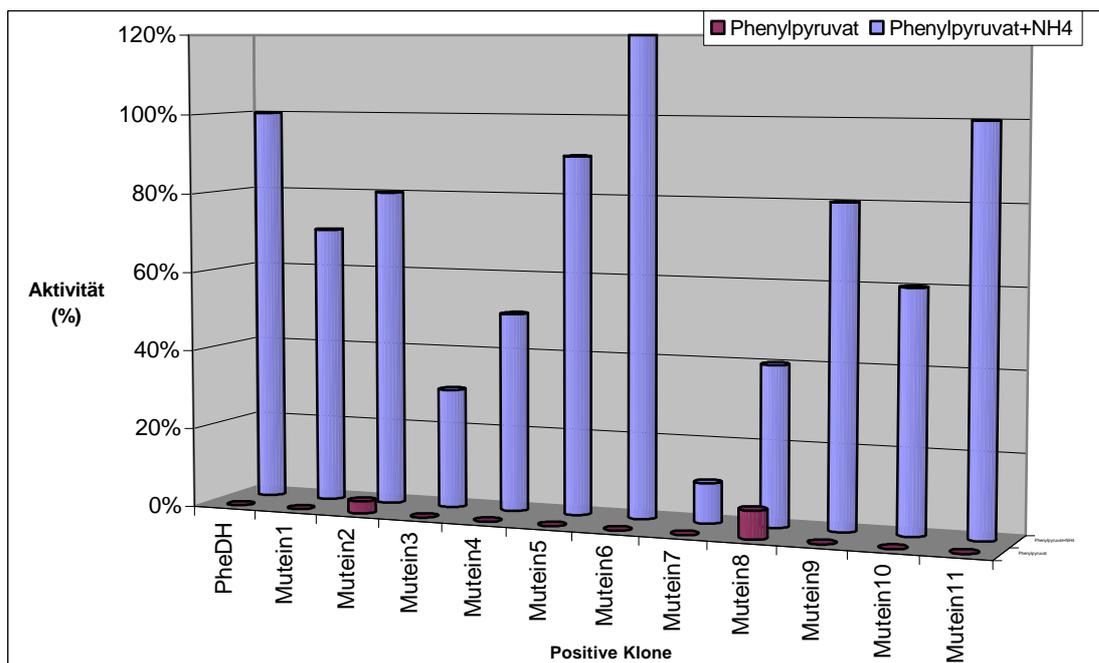


Abbildung 57: Bestimmung der Aktivität der K66R-Muteine. Gezeigt werden einige Muteine mit den restlichen Aktivitäten im Vergleich zur Wt-PheDH. Bei zwei Muteinen (Mutein 2 und 8) konnte der natürliche Reaktionsmechanismus verändert und somit neue Eigenschaften erzielt werden.

Das Mutein K66R-8 (hier Mutein 8) zeigt eine Aktivität von 12 U/ml auf Reduktion des Phenylpyruvat zur Phenyllactat. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte photometrisch durch Detektion der Abnahme der Absorption des NADH bei 340 nm. Das rekombinante Plasmid wurde sequenziert und die Mutationen bestimmt. Zusätzlich zur Mutation an Position 66 (Austausch Lysin gegen Arginin), das bei der gezielten Mutagenese eingeführt worden ist, wurden zwei neue Mutationen **T208A** und **E225D** gefunden (Abbildung 58).

	10	20	30	40	50	60
Wt_PheDH	MSIDSALNWDGEMTVTRFDRETGAHFVIRLDSTQLGPAAGGTRAAQYSQLADALTDAGKL					
PheDH_K66R	MSIDSALNWDGEMTVTRFDRETGAHFVIRLDSTQLGPAAGGTRAAQYSQLADALTDAGKL					

	70	80	90	100	110	120
Wt_PheDH	AGAMTLKMAVSNLPMGGGKSVIALPAPRHSIDPSTWARILRIHAENIDKLSGNYWTGPDV					
PheDH_K66R	AGAMTLRMAVSNLPMGGGKSVIALPAPRHSIDPSTWARILRIHAENIDKLSGNYWTGPDV					

	130	140	150	160	170	180
Wt_PheDH	NTNSADMDTLNDTTEFVFGRSLERGGAGSSAFTTAVGVFEAMKATVAHRGLGSLDGLTVL					
PheDH_K66R	NTNSADMDTLNDTTEFVFGRSLERGGAGSSAFTTAVGVFEAMKATVAHRGLGSLDGLTVL					

	190	200	210	220	230	240
Wt_PheDH	VQGLGAVGGSLASLAAEAGAQLLVADTDTERVAHAVALGHTAVALDVLSTPCDVFAPCA					
PheDH_K66R	VQGLGAVGGSLASLAAEAGAQLLVADTDARVAHAVALGHTAVALDVLSTPCDVFAPCA					

	250	260	270	280	290	300
Wt_PheDH	MGGVITTEVARTLDCSVVAGAANNVIADAEASDILHARGILYAPDFVANAGGAIHLVGRE					
PheDH_K66R	MGGVITTEVARTLDCSVVAGAANNVIADAEASDILHARGILYAPDFVANAGGAIHLVGRE					

	310	320	330	340	350	
Wt_PheDH	VLGWSESVVHERAVAIGDTLNQVFEISDNDGVTPDEAARTLAGRRAREASTTTATA					
PheDH_K66R	VLGWSESVVHERAVAIGDTLNQVFEISDNDGVTPDEAARTLAGRRAREAS-TTATA					

Abbildung 58: Aminosäuresequenz des Muteins K66R-8 im Vergleich zur PheDH-AS-Sequenz. 3 Mutationen K66R, T208A, E225D sind in diesem Mutein für die neue Aktivität verantwortlich.

Basierend auf den Daten der dreidimensionalen Struktur der PheDH wurden die neuen Mutationen mittels 3D-Programm (Swiss PDB Viewer) modelliert. Abbildung 59 verdeutlicht die Lage der ausgetauschten Aminosäuren in der PheDH.

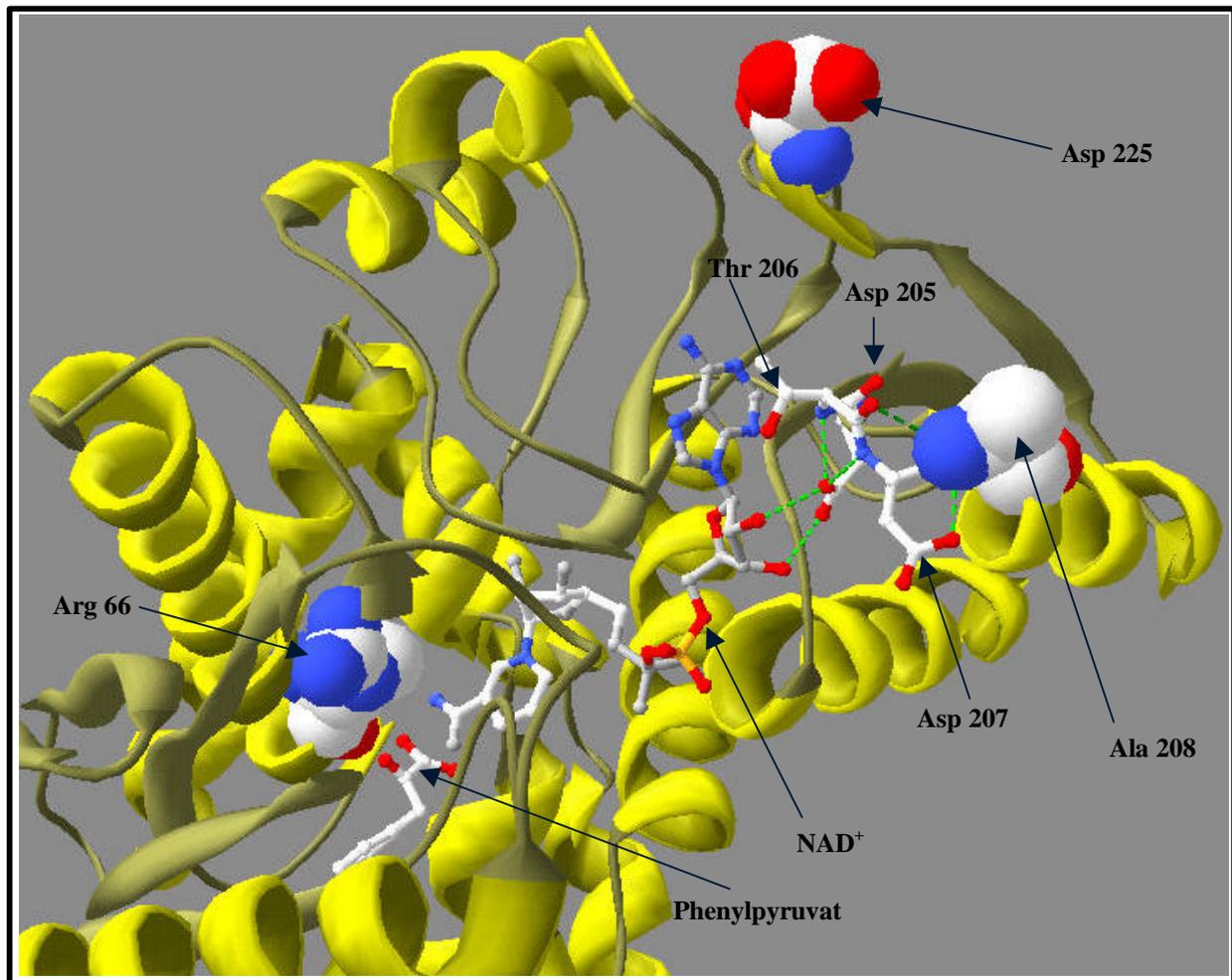


Abbildung 59: Dreidimensionale Struktur des K66R-8-Muteins. Gezeigt sind die durch die Mutagenese ausgetauschten Aminosäuren. Die Mutationen K66R, T208A und E225D sind hervorgehoben. Wasserstoffbindungen sind grün dargestellt.

Die Aminosäure Asparaginsäure, wurde durch Glutaminsäure mittels Zufallsmutagenese an Position 225 substituiert und zeigt keine Wechselwirkung mit dem Coenzym bzw. mit den am Coenzym bindenden Aminosäuren (Asp 205). Aus Abbildung 59 ist eine Wechselwirkung zwischen Ala 208 zum Asp 205 bzw. zum Asp 207 ersichtlich. An einer direkten Wechselwirkung zum Coenzym ist diese zweite Mutation T208A nicht beteiligt, dennoch geht sie eine Wasserstoffbindung mit Asparaginsäure 205 ein. Asp 205 zeigt eine Wasserstoffbindung zum Coenzym (Abbildung 59).

Die Modellierung der 3D-Struktur der Wt-PheDH zeigt eine Wasserstoffbindung zwischen Lysin 66 zur Carboxylgruppe des Substrates (Phenylpyruvat) (Abbildung 60a). Nach dem Austausch von Lysin 66 gegen Arginin konnte keine Wechselwirkung mehr festgestellt werden (Abbildung 60b).

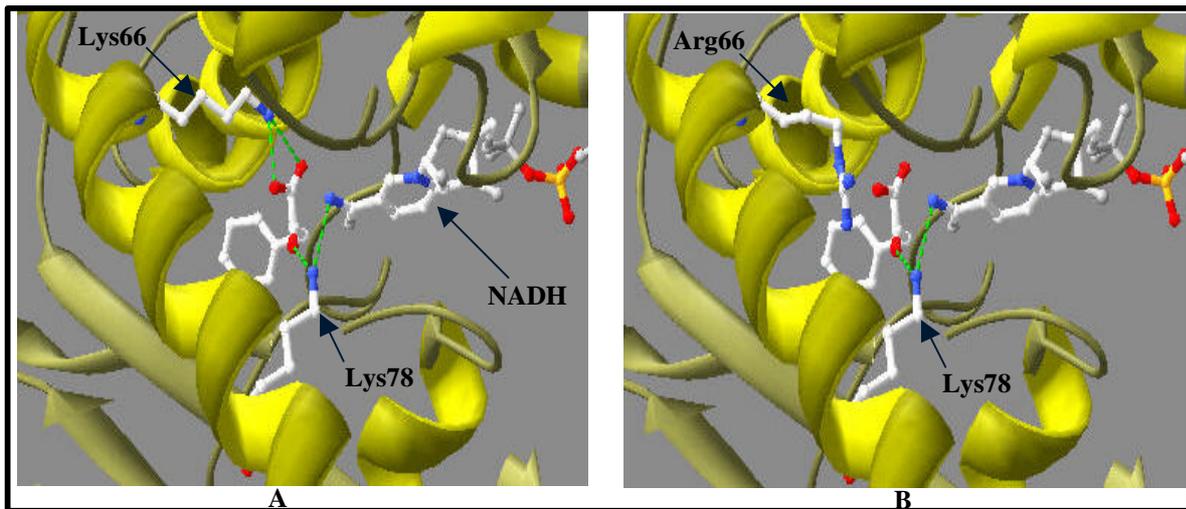


Abbildung 60: Das aktive Zentrum der PheDH und der Effekt des Lysin 66 durch den Austausch in Arginin. (A) Wechselwirkung zwischen Lysin 66 und der Carboxylgruppe des Substrates, (B) Arginin wird anders orientiert und geht keine Wechselwirkung mit der Carboxylgruppe des Substrates ein. Wasserstoffbindungen sind grün dargestellt.

5.8.2 Biochemische Charakterisierung des K66R-8-Muteins

Das neuhergestellte Mutein, das die drei o.g. Mutationen trägt, zeigt eine neue Aktivität von 13 U/ml gegen Phenylpyruvat, das zu Phenyllactat reduziert wird.

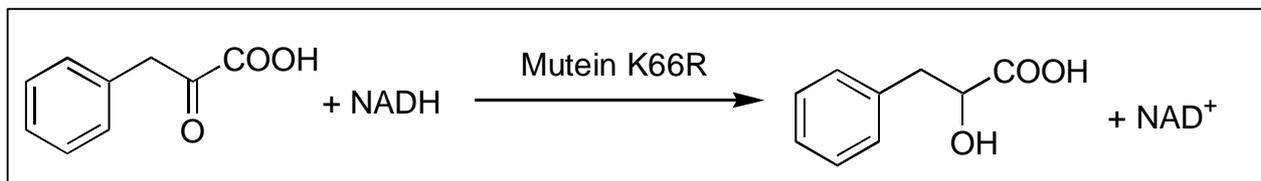


Abbildung 61: Reaktionsschema des K66R-8-Muteins.

Das breite Substratspektrum der PheDH aus *Rhodococcus* sp. M4 wurde bereits von Hummel et. al. (Hummel *et al.*, 1987) eingehend untersucht. Die Mutagenese des PheDH-Gens führte zur Erweiterung des Substratspektrums und zu einer Eigenschaftsveränderung hinsichtlich der Reduktion von Phenylpyruvat zu Phenyllactat. Von einigen Substraten (Tabelle 17) wurde hier der K_m -Wert bestimmt. Hierfür wurden partiell gereinigte Mutein-Extrakte eingesetzt.

Tabelle 17: Km-Werte des Muteins K66R-8. Untersucht wurde Phenylpyruvat sowohl bei einer reduktiven Aminierung als auch bei einer Reduktion ohne Ammoniumionen.

Substrat	Km (mM)	
	(WT-PheDH)	(K66R)
Phenylpyruvat (reduktive Aminierung)	0.13	0.17
Phenylalanin (oxidative Desaminierung)	0.87	0.7
Phenylpyruvat (Reduktion zum Phenyllactat)		18

Es wurde ebenso überprüft, ob die neuen Mutationen in der PheDH Einfluss auf die Temperatur- bzw. pH-Optima haben. Daher wurde der Aktivitätstest bei verschiedenen pH-Werten von 5-10 (Abbildung 62) und Temperaturen zwischen 20 und 50°C (Abbildung 63) durchgeführt. Dabei wurde ein Tris/HCl Puffer (100 mM) im Bereich von pH-Wert 7-10 mit NaOH bzw. HCl eingestellt. Für niedrige pH-Werte wurde der Puffer Glycyl-Glycin (100 mM) benutzt, da er eine größere Pufferkapazität besitzt.

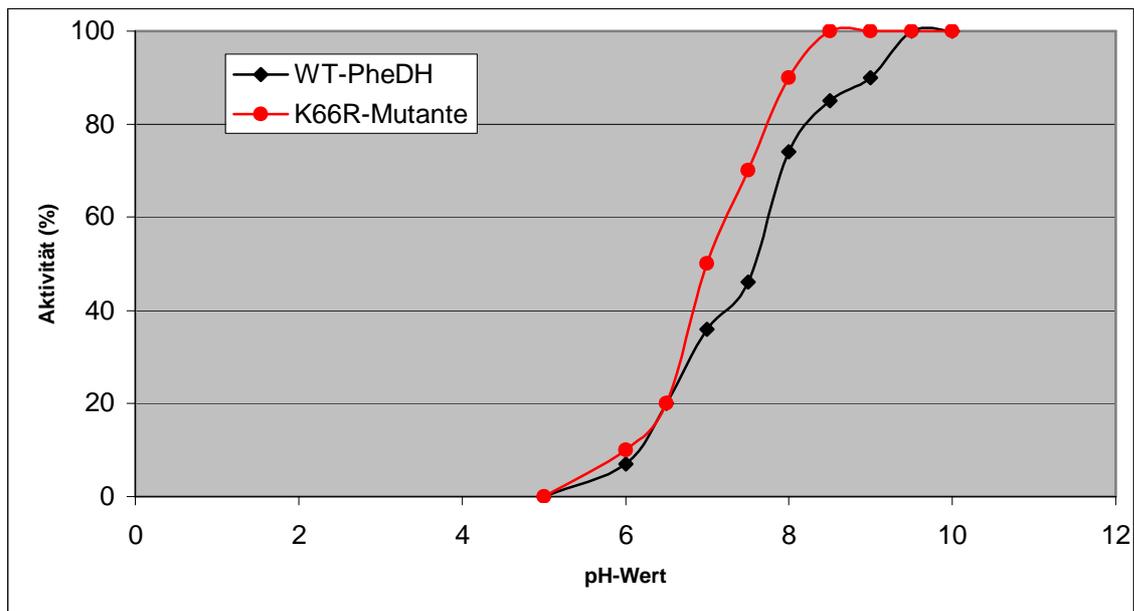


Abbildung 62: pH-Optimum des Muteins K66R-8 im Vergleich zur Wildtyp-PheDH. Der Aktivitätstest (Reduktion des Phenylpyruvats ohne Ammoniumionen) wurde bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 5 und pH 10 gemessen.

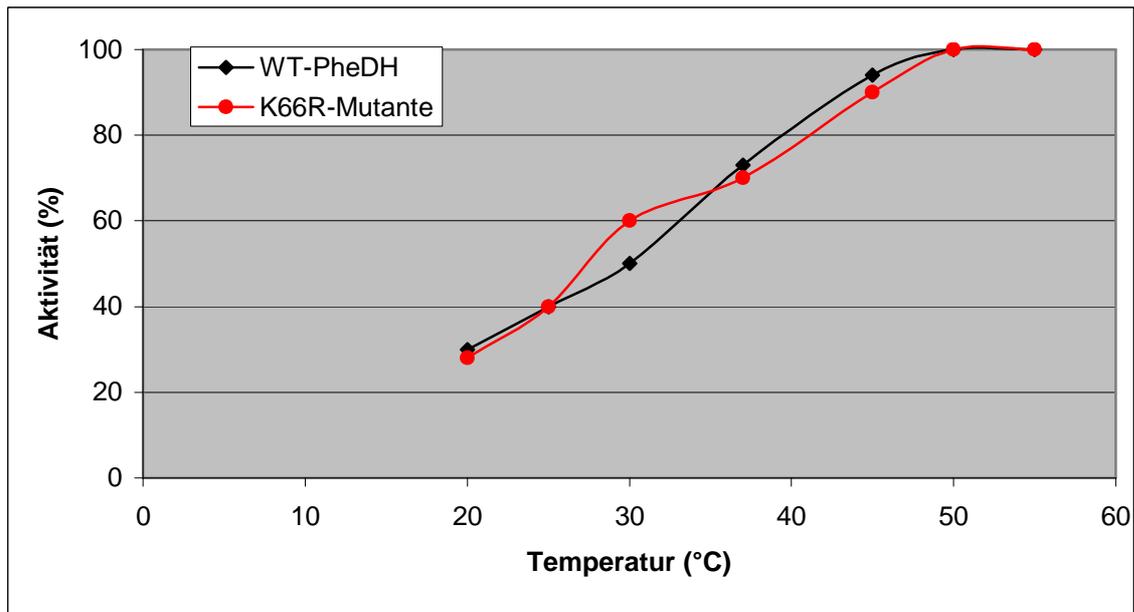


Abbildung 63: Temperaturoptimum des K66R-8-Muteins im Vergleich zur Wildtyp-PheDH. Die Ansätze enthielten Tris/HCl Puffer (100 mM pH 8.0 + Phenylpyruvat und NADH) wurden auf den jeweiligen Meßtemperaturen (25-50°C) in der Küvette temperiert und gemessen.

5.8.3 Synthese von Phenyllactat mit dem Mutein K66R-8

Mit den eingeführten 3 Mutationen wurde der Reaktionsmechanismus geändert, das Substratspektrum der PheDH erweitert und somit ein ähnlicher Mechanismus wie der der Lactat-Dehydrogenase, also eine Reduktion des Eduktes ohne Zusatz von Ammoniumionen erreicht. Für den Nachweis des gebildeten Produktes wurde eine Synthese mit gekoppelter Enzymreaktion unter Regeneration des Coenzym mit Formiat-Dehydrogenase durchgeführt. Eingesetzt wurden 30 mM Phenylpyruvat, 100 mM HEPES-Puffer, 100 mM Formiat, 2 mM NAD⁺, 2 mM Mg²⁺, 20U K66R-8 und 30U Formiat Dehydrogenase.

Das durch das Mutein K66R-8, das die 3 Mutationen K66R, T208A und E225D trägt, gebildete Produkt Phenyllactat wurde mittels GC-Analyse nachgewiesen.

Die ersten Ansätze zur Synthese wurden nach 2 h und nach 13 h gestoppt. Bei der GC-Analyse fiel auf, dass kein enantiomerenreines Phenyllactat hergestellt wurde. Nach 2h wurde ein ee-Wert von 82 % zu Gunsten von L-Phenyllactat gemessen (Abbildung 64a). Nach 13h Synthese wurde vollständige Racemisierung festgestellt (Abbildung 64b).

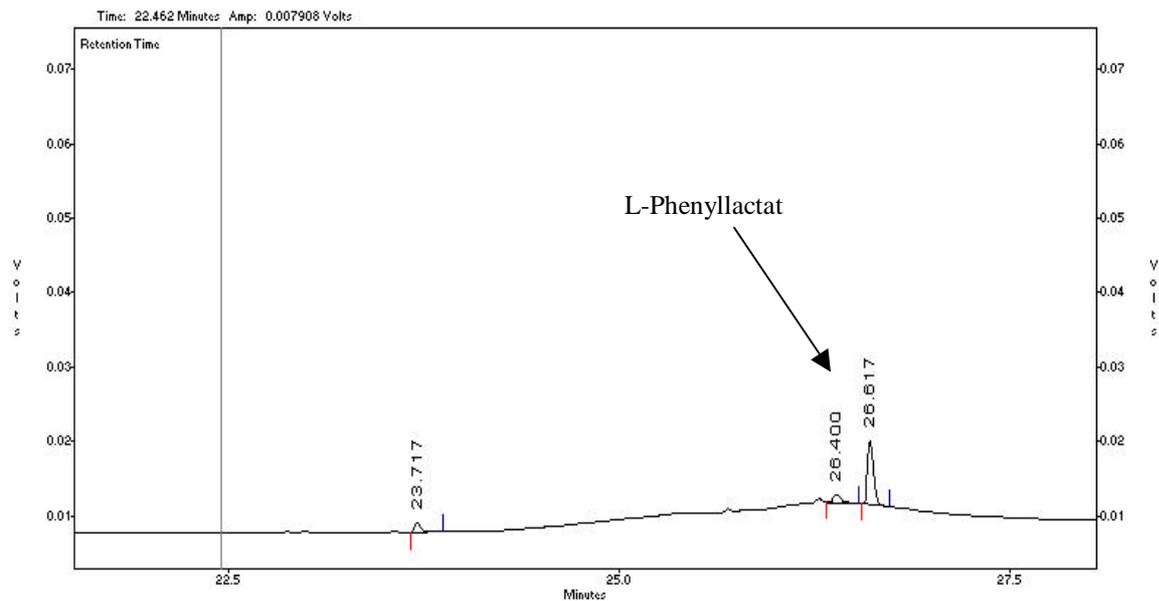


Abbildung 64a: GC-Chromatogramm des Syntheseansatzes der K66R-8 nach zweistündiger Inkubation. Eingesetzt wurden 30 mM Phenylpyruvat, 100 mM HEPES-Puffer, 100 mM Formiat, 2 mM NAD⁺, 2 mM MgCl₂, 20 U K66R-8 und 30 U Formiat Dehydrogenase.

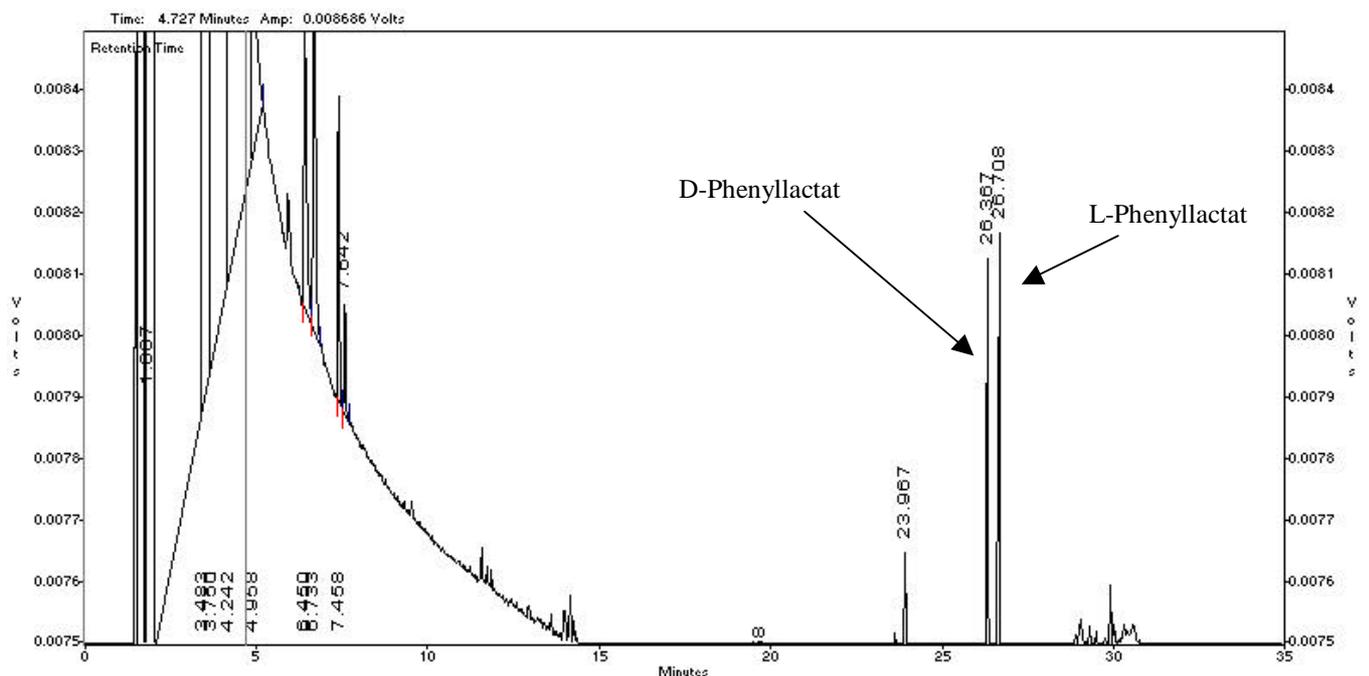


Abbildung 64b: GC-Chromatogramm des Syntheseansatzes der K66R-8 nach 13 h Inkubation.

Für die Bestimmung des Zeitpunktes der Racemisierung wurde ein weiterer Test mit zwischenzeitlicher Entnahme und GC-Analyse einer Probe aus der Umsetzung durchgeführt. In den ersten 4 Stunden der Umsetzung wurde L-Phenyllactat im Überschuss gebildet. Nach etwa 8 Stunden konnte die Bildung eines Racemats an D- bzw. L-Lactat beobachtet werden (Abbildung 65).

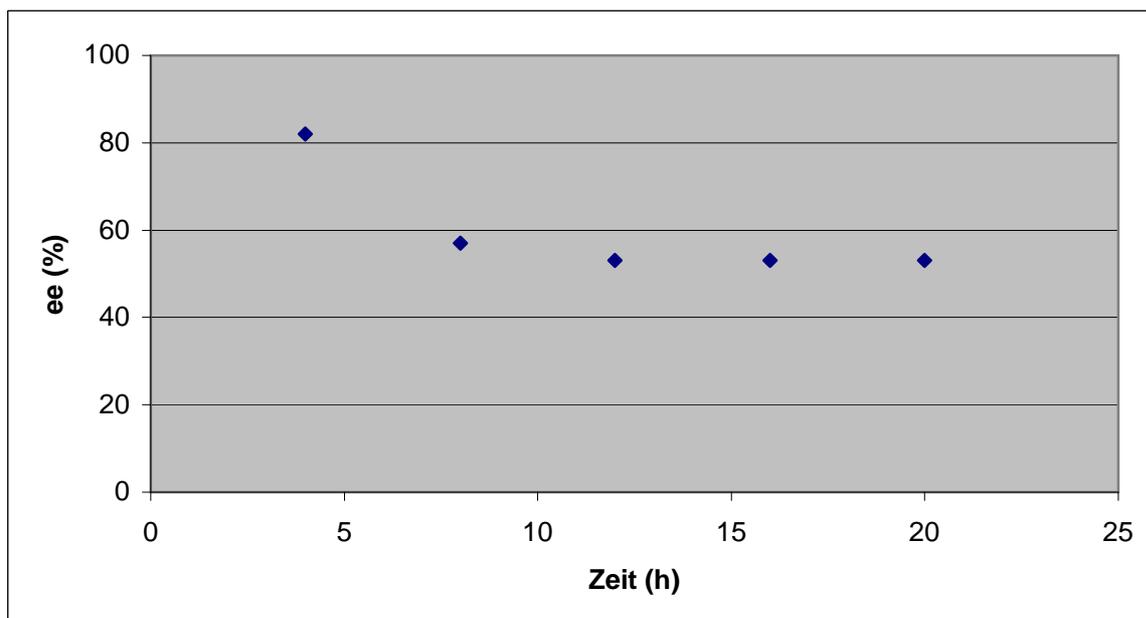


Abbildung 65: Einfluss der Mutationen K66R, T208A und E225D, auf die Enantioselectivität der Reduktion von Phenylpyruvat (30 mM) in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Ergebnisse deuteten auf eine Racemase. Um dies nachzuweisen wurde als Substrat 30mM L-Phenyllactat mit Rohextrakten aus sowohl *E. coli* JM105 als auch Mutein K6R-8 eingesetzt und die Reaktion über 20 h verfolgt. Dabei konnte keine Racemisierung des L-Phenyllactat zum D-Phenyllactat beobachtet werden.

Aufgrund der Ergebnisse bei der Umsetzung mit dem neuen Mutein K66R-8 und der schlechten Enantioselectivität wurden die 3 Mutationen genauer untersucht und eine gezielte Rückmutagenese durchgeführt. Dabei wurden die 3 Mutationen rückgängig gemacht und deren Einfluss auf Enantioselectivität und das Substratspektrums untersucht. In Tabelle 18 werden die verschiedenen Muteine verglichen und deren Einfluss auf die Aktivität erläutert.

Tabelle 18: Vergleich der Reaktionsmechanismen verschiedener Muteine. Die 3 Mutationen wurden einzeln rückgängig mutiert. Die drei Mutationen sind als Kombination für die neue Eigenschaft der PheDH verantwortlich. Die Substitution der einzelnen Mutationen in die ursprünglichen Codons der PheDH führte zum Verlust der LDH-Aktivität.

Mutein	PheDH-Aktivität (U/mg)	Phenyllactat-DH-Aktivität
R66K, T208A, E225D	70	-
K66R, A208T, E225D	63	-
K66R, T206A, D225E	82	-

Aus Tabelle 18 ist zu entnehmen, dass die drei Mutationen im Mutein K66R-8 als Kombination für die neue Aktivität der PheDH verantwortlich sind. Die Substitution der einzelnen Mutationen zu den ursprünglichen Codons der PheDH führte zum Verlust der LDH-Aktivität.

5.8.4 Austausch K66I

Neben der Mutante K66R ist eine weitere durch gezielte Mutagenese erzeugt worden, bei der das Lysin 66 gegen Isoleucin (K66I) ausgetauscht worden ist. Auch dieses Mutein ist als Template für eine Reihe ungerichteter Mutationen verwendet worden.

Mit diesem Template wurde eine Muteinbank von ca. 32000 Varianten konstruiert. Eine weitere Muteinbank wurde mit der wt-PheDH-DNA konstruiert und überprüft. Alle konstruierten Muteine wurden auf neue Aktivität gegen Phenylaceton mittels Schnelltest in Titerplatten überprüft.

Die neu konstruierten Muteine aus der K66I-Enzymvariantenbank zeigten keine neue Aktivität gegenüber Phenylaceton. Zusätzliche Mutationen zur K66I konnten die Akzeptanz des Phenylacetons als Substrat nicht positiv beeinflussen. Da das Hauptinteresse an der Umsetzung von Ketonen zu Aminen bestand, wurde die neukonstruierte Enzymbank nicht auf neue Eigenschaften gegen weitere Substrate überprüft. Es ist aber von Interesse, diese Enzymbank zum weiteren Screening zu verwenden und nach Muteinen für neue Umsetzungen zu suchen.

Etwa 60 % der Muteine aus der zweiten Enzymvariantenbank, die mit der wt-PheDH als Template hergestellt wurden, zeigten PheDH-Aktivität. Die Einführung der Mutationen in das PheDH-Gen hat keinen Einfluss auf die Enantioselektivität. Bei der Umsetzung von Phenylpyruvat (Abbildung 66) war der ee-Wert von dem der PheDH nicht zu unterscheiden und lag bei >99 %.

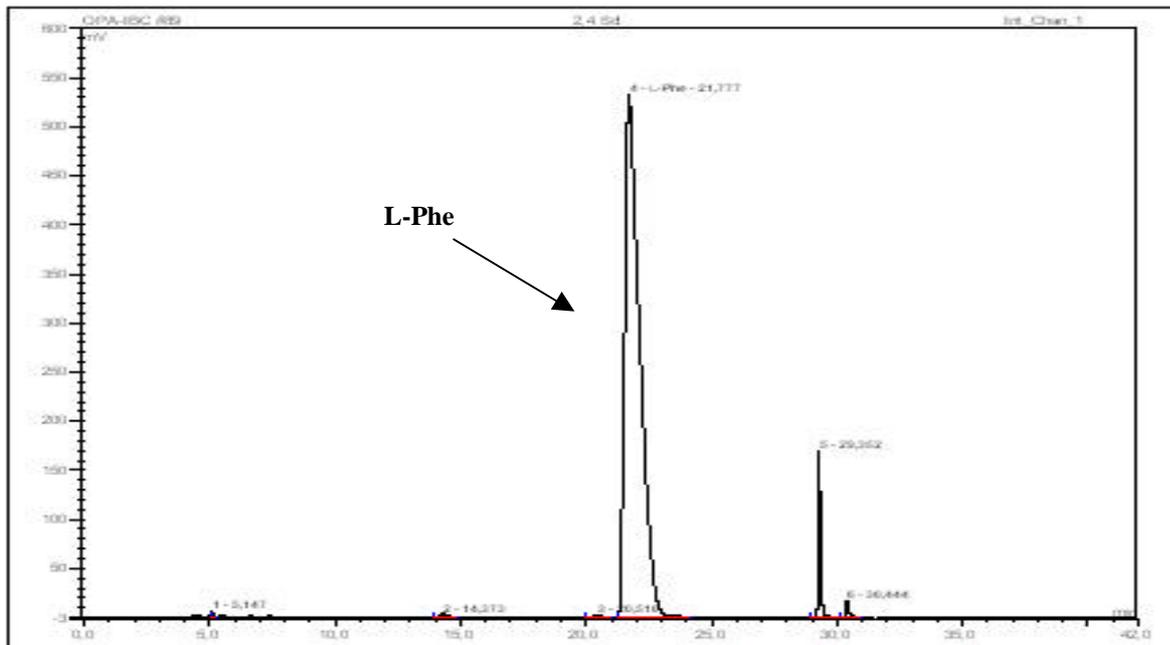


Abbildung 66: Produktnachweis nach einer 9 stündigen Umsetzung mit dem Mutein K66I. Zur Regenerierung des Coenzym NADH wurden 40 U Formiat Dehydrogenase eingesetzt. Die reduktive Aminierung erfolgte mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 30 mM Phenylpyruvat als Substrat. (L-Phe = 23 min; der Peak bei 29 min ist nicht identifiziert).

In allen untersuchten Muteinen waren keine neuen Aktivitäten bezüglich der Umsetzung von Phenylaceton nachweisbar. Diese neukonstruierte Enzybank wird in weiteren Arbeiten auf neue Eigenschaften und neue Umsetzungen von gewünschten Substraten Verwendung finden.

6 Diskussion

Klonierung und Expression der PheDH aus *Rhodococcus* sp. M4

Das Gen der Phenylalanin Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. M4 (Hummel *et al.*, 1987) ist wie die meisten Gene in Organismen der *Actinomyces*- Familie (*Corynebacteria*, *Mycobacteria*, und *Nocardia*) (Watts *et al.*, 2001) hoch GC-reich (Anteil: 65 %) . Das führte zur Bildung von Sekundärstrukturen (Choi *et al.*, 1999), was die Amplifizierung des PheDH-Gens mittels PCR erschwert. Durch Zugabe von DMSO (3%) und die Variation der Annealingtemperatur konnten Amplifikate gewonnen und kloniert werden. Die Klonierung führte anfänglich zur Bildung von „inclusion bodies“ (Hibino *et al.*, 1994). Der Versuch zur Vermeidung dieses Problems mittels Klonierungen in verschiedenen Vektoren, pTRC99a, pET16b, pET11a, führte nicht zur Expression eines aktiven Proteins. Das exprimierte Protein wurde mittels SDS-Gel-Elektrophorese als „inclusion bodies“ analysiert. Nach Literaturangaben könnten unlöslichen Proteine durch physikalische bzw. biochemische Methoden (Temperatur, Induktion, Schüttelgeschwindigkeit) (Shin *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1995) entfaltet werden, was aber bei der exprimierten PheDH nicht zu positiven Ergebnissen führte.

Unlösliche Proteine werden durch eine zu schnelle Expression gebildet (Camacho *et al.*, 2002), die den Proteinen nicht genügend Zeit und Raum zur Faltung lässt. Optimale Expression eines Enzyms erreicht man normalerweise, wenn das Startcodon des dazugehörigen Gens mit einem Abstand zwischen 7 und 9 bp von der Ribosomenbindungsstelle kloniert wird (Esipov *et al.*, 1999; Vellanoweth & Rabinowitz, 1992).

Da die Klonierung nach dieser Strategie zu inclusion bodies geführt hat, wurde die PheDH an der SmaI- Schnittstelle im Expressionsvektor pKK223-3 mit einer „nicht optimalen“ Entfernung von 14 bp des Startcodons zur Ribosomenbindungsstelle kloniert. Aufgrund dieses Abstandes konnte eine schwächere Translation erreicht werden, was zu einer langsameren und schwächeren Expression führte. Dem gebildeten Enzym bleibt dann genug Zeit und Raum zur Faltung und man erhält zwar weniger, dafür aber aktives Enzym. Zusätzlich dazu besitzt das verwendete Plasmid pKK223-3 einen schwächeren Promotor als beispielsweise die oben verwendeten pET-Systeme, was zu einer weiteren Abschwächung der Expression führt. Durch die Auswahl eines geeigneten Expressionsstammes *E. coli* JM105 konnte die Aktivität mit dem gleichen Plasmidkonstrukt auf das 3-fache im Vergleich zum *E.coli* -HB101 erhöht werden.

Die Charakterisierung zeigt eine stabile rekombinante PheDH, die nach 36 h bei 30°C noch etwa 95 % Restaktivität besitzt. Eine Denaturierung erfolgt erst bei höheren Temperaturen von 50°C. Nach 36 h konnten bei 37°C noch 90 % Restaktivität der rec-PheDH gemessen werden. Im Vergleich dazu zeigte die Wildtyp-PheDH nach 36 h bei 30°C nur noch etwa 50 % Restaktivität. Da die Sequenz der Wt-PheDH und die der rec-PheDH gleich sind, kann eine falsche Faltung des Proteins ausgeschlossen werden. Die schlechte Stabilität der PheDH im Wildtyp beruht wahrscheinlich auf vorhandenen Proteasen, die das Enzym nach Aufschluss der Zellen abbauen (De Mot *et al.*, 1998). Durch die Expression der PheDH aus *Rhodococcus* sp. M4 in *E. coli* -JM105 und somit der Vermeidung von PheDH-spezifischen Proteasen, konnte die Stabilität des Enzyms erhöht werden.

Die optimale Temperatur für eine Enzymreaktion liegt sowohl für die rec-PheDH als auch für WT-PheDH bei 50 °C, die Enzymtests und Synthesereaktionen wurden jedoch aus Stabilitätsgründen bei 30 °C durchgeführt.

In einer ersten Arbeit, in der das Vorkommen der PheDH *Rhodococcus* sp. M4 beschrieben wurde, ist eine partielle Reinigung für dieses Enzym bereits veröffentlicht worden (Hummel *et al.*, 1987). Die Reinigung der recPheDH aus *E. coli*- Rohextrakten erfolgte in Anlehnung an dieses Protokoll. Für die Reinigung bis zur Homogenität konnte allerdings ein zusätzlicher Reinigungsschritt zu den Literaturangaben durch eine Hitzedenaturierung der Begleitproteine in Gegenwart von 5 % (w/v) L-Phenylalanin eingefügt werden. Die Entfernung des L-Phenylalanins wurde mittels Gelfiltrationschromatographie durchgeführt.

Optimierung und Fermentation der PheDH

Neben der Auswahl eines geeigneten Vektor-Wirt-Systems wurden weitere Optimierungen, wie Induktionsparameter, variiert, um eine effiziente Proteinexpression zu erzielen. Einerseits wurde die Induktorkonzentration zwischen 0 und 3 mM IPTG (?-D-Isopropylthiogalaktosid) bei einem konstanten Induktionszeitpunkt ($OD_{600} = 0.6$) variiert. Die Untersuchung führte zu dem Ergebnis, dass mit einer IPTG-Konzentration von 0.7 mM eine optimale Expression zu erzielen war. In der Kontrollexpression ohne IPTG-Induktion konnte nur geringe PheDH-Aktivität (35 U/ml) im Rohextrakt nachgewiesen werden. Folglich unterdrückte der lac I-Repressor die Expression des PheDH-Gens im nicht induzierten Zustand fast vollständig (van den Bogaard *et al.*, 2000). Dies ist von Vorteil, da die Expression des Fremdproteins eine Belastung des Zellstoffwechsels bedeutet und zu einer erheblich geringeren Zellausbeute

führt. Eine hohe Konzentration an IPTG kann das Wachstum der Zellen hemmen (Rhee *et al.*, 1997).

Andererseits wurde der Zeitpunkt der Induktion nach Inokulation variiert, wobei alle Kulturen mit 1 mM IPTG induziert worden sind. Die Zellen wurden 24 h nach Inokulation geerntet und die spezifischen Aktivitäten in den zellfreien Rohextrakten bestimmt. Es zeigt sich, dass der Zeitpunkt der Induktion einen großen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat. Der Einfluss des Induktionszeitpunkts auf die Systemproduktivität wurde mittels zweier Experimente abgeschätzt, die die Zunahme der Volumenaktivität an PheDH nach Induktion am Anfang bzw. in der Mitte der Fütterungsphase bestimmten. Die Ergebnisse, die in Abbildung 21 dargestellt sind, wiesen daraufhin, dass, ähnlich zu Versuchen in Schüttelkultur, eine signifikante Abhängigkeit der recPheDH- Expression vom Induktionszeitpunkt besteht. Eine zu frühe Induktion kann die Zellen unter Stressfaktoren setzen, was zu einer Störung des Expressionsapparats führen kann (Donovan *et al.*, 2000). Eine Induktion in der stationären Phase, in der die Wachstums- und Sterberate gleich sind, kann nicht zu einer produktiven Expression führen.

Nach Riesenberg (Riesenberg, 1991) und Fieschko (Fieschko, 1989) erfolgt die Bildung von wachstumshemmender Nebenprodukte wie Acetat in komplexen Medien bei Wachstumsraten oberhalb von $0,2 \text{ h}^{-1}$ (Riesenberg *et al.*, 1991) und in definierten Medien bei Wachstumsrate oberhalb von $0,35 \text{ h}^{-1}$. Mit abnehmender spezifischer Wachstumsrate steigt die Expression des rekombinanten Proteins (Fieschko, 1989). Da in dieser Arbeit die Kultivierung in komplexen Medien erfolgte, war für die Kultivierung des Expressionsstammes JM105 eine spezifische Wachstumsrate von $0,2 \text{ h}^{-1}$ angebracht.

Die Form der Nährstoffzuführung war ein kritischer Parameter bei der HZD-Fermentation; dadurch kann sowohl die Zelldichte als auch Zellproduktivität beeinflusst werden (Lee, 1996). Möglich waren konstante als auch kontinuierliche Fütterungsraten. Konstante Fütterungsraten wurden für das Expressionssystem *E. coli* JM105 nicht in Erwägung gezogen, da dies nach Lee *et al.* zur Verminderung der Wachstumsrate führt (Lee, 1996) und damit zur Verminderung von Produktbildung des Expressionssystems führt (Riesenberg, 1991).

Die Wachstumsrate, Acetatbildung und End-Zelldichte wurden sowohl bei konstanter als auch linearer Zufütterungsrate untersucht. Nach Paalme *et al.* kann eine konstante Wachstumsrate durch eine exponentiell gesteigerte Zuführung der C-Quelle erreicht werden (Paalme *et al.*, 1997). Eine lineare Erhöhung der Nährstoffzuführung ist mit geringeren Schwankungen der Wachstumsrate verbunden (Yee & Blanch, 1992).

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass Acetat bei linearer Zuführung der C-Quelle ständig gebildet wurde und im Gegensatz hierzu kein Acetat bei exponentieller Zuführung nachweisbar war. Daher wurden weitere Experimente mit exponentieller Zuführung durchgeführt.

In der HZD-Fermentation wird zwar eine hohe Biomasse erzielt, dies wurde aber durch eine geringe spezifische Aktivität erkauft. Durch die Zugabe von Vitaminen, Spurenelementen und optimiertem Medium mit Nährstoffen können die Zellen schnell wachsen und eine hohe optische Dichte erreichen. Somit werden die Zellen aber unter Stress gesetzt, so dass die Expression nicht ideal verläuft, was sich auf die spezifische Aktivität niederschlägt.

Bei einer ersten Fermentation der PheDH im Batch war die spezifische Aktivität geringer als bei der Anzucht im Kolben. Der Grund für die schwächere Aktivität lag möglicherweise im späten Erntezeitpunkt, da die Lyse der Zellen zur Desaktivierung der Enzyme führen kann. Erwartet war eine bessere Aktivität als im Kolben aufgrund der besseren Sauerstoffversorgung sowie der pH-Regulierung.

Coexpression der PheDH und des malic enzymes

Das in dieser Arbeit klonierte NAD abhängige *E. coli* malic enzyme zeigt Ähnlichkeit im Molekulargewicht (50 kDa) zum malic enzyme aus *Bacillus stearothermophilus* (Kobayashi *et al.*, 1989), aber einen Unterschied zum NADP-abhängigen malic enzyme aus *E. coli* (62kDa) (Nakamura *et al.*, 1986). Da der C-Terminus des NAD-abhängigen malic enzymes aus *E. coli* zum Zeitpunkt der Klonierung nicht zugänglich war, wurde mit Hilfe des 5'-Forward Primers ein Einzelstrang amplifiziert. Mit der Gewinnung des Einzelstranges konnte eine zweite PCR durchgeführt und ein doppelsträngiges Fragment amplifiziert werden. Mit dieser vollkommen neuen Methode war das gesamte Gen amplifizierbar. Die Klonierung von Genen ist somit wesentlich schneller und vereinfacht. Schwierigkeiten bei dieser Methode haben sich in GC-reichen Sequenzen ergeben. Ein Vergleichsversuch mit der PheDH ist anfänglich gescheitert, dennoch konnte durch Zusatz von DMSO im PCR-Ansatz eine vollständige Amplifikation GC-reicher Sequenzen erreicht werden. Hier sollte beachtet werden, dass Einzelstränge nicht stabil sind und daher der Umgang mit Einzelsträngen schonend durchgeführt werden muß.

Für die Klonierung des malic enzymes 3' zur PheDH an der PstI- und HindIII-Schnittstelle war eine eigene Ribosomenbindungsstelle notwendig, da am C-Terminus der PheDH ein Stopcodon angehängt war. Somit konnte eine Expression beider Enzyme gleichzeitig

erfolgen. Interessant wäre, aus den zwei Enzymen (PheDH / malic enzyme) ein Fusionsprotein herzustellen. Dies kann durch die Deletion des Stopcodons am C-Terminus der PheDH sowie der Ribosomenbindungsstelle vor dem malic enzyme erreicht werden. Eine katalysierte Reaktion der PheDH kann theoretisch erfolgen, da das aktive Zentrum nicht am C-Terminus der PheDH liegt (Vanhooke *et al.*, 1999). Somit kann sowohl die Umsetzung des Substrates als auch die Regeneration des Coenzym im gleichen fusionierten Protein erfolgen. Da keine Kristallstruktur vom malic enzyme aus *E. coli* K12 vorliegt und noch nicht bekannt ist, wo das aktive Zentrum sich befindet, wäre eine erfolgreiche Umsetzung durch ein Fusionsprotein nur hypothetisch. Fraglich ist dabei auch, mit welcher Struktur die beiden Enzyme als Fusionsprotein exprimiert werden.

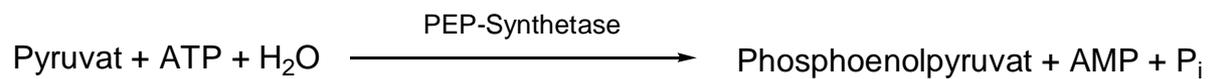
Die Aktivität beider rekombinanten Enzyme im *E. coli*- Stamm JM 105 ist höher als im HB101 und liegt bei 300 U/ml für malic enzyme und 400 U/ml für die PheDH. Die Aktivität des malic enzymes in diesem Konstrukt mit einer exprimierten PheDH ist eindeutig niedriger als ein homolog exprimiertes malic enzyme allein. Es liegt daran, dass der Haushalt an Aminosäuren während der Translation auf mehrere Enzymen verteilt ist, sodass in dem Fall weniger Enzymmenge hergestellt wird als wenn die Aminosäuren einem exprimierten Enzym allein zur Verfügung ständen.

Ganzzell-Umsetzung

Als neue Parameter, die bei ganzen Zellen berücksichtigt werden müssen, kommen jetzt allerdings Transportprozesse durch die Zellmembran hinzu (Andersen *et al.*, 2001; Sanden *et al.*, 2002). Ein Versuch zur Immobilisierung der Zellen mit CTAB, um sie durchlässig zu machen, führte nicht zu Steigerung des Umsatzes. Das liegt daran, dass eine Aufnahme des Substrates Phenylpyruvat ohne Immobilisierung der Zellwand möglich war. Die Überlegung, dass die Substrate Phenylpyruvat und Phenylalanin als C-Quelle metabolisiert werden könnten, hat sich nicht bestätigt. Es konnten zwar nach der Umsetzung nur 90% des erwarteten Produktes L-Phenylalanin festgestellt werden, das ist aber nicht unbedingt auf Metabolisierung zurückzuführen ist. Ursache könnten die Reaktionsbedingungen sein, da die Reaktion im Batch Ansatz durchgeführt wurde und das Produkt nicht der Reaktion entzogen worden ist.

Eine weitere Überlegung war, dass L-Malat über eine *E. coli* eigene Malat-Dehydrogenase metabolisiert wird. Aus diesem Grund wurde L-Malat im Überschuss zugegeben und somit dieses Problem vermieden. Im Vergleich zur Umsetzung mit isolierten Enzymen war es allerdings wahrscheinlich, dass Pyruvat, das durch die Umsetzung von L-Malat für die NADH

Regenerierung entsteht, als leicht verwertbare C-Verbindung in den Primärstoffwechsel einfließt und nicht mehr als störendes Nebenprodukt, wie bei der Verwendung isolierter Enzyme vorliegt. Bei *E. coli* und anderen Bakterien wird Pyruvat durch Phosphoenolpyruvat-Synthetase direkt phosphoryliert und fließt somit in den Stoffwechsel der Zellen ein (Geerse *et al.*, 1989).



Der Vorteil der Formiat Dehydrogenase, die sich bis dato für die Regenerierung des Coenzym NADH *in situ* durchgesetzt hat, liegt darin, dass bei der Regeneration durch Formiat nur CO₂ und keine weiteren Nebenprodukte entstehen (Schütte *et al.*, 1976). Da aber in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass das malic enzyme ein durchaus erfolgreiches System darstellt und im Ganzellsystem keine Nebenprodukte das gewünschte Produkt verunreinigen, könnten solche in dieser Arbeit entwickelten Konstrukte technisch und wirtschaftlich interessanter sein. Dazu kommt der wirtschaftliche Faktor, da L-Malat im Vergleich zum Na-Formiat vergleichbar kostengünstig ist. Ein weiterer wesentlicher Vorteil der Ganzellumsetzung liegt darin, dass auf die Präparation, möglicherweise Reinigung der Enzyme sowie den Zusatz an freiem Coenzym verzichtet werden kann.

Für eine gekoppelte Reaktion zweier Enzyme wurden bestimmte Parameter für die Stabilität der beiden Enzymen untersucht, um optimale Verhältnisse zu schaffen. Wichtige Faktoren sind das pH-Optimum sowie die Temperaturstabilität der beiden Enzyme. Zusätzlich zu der Stabilität der Enzyme spielen weitere Faktoren, wie z.B. der Einfluss der verschiedenen Substrate auf die Enzyme eine Rolle (Brunhuber *et al.*, 2000; Solovjeva & Kochetov, 1999). Die PheDH könnte durch Malat inhibiert werden bzw. malic enzyme durch das Phenylpyruvat. In Bezug auf diese Coexpression der Phenylalanin Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. M4 und des malic enzymes aus *E. coli* konnte keine Inhibierung festgestellt werden. Vor der Übertragung dieser Technik auf weitere Enzyme sollte aber eine Untersuchung bezüglich der Inhibierung durchgeführt werden.

Es wurde für einen wirtschaftlichen Einsatz der Ganzzell-Umsetzung untersucht, ob das malic enzyme durch D- Malat inhibiert wird. Eine Inhibierung war nicht festzustellen, daher ist es von wirtschaftlicher Bedeutung, das kostengünstigere racemische D,L- Malat für die Regenerierung des Coenzym einzusetzen.

Bei einer *in situ* Regenerierung führte der Zusatz an BSA zu einer Steigerung der Aktivität. Ebenso beeinflusste der Aufschluß-Puffer die Aktivitäten. Hierbei war zu beobachten, dass der geeignete Aufschluß-Puffer für die einzelnen Enzyme unterschiedlich war. Der Kpi-Puffer war für die PheDH besser geeignet als für das malic enzyme, da aber die Aktivitätsabnahme des malic enzyme im Kpi-Puffer nicht drastisch war, wurden die rekombinanten Zellen nach der heterologen Expression weiterhin im Kpi-Puffer aufgeschlossen.

Dieses Konstrukt mit dem malic enzyme als Regenerationssystem eröffnet neue Möglichkeiten für Coexpressionen mit weiteren Dehydrogenasen und damit Ganzzell-Umsetzungen von verschiedenen Substraten.

Entwicklung einer Screeningsmethode

Um das Screening der durch die Zufallsmutagenese hergestellten Enzymvarianten-Bibliothek ermöglichen zu können, sind geeignete und effektive Selektionsmechanismen notwendig. Mit geeigneten Methoden können die gewünschten Eigenschaften detektiert werden. Zahlreiche erfolgreiche Screeningsmethoden wurden bereits entwickelt. Beispielsweise wurden pH-Indikatoren auf Agarplatten eingesetzt, so dass beim Abbau des Substrates eine Abnahme des pH-Wertes stattfand und sich die Farbe des Indikators dadurch ändert (Zhou *et al.*, 1996). Da aber bei vielen Umsetzungen (unter anderem bei reduktiver Aminierung) die Änderung des pH-Wertes nicht detektierbar wäre und man auf die Isolierung des Enzyms für photometrische Tests angewiesen ist, wurde in dieser Arbeit eine effektivere Screeningsmethode für den direkten Nachweis der positiven Klone entwickelt. Die neue Methode beruht auf dem Farbumschlag von Tetrazolium. Die Reduktion von Tetrazolium führt zur Veränderung seines Absorptionsspektrums, was eine schnelle Detektierung positiver Kolonien ermöglicht. Für die Evaluierung dieser Methode, wurde Phenylalanin als Donor zur Reduktion des Coenzym NAD⁺ eingesetzt. Anfänglich haben sich alle Klone durch den Luftsauerstoff gefärbt. Die Vermeidung dieses Problems erfolgte durch die Überschichtung der Zellen mit Öl bzw. mit Agar. Dass die neue Methode nicht direkt für das Screening nach Muteinen, die Amin Dehydrogenase Aktivität zeigen, eingesetzt wurde, liegt am Mangel des einzusetzenden Substrates Phenylpropylamin. Phenylpropylamin ist nicht kommerziell erhältlich und seine Synthese noch nicht etabliert.

Diese neue Screeningsmethode ist zum Screening von Dehydrogenasen soweit optimiert und somit eine schnelle und effektive Methode.

Mutagenese

Die Klonierung der PheDH aus *Rhodococcus* sp. M4 war die Voraussetzung für die gezielte- bzw. Zufallsmutagenese, um neue Enzymvarianten für die Herstellung von Aminen und Hydroxysäuren zu konstruieren.

Zum Zeitpunkt der Planung der Mutagenese war die 3D-Struktur der Phenylalanin Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. M4 noch nicht aufgeklärt. Die PheDH sollte in dieser Arbeit zu diesem Zweck kristallisiert werden, aber gleichzeitig während der Vorbereitung zur Kristallisation der PheDH wurden auch einige Mutationen durchgeführt. Die Postulierung, dass die Bindungsstelle zur Carboxylgruppe des Substrates eine basische sein sollte, beruhte auf Literaturangaben zum Mechanismus (Clarke *et al.*, 1986; Pasquo *et al.*, 1998). Nach Literaturangaben kommen Arginin oder Lysin in Lactat Dehydrogenasen bzw. Aminosäuren Dehydrogenasen (Baker *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 1997) im aktiven Zentrum vor. Um die Akzeptanz einer Methylgruppe anstelle der Carboxylgruppe im Substrat zu ermöglichen, sollte daher eine basische Aminosäure in eine neutrale Aminosäure umgewandelt werden (Nicholls *et al.*, 1994). Da aber in der PheDH etwa zwanzig Arginine und fünf Lysine vorkommen, ist eine gezielte Mutagenese zur Erweiterung des Substratspektrums in diesem Falle nicht praktikabel und eine Zufallsmutagenese deutlich effektiver. Doch aus wissenschaftlichen Gründen wurden einige Versuche zur Substitution von Arginin in weitere neutrale Aminosäuren wie beispielsweise Isoleucin durchgeführt, um den Einfluss der Substitution von Arginin gegen neutrale Aminosäure zu untersuchen.

Zwei Muteine R210I und R140I wurden konstruiert und auf Aktivität untersucht.

Es wurde eine verminderte Expression und etwa 83 % Restaktivität der PheDH bei der Mutante R140I beobachtet. Durch diesen Austausch konnte die Proteinfaltung verlangsamt und dadurch ein proteolytischer Abbau begünstigt werden (Jiang *et al.*, 2001). Vereinfacht: Das Mutein ist für Proteasen angreifbarer. Die gewünschte Amin Dehydrogenase Aktivität gegenüber Phenylaceton war nicht nachzuweisen.

Keine Expression konnte bei der Mutante R210I festgestellt werden. Ein Grund dafür könnte die Ladung des Arginins sein. Da Arginin bei dem benutzten pH-Wert eine positive Ladung aufweist und dadurch Interaktionen mit anderen Aminosäuren hervorruft, kann ein Abstoßungseffekt bei Austausch gegen eine neutrale Aminosäure (Isoleucin) auftreten. Das Mutein PheDH-R210I hat durch diesen Austausch die ursprüngliche Aktivität der PheDH verloren, zeigt aber keine neue Amin Dehydrogenase- Aktivität.

Zu diesem Zeitpunkt wurde die Strukturaufklärung der PheDH durch Vanhooke (Vanhooke *et al.*, 1999) durchgeführt und die am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren bestimmt.

Anhand der 3D-Struktur-Daten konnte das Enzym mittels Computereinsatz modelliert und die Mutationen simuliert werden.

Dass es bei der PheDH nicht zu einem direkten Hydridtransfer auf die Ketogruppe kommen kann, liegt an der Entfernung zwischen dem C4 des Nicotinamidrings und C² des Phenylpyruvat, die mehr als 6 Å beträgt. Dieser Abstand kommt dadurch zustande, dass die Ketogruppe des Substrates eine Bindung zum Lysin 78 eingeht und somit das Substrat vom NADH weggezogen wird (Vanhooke *et al.*, 1999). Eine weitere Bindung zum Substrat wird durch Lysin 66 verursacht. Durch die Simulierung der Substitution dieser Aminosäuren mittels Computereinsatzes konnte festgestellt werden, dass durch den Austausch von Lysin 66 gegen Isoleucin bzw. gegen Arginin keine Wechselwirkung mehr zur Carboxylgruppe des Substrates stattfinden kann. Um die Akzeptanz von Ketonen, die dem Phenylpyruvat strukturähnlich sind, und deren Umsetzung zu Aminen zu ermöglichen, wurde Lysin 66 gegen die neutrale Aminosäure Isoleucin substituiert. Weitere Muteine, die sich im Mechanismus von der PheDH unterscheiden und einen direkten Hydridtransfer verursachen, wurden durch den Austausch von Lysin 66 zu Arginin und Lysin 78 gegen Isoleucin konstruiert.

Die Durchführung der einzelnen Substitutionen erfolgte nach dem Prinzip der überlappenden PCR „overlap extension“ (Ho *et al.*, 1989). Dafür wurde das in dieser Arbeit klonierte PheDH- Gen als Template verwendet. Die Ausbeute der Hybride mittels dieser Technologie war anfänglich sehr gering. Es ist aus dem Literatur (Ho *et al.*, 1989) zu entnehmen, dass man equimolare Mengen beider Fragmente einzusetzen hat, was aber in allen Fällen zu niedriger Ausbeute geführt hat. Das liegt daran, dass dadurch vier Fusionen entstehen können, wobei nur eine gewünscht ist. Daher erfolgte die Optimierung dieser Methode durch die Amplifikation der zur Hybridisierung gewünschten Einzelstränge aus den jeweiligen beiden Fragmenten, die dann in einer weiteren PCR eingesetzt wurden. Somit konnte die Ausbeute auf das 3 fache gesteigert werden.

Im Gegensatz zur Expression der rec-PheDH betrug der Anteil des Muteins K66R nur 10 % und der K78I etwa 4 % des löslichen Zellproteins, wobei bei der rec-PheDH etwa 13 % des löslichen Gesamtproteins nachzuweisen waren. Ein Grund dafür könnte eine schlechte, durch die Mutagenese verursachte, Proteinfaltung sein.

Eine Veränderung der PheDH durch den Austausch des Lysin 66 gegen Arginin führte nicht zur drastischen Abnahme der PheDH-Aktivität. Bei diesem Mutein K66R waren etwa 90 % der PheDH Aktivität noch nachweisbar. Die gewünschte Aktivität, ein direkter Hydridtransfer konnte durch diesen Austausch nicht erreicht werden. Das Lysin wurde zwar durch die Mutagenese gegen Arginin ausgetauscht, hat aber nicht zum gewünschten Mechanismus

geführt. Das deutet darauf hin, dass noch weitere Aminosäuren an dem gewünschten Mechanismus beteiligt sind und ebenso substituiert werden müssen.

Durch den Austausch der basischen Aminosäure Lysin gegen eine neutrale Aminosäure im Mutein K78I, ist die ursprüngliche PheDH- Aktivität verloren gegangen, da Isoleucin keine Wechselwirkung mit der Ketogruppe des Phenylpyruvats mehr eingeht und somit die reduktive Aminierung nicht mehr stattfinden kann. Ähnliche Mutation wurde durch Sekimoto et al. (Sekimoto *et al.*, 1994) bei der Leucin Dehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus* durchgeführt, wo Lysin 68 im aktiven Zentrum der LeuDH gegen Alanin bzw. Arginin ausgetauscht wurde. Dadurch verlor die LeuDH ihre Aktivität aufgrund fehlender Bindung zum Coenzym.

Trotz der erzielten Vermeidung der Wechselwirkung zwischen der Ketogruppe des Substrates und der Aminosäure und des dadurch bei der PheDH vorhandenen Abstands zwischen dem C4 des Nicotinamidrings und C² des Phenylpyruvats, konnte der gewünschte Reaktionsmechanismus und der direkte Hydridtransfer nicht erzielt werden. In diesem Fall spielen nicht nur die Ladung und die Größe der Aminosäuren für neue Umsetzungen eine Rolle, sondern auch die räumliche Struktur der PheDH, die wahrscheinlich durch Substitution einzelner Aminosäuren für eine Erweiterung des Substratspektrums nicht stark genug beeinflusst werden konnte. Da die räumliche Struktur ähnlicher Amin Dehydrogenasen, wie die gewünschte nicht bekannt ist, war es nicht möglich, eine Optimierung durch einen gezielten Aminosäureaustausch durchzuführen.

Die Muteine K66R und K66I wurden als Templates in der Zufallsmutagenese verwendet, wobei das K66R für die Herstellung von neuen Varianten mit Phenyllactat Dehydrogenase-Eigenschaften (Hydridtransfer), und das K66I zur Herstellung von Amin Dehydrogenase-Varianten vorgesehen waren. Da die vorhandenen Austausche theoretisch wirksam sein könnten, und an unbekannt Positionen weitere Aminosäureaustausche für eine Konformationsänderung notwendig sein könnten, war es durch Zufallsmutagenese möglich, weitere Mutationen an neuen Positionen einzuführen und gleichzeitig die Veränderung an Position 66 zu erhalten.

Die durch die „error prone“ Methode neukonstruierten Muteine - ca. 32000 Varianten aus der K66I-Template - zeigten keine neue Aktivität gegen Phenylacetone. Zusätzliche Mutationen zur K66I konnten die Akzeptanz des Phenylacetons als Substrat nicht positiv beeinflussen. Da das Hauptinteresse an der Umsetzung von Ketonen zu Aminen bestand, wurde die neukonstruierte Enzybank nicht besonders umfassend auf andere neue Eigenschaften gegen weitere Substrate überprüft. Es ist aber von Interesse, in zukünftigen Arbeiten diese

Enzymbank für weitere Screenings zu verwenden und nach Muteinen für neue Umsetzungen zu suchen.

Die Kombination aus zwei verschiedenen Methoden, sowohl der gezielten als auch der ungezielten Mutagenese, zeigte sich aber als Erfolgskonzept beim K66R- Template, und führte zu der gewünschten Aktivität. Das neu hergestellte Mutein trägt zwei Mutationen T208A, E225D zusätzlich zum K66R und setzt Phenylpyruvat zum Phenyllactat um.

Aufgrund der Ergebnisse bei der Umsetzung mit diesem neuen Mutein (K66R-8) und der schlechten Enantioselektivität wurden die drei Mutationen genauer untersucht und mittels gezielter Mutagenese einzeln zurück mutiert zu den ursprünglichen Codons der PheDH, um festzustellen, welche der o.g. drei Mutationen für die Enantioselektivität bzw. für die Erweiterung des Substratspektrums verantwortlich ist. Die Substitution der einzelnen Mutationen gegen die ursprünglichen Codons der PheDH führte zum Verlust der neuen LDH-Aktivität. Aufgrund dessen, sind die drei Mutationen in diesem Mutein (K66R-8) zusammen als Kombination für die neue Aktivität der PheDH verantwortlich.

Obwohl die zwei neuen Mutationen T208A und E225D nicht am aktiven Zentrum beteiligt sind, kam es zu Veränderung des PheDH- Mechanismus. Die Aminosäure Alanin wurde gegen Threonin an Position 208 ausgetauscht, so daß eine Wechselwirkung mit der benachbarten Asparaginsäure 205 möglich ist, die wiederum eine starke Wechselwirkung zum Coenzym besitzt. Die Substitution dieser Aminosäure zum ursprünglichen Threonin führte zum Verlust der neuen Eigenschaft, wobei Threonin keine Wechselwirkung zum Asp 205 eingeht.

Eine Suche in den Datenbanken Genbank, Swissprot und Blast-NCBI ergab eine hohe Homologie des K66R-8-Muteins mit der Lactat Dehydrogenase (LDH) aus *Bifidobacterium longum* (Iwata *et al.*, 1994). Wie aus dem Sequenzvergleich hervorgeht, zeigen das Mutein K66R-8 und die LDH aus *Bifidobacterium longum* eine hohe Homologie in den Sequenzen für die Bildung von charakteristischen Sekundärstrukturen (Abbildung 67). Zwei der drei eingeführten Mutationen, nämlich R 66 und A 208, findet man in der LDH aus *Bifidobacterium longum* wieder. An der Stelle der Asparaginsäure 225 in der K66R-8-Mutante kommt in der LDH allerdings ein Alanin vor.

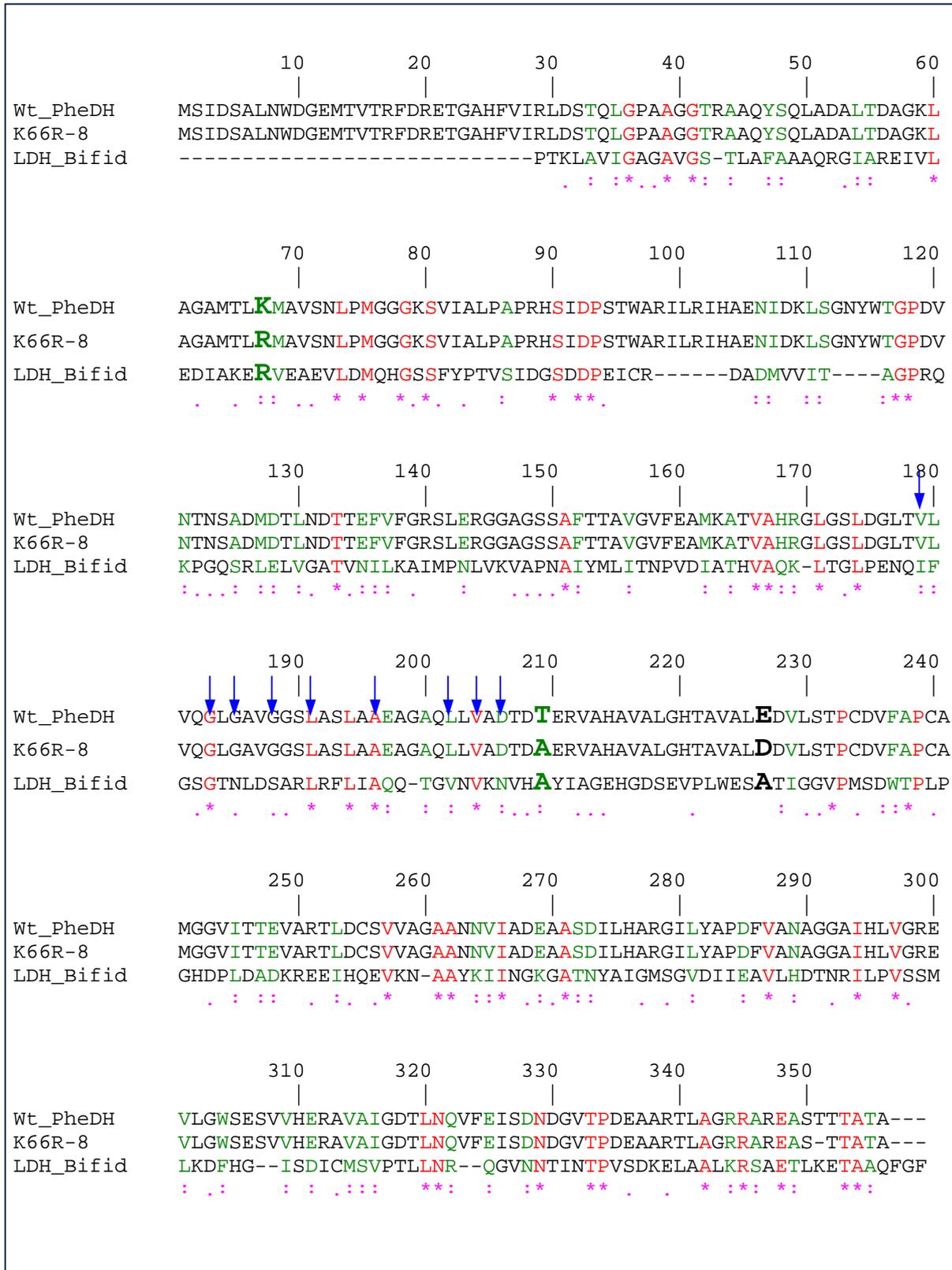


Abbildung 67: Alignment der Aminosäuresequenzen der Wt-PheDH aus *Rhodococcus* sp. M4 (Brunhuber *et al.*, 1994) mit der LDH aus *Bifidobacterium longum* (Iwata *et al.*, 1994) und der Mutante K66R-8. Rot: Identische Aminosäuren; grün: ähnliche Aminosäuren; Durch Fettdruck hervorgehoben: Mutationen; blaue Pfeile: wichtige Reste zur Bildung der Rossmann fold.

Nach Rossmann *et al.* besteht die nukleotidbindende Domäne selbst aus zwei gleichartigen Abschnitten, die sich im Verlauf der Evolution aus einem gemeinsamen Vorfahr entwickelt

haben. Die einzelnen Dehydrogenasen (LDH: Lactatdehydrogenase, GAPDH: Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, ADH: Alkoholdehydrogenase) unterscheiden sich durch ihre Substratspezifität. Die wiederum beruht auf der Verknüpfung der nukleotidbindenden Domänen mit zusätzlichen Abschnitten am C- oder N-terminalen Ende (Eventoff *et al.*, 1976; Ruzheinikov *et al.*, 2001). Alanin 208 ist nicht direkt an der „Rossmann fold“ beteiligt, liegt aber angrenzend dazu und geht eine Wechselwirkung mit Asparaginsäure 205 ein, die wiederum an der Rossmann fold beteiligt ist.

Dass die rückgängige Substitution der Mutation Asparaginsäure 225 zum Verlust der neuen Aktivität geführt hat, war nicht zu erklären, da die Position 225 nicht an einer Wechselwirkung zum Coenzym bzw. zu benachbarten Aminosäuren oder auch zum Substrat beteiligt ist.

Unerwarteterweise zeigen die HPLC-Chromatogramme des durch die Dreifach-Mutante gebildeten Phenyllactats, dass die Reduktion nicht stereoselektiv erfolgt. L-Phenyllactat wird zwar deutlich bevorzugt, aber nicht ausschließlich gebildet. Zusätzlich verändert sich der ee-Wert noch im Verlauf der weiteren Umsetzung bis hin zum Racemat. Die HPLC-Chromatogramme zeigen, dass diese nachträglich Veränderung des Enantiomerenverhältnisses wahrscheinlich durch einen sekundären Abbau des L-Phenyllactats durch eine *E. coli*-eigene Lactat-Dehydrogenase bedingt ist. Auffallend ist aber die schwache Stereoselektivität des neuen Muteins. Diese konnte nicht durch Variation der Mutationen verändert werden, da durch die Rücksubstitutionen gezeigt wurde, dass alle drei Mutationen eine Rolle für die neue Eigenschaft spielen und die Deletion bzw. Substitution zum Verlust der Aktivität führte. Eine Erklärung für die schwächere Stereoselektivität wäre, dass Arginin 66, das gegen Lysin ausgetauscht wurde und im Gegensatz zum Lysin keine Wechselwirkung zur Carboxylgruppe im Substrat hat, dafür verantwortlich sein könnte. Durch die Bindung von Lysin 66 zur Carboxylgruppe im Substrat konnte ursprünglich das Substrat fixiert werden und in der richtigen Orientierung in der Reaktion umgesetzt werden. Da aber im neuen Mutein die Carboxylgruppe nicht mehr an Arginin bindet, könnte eine Reduktion nicht enantioselektiv erfolgen.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei NAD-abhängige Enzyme, Phenylalanin Dehydrogenase (PheDH) aus *Rhodococcus* sp M4 und das malic enzyme aus *E. coli* K12 im gleichen Expressionsvektor kloniert und deren Coexpression durchgeführt. Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die Mutagenese der Phenylalanin Dehydrogenase, die sowohl mittels Protein Design als auch durch Zufallsmutagenese (“directed evolution”) durchgeführt wurde. Die Mutagenese diente zur Erweiterung des Substratspektrums der PheDH und um Einblicke in deren Reaktionsmechanismus sowie Aufschluss über die Struktur – Funktionsbeziehungen dieses Enzyms zu gewinnen.

Die Coexpression der PheDH und des malic enzymes diente der Ganzzellbiotransformation zur reduktiven Aminierung von aromatischen Ketosäuren. Somit können Ketosäuren umgesetzt und eine gleichzeitige Regenerierung des Coenzym NADH mittels malic enzyme durchgeführt werden.

Durch die Entwicklung einer neuen Klonierungsstrategie konnte das malic enzyme erfolgreich amplifiziert, 3' zur PheDH an der PstI- und HindIII- Schnittstelle kloniert und eine Coexpression beider Enzyme ermöglicht werden. Mithilfe des bekannten N-Terminus des malic enzymes konnten Einzelstränge amplifiziert und in weiteren PCR-Ansätze komplementär verlängert werden.

Die PheDH und das malic enzyme wurden biochemisch umfassend charakterisiert und das neue Plasmid-Konstrukt in *E. coli* JM105 für eine Ganzzellbiotransformation zur reduktiven Aminierung von aromatischen Ketosäuren erfolgreich eingesetzt. Neben der Auswahl eines geeigneten Vektor-Wirt-Systems wurden weitere Optimierungen, beispielsweise Induktionsparameter, variiert, um eine effiziente Proteinexpression zu erzielen. Eine Hochzelldichte-Fermentation führte zwar zu hoher Biomasse, dies wurde aber durch geringere spezifische Aktivitäten erkauft.

Der Vorteil der Formiat Dehydrogenase, die sich bis dato für die Regenerierung des Coenzym NADH *in situ* durchgesetzt hat, liegt darin, dass bei der Regeneration durch Formiat nur CO₂ und keine weiteren Nebenprodukte entstehen. Da aber in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass das malic enzyme ein durchaus erfolgreiches System darstellt und im Ganzellsystem keine Nebenprodukte das gewünschte Produkt verunreinigen, könnten solche in dieser Arbeit entwickelten Konstrukte technisch und wirtschaftlich interessanter sein. Das L- Malat ist im Vergleich zum Na-Formiat vergleichbar kostengünstig. Ein weiterer wesentlicher Vorteil der Ganzzellumsetzung liegt darin, dass auf die Präparation, möglicherweise Reinigung der Enzyme sowie den Zusatz an freiem Coenzym verzichtet werden kann.

Zur Erweiterung des Substratspektrums der Phenylalanin Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp M4, wurde die aufgeklärte Kristallstruktur mittels Computereinsatz modelliert und die am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren genauer für die Planung der Mutagenese untersucht. Lysin 66 ist die Bindungsstelle zur Carboxylgruppe im Substrat (Phenylpyruvat bzw. Phenylalanin). Für die Akzeptanz von Methylgruppen in Ketonen wurde der Austausch des basischen Lysins 66 gegen eine neutrale Aminosäure mittels gezielter Mutagenese postuliert. Eine weitere Überlegung betraf die Änderung des Reaktionsmechanismus der PheDH von einer reduktiven Aminierung zu einer Reduktion vom Typ einer Lactat Dehydrogenase. Hierbei wurden Strukturen von Lactat-Dehydrogenasen verglichen und Arginin als eine charakteristische Bindungsstelle zu Carboxylgruppe identifiziert, das dann an der Stelle von Lysin 66 in der PheDH eingeführt worden ist.

Beide Versuche führten mittels gezielter Mutagenese zu negativen Ergebnissen. Durch den Austausch der basischen Aminosäure Lysin 66 gegen das neutrale Isoleucin, verlor die PheDH ihre ursprüngliche Aktivität. Beim zweiten Versuch, die Mutation des Lysin 66 gegen Arginin und somit die Konstruktion einer Phenyllactat Dehydrogenase zu ermöglichen, ist die PheDH-Aktivität aufgrund des Austausches einer basischen Aminosäure gegen eine basische Aminosäure erhalten geblieben.

Für die Erweiterung des Substratspektrums war eine Änderung der Ladung im Falle K66I nicht ausreichend. Daher wurden beide Mutanten, K66I und K66R, als Template in der Zufallsmutagenese („directed evolution“) eingesetzt. Durch eine Zufallsmutagenese mittels Variation der Konzentration an $MgCl_2$ bzw. $MnCl_2$ und dNTPs, konnte eine große Bank an Enzymvarianten mit unterschiedlichen Mutationen hergestellt werden. Ein Screening nach der gewünschten Phenyllactat Dehydrogenase erfolgte sowohl mittels einem in dieser Arbeit entwickelten Verfahren als auch photometrisch durch die Absorption des Coenzym NADH.

Sieben Mutanten aus ca. 20.000 Varianten zeigten Phenyllactat Dehydrogenase Aktivität wobei nur die aktivste Mutante näher untersucht und zwei Mutationen T208A und E225D zusätzlich zum K66R festgestellt wurden.

Die Kombination aus zwei verschiedenen Methoden, sowohl der gezielten als auch der ungezielten Mutagenese, zeigte sich an diesem Beispiel als Erfolgskonzept und kann bei zukünftigen Arbeiten in Betracht gezogen werden.

DNA-Sequenz der Phenylalanin Dehydrogenase aus *Rhodococcus sp. M4*

```
1   ATGAGTATCG ACAGCGCACT GAACTGGGAC GGGGAAATGA CGGTCACCCG ATTCGACCGG
61  GAGACTGGTG CCCATTTTCGT CATTGACTC GATTGACCC AACTCGGACC GGCGGCCGGA
121 GGCACCAGAG CCGCACAGTA CTCACAGCTG GCGGACGCC TCACCGACGC CGGCAAATTG
181 GCGGGGGCGA TGACGTTGAA GATGGCAGTG AGCAACCTTC CGATGGGCGG GGGCAAATCC
241 GTCATTGCGC TTCCTGCGCC GCGTCATTCC ATCGATCCGA GCACGTGGGC ACGCATCCTC
301 CGAATCCACG CCGAGAACAT CGACAAGTTG TCCGGCAACT ACTGGACCGG ACCGGACGTC
361 AACACCAATT CGGCAGACAT GGATACTCTG AACGACACCA CCGAGTTCGT GTTCGGACGG
421 TCGCTCGAAC GCGGCGGCGC GGGTTCGAGC GCGTTCACCA CCGCCGTTGG CGTGTTGAG
481 GCGATGAAGG CGACCGTCGC GCACCGTGGG CTGGGCTCAC TCGACGGTTT GACGGTCCTG
541 GTCCAAGGAC TGGGGGCAGT CCGAGGATCA TTGGCATCCC TGGCCGCCGA AGCGGGTGCG
601 CAACTCCTGG TGGCAGACAC CGACACCGAG CGAGTAGCGC ACGCTGTTGC GTTGGGCCAC
661 ACAGCGGTTG CCCTCGAGGA CGTTCGTGTC ACCCCGTGTG ATGTCTTCGC ACCCTGCGCA
721 ATGGGCGGCG TCATCACCAC CGAGGTGGCG CGAACACTCG ACTGTTCCGT CGTGGCCGGT
781 GCCGCCAACA ACGTCATCGC CGACGAGGCC GCCTCGGACA TCCTGCACGC ACGCGGAATT
841 CTGTACGCTC CCGACTTCGT GGCCAACGCC GGCGGTGCCA TCCACCTCGT AGGCCGGGAG
901 GTTCTCGGTT GGTCCGAGTC GGTGTGCCAC GAACGAGCAG TTGCCATAGG CGACACCCTG
961 AATCAGGTCT TCGAGATCTC CGACAACGAC GCGGTCACCC CGGACGAGGC CGCCCGCACT
1021 CTCGCTGGAC GCGCGCCCCG CGAGGCCTCG ACAACGACAG CGACTGCCTA GTAG
```

DNA-Sequenz des malic enzymes aus *E.coli* K12

```
1 ATGGATATTC AAAAAAGAGT GAGTGACATG GAACCAAAAA CAAAAAACA GCGTTCGCTT
61 TATATCCCTT ACGCTGGCCC TGTACTGCTG GAATTTCCGT TGTTGAATAA AGGCAGTGCC
121 TTCAGCATGG AAGAACGCCG TAACTTCAAC CTGCTGGGGT TACTGCCGGA AGTGGTCGAA
181 ACCATCGAAG AACAAGCGGA ACGAGCATGG ATCCAGTATC AGGGATTCAA AACCGAAATC
241 GACAAACACA TCTACCTGCG TAACATCCAG GACACTAACG AAACCCTCTT CTACCGTCTG
301 GTAAACAATC ATCTTGATGA GATGATGCCT GTTATTTATA CCCCAACCGT CGGCGCAGCC
361 TGTGAGCGTT TTTCTGAGAT CTACCGCCGT TCACGCGGCG TGTTTATCTC TTACCAGAAC
421 CGGCACAATA TGGACGATAT TCTGCAAAAC GTGCCGAACC ATAATATTAA AGTGATTGTG
481 GTGACTGACG GTGAACGCAT TCTGGGGCTT GGTGACCAGG GCATCGGCGG GATGGGCATT
541 CCGATCGGTA AACTGTCGCT CTATAACGCC TGTGGCGGCA TCAGCCCGGC GTATACCCCTT
601 CCGGTGGTGC TGGATGTGCG AACGAACAAC CAACAGCTGC TTAACGATCC GCTGTATATG
661 GGCTGGCGTA ATCCGCGTAT CACTGACGAC GAATACTATG AATTTCGTTGA TGAATTTATC
721 CAGGCTGTGA AACAACGCTG GCCAGACGTG CTGTTGCAGT TTGAAGACTT TGCTCAAAAA
781 AATGCGATGC CGTTRACTTAA CCGCTATCGC AATGAAATTT GTTCTTTTAA CGATGACATT
841 CAGGGCACTG CGGCGGTAAAC AGTCGGCACA CTGATCGCAG CAAGCCGCGC GGCAGGTGGT
901 CAGTTAAGCG AGAAAAAAT CGTCTTCCTT GGCGCAGGTT CAGCGGGATG CGGCATTGCC
961 GAAATGATCA TCTCCAGAC CCAGCGGAA GGATTAAGCG AGGAAGCGGC GCGGCAGAAA
1021 GTCTTTATGG TCGATCGCTT TGGCTTGCTG ACTGACAAGA TGCCGAACCT GCTGCCTTTC
1081 CAGACCAAAC TGGTGCAGAA GCGCGAAAAC CTCAGTGACT GGGATAACCGA CAGCGATGTG
1141 CTGTCACTGC TGGATGTGGT GCGCAATGTA AAACCAGATA TTCTGATTGG CGTCTCAGGA
1201 CAGACCGGGC TGTTTACGGA AGAGATCATC CGTGAGATGC ATAAACACTG TCCGCGTCCG
1261 ATCGTGATGC CGCTGTCTAA CCCGACGTCA CGCGTGGAAG CCACACCGCA GGACATTATC
1321 GCCTGGACCG AAGGTAACGC GCTGGTCGCC ACGGGCAGCC CGTTTAATCC AGTGGTATGG
1381 AAAGATAAAA TCTACCCTAT CGCCCAGTGT AACAACGCCT TTATTTTCCC GGGCATCGGC
1441 CTGGGTGTTA TTGCTTCCGG CGCGTCACGT ATCACCGATG AGATGCTGAT GTCGGCAAGT
1501 GAAACGCTGG CGCAGTATTC ACCATTGGTG CTGAACGGCG AAGGTATGGT ACTGCCGAA
1561 CTGAAAGATA TTCAGAAAGT CTCCC GCGCA ATTGCGTTTG CGGTTGGCAA AATGGCGCAG
1621 CAGCAAGGCG TGGCGGTGAA AACCTCTGCC GAAGCCCTGC AACAGGCCAT TGACGATAAT
1681 TTCTGGCAAG CCGAATACCG CGACTACCGC CGTACCTCCA TCTAA
```

8 Literaturverzeichnis

- Abrams W. B., Davies R. O., and Ferguson R. K. (1984). Overview: the role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiovascular therapy. *Fed Proc* **43**: 1314-21.
- Andersen D. C., Swartz J., Ryll T., Lin N., and Snedecor B. (2001). Metabolic oscillations in an E. coli fermentation. *Biotechnol Bioeng* **75**: 212-8.
- Arnold F. H., and Moore J. C. (1997). Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **58**: 1-14.
- Asano Y., Nakazawa A., and Endo K. (1987). Novel phenylalanine dehydrogenases from *Sporosarcina ureae* and *Bacillus sphaericus*. Purification and characterization. *J Biol Chem* **262**: 10346-54.
- Babbitt P. C., West B. L., Buechter D. D., Kuntz I. D., and Kenyon G. L. (1990). Removal of a proteolytic activity associated with aggregates formed from expression of creatine kinase in *Escherichia coli* leads to improved recovery of active enzyme. *Biotechnology (N Y)* **8**: 945-9.
- Bagchi S., Wise L. S., Brown M. L., Bregman D., Sul H. S., and Rubin C. S. (1987). Structure and expression of murine malic enzyme mRNA. Differentiation-dependent accumulation of two forms of malic enzyme mRNA in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* **262**: 1558-65.
- Baker P. J., Turnbull A. P., Sedelnikova S. E., Stillman T. J., and Rice D. W. (1995). A role for quaternary structure in the substrate specificity of leucine dehydrogenase. *Structure* **3**: 693-705.
- Baker P. J., Waugh M. L., Wang X. G., Stillman T. J., Turnbull A. P., Engel P. C., and Rice D. W. (1997). Determinants of substrate specificity in the superfamily of amino acid dehydrogenases. *Biochemistry* **36**: 16109-15.
- Balbas P., and Bolivar F. (1990). Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **185**: 14-37.
- Bentley J., Hyatt L. S., Ainley K., Parish J. H., Herbert R. B., and White G. R. (1993). Cloning and sequence analysis of an *Escherichia coli* gene conferring bicyclomycin resistance. *Gene* **127**: 117-20.
- Bergter F. (1983). Wachstum von Microorganismen. *Verlag Chemie, Weinheim*.
- Birnboim H. C., and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-23.
- Blattner F. R., Plunkett G., 3rd, Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Davis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., and Shao Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-74.
- Blum H., Beier H., and Gross H. J. (1987). Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Bommarius A. S., and Drauz K. (1994). An enzymatic route to L-ornithine from arginine-activation, selectivity and stabilization of L-arginase. *Bioorg Med Chem* **2**: 617-26.
- Bommarius A. S., Schwarm M., Stingl K., Kottenhahn M., Huthmacher K., and Drauz K. (1995). Synthesis and use of enantiomerically pure tert-Leucine. *Tetr. Asymm* **6**: 2841-2888.

- Bornscheuer U. T., Altenbuchner J., and Meyer H. H. (1998). Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones. *Biotechnol Bioeng* **58**: 554-9.
- Bornscheuer U. T., Altenbuchner J., and Meyer H. H. (1999). Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. *Bioorg Med Chem* **7**: 2169-73.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brunhuber N. M., Banerjee A., Jacobs W. R., Jr., and Blanchard J. S. (1994). Cloning, sequencing, and expression of Rhodococcus L-phenylalanine dehydrogenase. Sequence comparisons to amino-acid dehydrogenases. *J Biol Chem* **269**: 16203-11.
- Brunhuber N. M., Thoden J. B., Blanchard J. S., and Vanhooke J. L. (2000). Rhodococcus L-phenylalanine dehydrogenase: kinetics, mechanism, and structural basis for catalytic specificity. *Biochemistry* **39**: 9174-87.
- Bryan P. N., Rollence M. L., Pantoliano M. W., Wood J., Finzel B. C., Gilliland G. L., Howard A. J., and Poulos T. L. (1986). Proteases of enhanced stability: characterization of a thermostable variant of subtilisin. *Proteins* **1**: 326-34.
- Bursch J., Johs R., and Heintzen P. (1970). [Studies on the validity of the Lambert-Beer law in the x-ray measurement of contrast media density]. *Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed* **112**: 259-66.
- Camacho M., Rodriguez-Arnedo A., and Bonete M. J. (2002). NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*: cloning, sequence determination and overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 155-60.
- Carrea G., Ottolina G., Pasta P., and Riva S. (1996). Synthetic applications of NAD(P)(H)-dependent enzymes. *Ann N Y Acad Sci* **799**: 642-9.
- Centerwall S. A., and Centerwall W. R. (2000). The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Pediatrics* **105**: 89-103.
- Choi J. S., Kim J. S., Joe C. O., Kim S., Ha K. S., and Park Y. M. (1999). Improved cycle sequencing of GC-rich DNA template. *Exp Mol Med* **31**: 20-4.
- Clarke A. R., Wigley D. B., Chia W. N., Barstow D., Atkinson T., and Holbrook J. J. (1986). Site-directed mutagenesis reveals role of mobile arginine residue in lactate dehydrogenase catalysis. *Nature* **324**: 699-702.
- Cunningham B. C., and Wells J. A. (1987). Improvement in the alkaline stability of subtilisin using an efficient random mutagenesis and screening procedure. *Protein Eng* **1**: 319-25.
- de Boer L., van Rijssel M., Euvernik G. J., and Dijkhuizen a. L. (1989). Purification, characterization and regulation of a monomeric L-phenylalanine dehydrogenase from the facultative methylotroph *Nocardia* sp. 239. *Arch Microbiol* **153**: 12-18.
- De Mot R., Nagy I., and Baumeister W. (1998). A self-compartmentalizing protease in Rhodococcus: the 20S proteasome. *Antonie Van Leeuwenhoek* **74**: 83-7.
- DelVecchio V. G., Kapatral V., Redkar R. J., Patra G., Mujer C., Los T., Ivanova N., Anderson I., Bhattacharyya A., Lykidis A., Reznik G., Jablonski L., Larsen N., D'Souza M., Bernal A., Mazur M., Goltsman E., Selkov E., Elzer P. H., Hagijs S.,

- O'Callaghan D., Letesson J. J., Haselkorn R., Kyrpides N., and Overbeek R. (2002). The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 443-8.
- Deng W. P., and Nickoloff J. A. (1992). Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal Biochem* **200**: 81-8.
- Derbyshire K. M., Salvo J. J., and Grindley N. D. (1986). A simple and efficient procedure for saturation mutagenesis using mixed oligodeoxynucleotides. *Gene* **46**: 145-52.
- Diesterhaft M. D., and Freese E. (1973). Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and malic enzyme during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **248**: 6062-70.
- Donovan R. S., Robinson C. W., and Glick B. R. (2000). Optimizing the expression of a monoclonal antibody fragment under the transcriptional control of the *Escherichia coli* lac promoter. *Can J Microbiol* **46**: 532-41.
- Drauz K., Bommarius A., Knaup G., Kottenhahn M., and Schwarm M. (1994). Synthesis of chiral Building Blocks by Amino Acid Transformation. *Chiral Europe 94, Symposium 19.-20. Sept. Nizza, Frankreich*: 13-16.
- Ernst&Young (1998). European Life Sciences 98. *Aufbruchstimmung 1998, Erster Deutscher Biotechnologie Report*.
- Esipov R. S., Gurevich A. I., Kaiushin A. L., Korosteleva M. D., and Belova M. A. (1999). The dependence of the *E. coli* gene expression level on the structure of the translation initiation region (TIR). IV. Distal complementary TIR interactions with the mRNA coding region. *Bioorg Khim* **25**: 548-53.
- Eventoff W., Tanaka N., and Rossmann M. G. (1976). Crystalline bovine liver catalase. *J Mol Biol* **103**: 799-801.
- Faber K. (1997). *Biotransformation in organic chemistry*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 3rd ed.
- Fieschko J. C. (1989). Fermentation Technology Using Recombinant Microorganisms. *Biotechnology. Weinheim VCH* **7b**: 117-140.
- Galkin A., Kulakova L., Ohshima T., Esaki N., and Soda K. (1997). Construction of a new leucine dehydrogenase with preferred specificity for NADP⁺ by site-directed mutagenesis of the strictly NAD⁺-specific enzyme. *Protein Eng* **10**: 687-90.
- Geerse R. H., van der Pluijm J., and Postma P. W. (1989). The repressor of the PEP:fructose phosphotransferase system is required for the transcription of the pps gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **218**: 348-52.
- Grantham R., Gautier C., Gouy M., Jacobzone M., and Mercier R. (1981). Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. *Nucleic Acids Res* **9**: r43-74.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80.
- Hanson R. L., Howell J. M., LaPorte T. L., Donovan M. J., Cazzulino D. L., Zannella V. V., Montana M. A., Nanduri V. B., Schwarz S. R., Eiring R. F., Durand S. C., Wasyluk J. M., Parker W. L., Liu M. S., Okuniewicz F. J., Chen B., Harris J. C., Natalie K. J., Ramig K., Swaminathan S., Rosso V. W., Pack S. K., Lotz B. T., Bernot P. J., Rusowicz A., Lust D. A., Tse K. S., Venit J. J., Szarka L. J., and Patel R. N. (2000).

- Synthesis of allysine ethylene acetal using phenylalanine dehydrogenase from *Thermoactinomyces intermedius*. *Enzyme Microb Technol* **26**: 348-358.
- Hart K. W., Clarke A. R., Wigley D. B., Chia W. N., Barstow D. A., Atkinson T., and Holbrook J. J. (1987). The importance of arginine 171 in substrate binding by *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* **146**: 346-53.
- Hausler R. E., Holtum J. A., and Latzko E. (1987). CO₂ is the inorganic carbon substrate of NADP malic enzymes from *Zea mays* and from wheat germ. *Eur J Biochem* **163**: 619-26.
- Hibino T., Misawa S., Wakiyama M., Maeda S., Yazaki K., Kumagai I., Ooi T., and Miura K. (1994). High-level expression of porcine muscle adenylate kinase in *Escherichia coli*: effects of the copy number of the gene and the translational initiation signals. *J Biotechnol* **32**: 139-48.
- Ho S. N., Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K., and Pease L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-9.
- Huang C. Y., Yuan C. J., Livanova N. B., and Graves D. J. (1993). Expression, purification, characterization, and deletion mutations of phosphorylase kinase gamma subunit: identification of an inhibitory domain in the gamma subunit. *Mol Cell Biochem* **127-128**: 7-18.
- Hummel W. (1997). New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **58**: 145-84.
- Hummel W., and Kula M. R. (1989). Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur J Biochem* **184**: 1-13.
- Hummel W., Schütte H., Schmidt E., Wandrey C., and Kula M. R. (1987). Isolation of L-phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4 and its application for the production of L-phenylalanine. *Appl Microbiol Biotechnol* **26**: 409-416.
- Hummel W., Weiss N., and Kula M. R. (1984). Isolation and characterization of bacterium possessing L-phenylalanine dehydrogenase activity. *Arch Microbiol* **137**: 47-52.
- Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., and Boyer H. W. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* **198**: 1056-63.
- Iwakura M., Tokushige M., Katsuki H., and Muramatsu S. (1978). Studies on regulatory functions of malic enzymes. V. Comparative studies of malic enzymes in bacteria. *J Biochem (Tokyo)* **83**: 1387-94.
- Iwata S., Kamata K., Yoshida S., Minowa T., and Ohta T. (1994). T and R states in the crystals of bacterial L-lactate dehydrogenase reveal the mechanism for allosteric control. *Nat Struct Biol* **1**: 176-85.
- Jaag H. (1968). Über proteolytische Enzyme, deren Prüfmöglichkeit in der Waschmittelindustrie. *Europ. Hochschul Reihe. Verlag Herbert Lang, Bern*.
- Janssen D., Keuning S., and Witholt B. (1987). Involvement of a Quinoproteine Alcohol Dehydrogenase and NAD-dependent Aldehyde Dehydrogenase in 2-Chlorethanol Metabolism im *Xanthobacter autrophicus* CJ10. *J. Gen. Microbiol* **133**: 85-92.
- Jensen E. B., and Carlsen S. (1990). Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Escherichia coli*: Expression of Different Precursors and Physiological Effects of Glucose, Acetate, and Salts. *Biotechnol. Bioeng* **36**: 1-11.

- Jiang X., Kowalski J., and Kelly J. W. (2001). Increasing protein stability using a rational approach combining sequence homology and structural alignment: Stabilizing the WW domain. *Protein Sci* **10**: 1454-65.
- Knichel W., and Radler F. (1982). D-Malic enzyme of *Pseudomonas fluorescens*. *Eur J Biochem* **123**: 547-52.
- Knorre W. A., Deckwer W. D., Korz D., Pohl H. D., Riesenberger 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* **646**: 300-6.
- Kobayashi K., Doi S., Negoro S., Urabe I., and Okada H. (1989). Structure and properties of malic enzyme from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* **264**: 3200-5.
- Kometani T., Morita Y., Furui H., Yoshii H., and Matsuno R. (1994). NAD(P)H regeneration using ethanol as an energy source in baker's yeast-mediated bioreaction. *J. Ferm. Bioeg.* **17**: 13-16.
- Kragl U., Vasic-Racki D., and Wandrey C. (1992). Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen. *Chem. -Ing. -Tech* **64**: 499-509.
- Krix G., Bommarius A., Drauz K., Kottenhahn M., Schwarm M., and Kula M. R. (1997). Enzymatic Reduction of Alpha-Keto Acids Leading to L-Amino Acids or Chiral Hydroxy Acid. *J. Biotechnol.*: 29-39.
- Kuchner O., and Arnold F. H. (1997). Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol* **15**: 523-30.
- Kula M. R., and Wandrey C. (1987). Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NADH regeneration. *Methods Enzymol* **136**: 9-21.
- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamed R., and Zeikus J. G. (1981). Thermostable, ammonium-activated malic enzyme of *Clostridium thermocellum*. *Biochim Biophys Acta* **660**: 251-5.
- Landwall P., and Holme T. (1977). Removal of inhibitors of bacterial growth by dialysis culture. *J Gen Microbiol* **103**: 345-52.
- Lee S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **14**: 98-105.
- Leonida M. D., Sobolov S. B., and Fry A. J. (1998). FAD-mediated enzymatic conversion of NAD⁺ to NADH: application to chiral synthesis of L-lactate. *Bioorg Med Chem Lett* **8**: 2819-24.
- Lerch H. P., Frank R., and Collins J. (1989). Cloning, sequencing and expression of the L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase-encoding gene of *Lactobacillus confusus* in *Escherichia coli*. *Gene* **83**: 263-70.
- Luyten M. A., Gold M., Friesen J. D., and Jones J. B. (1989). On the effects of replacing the carboxylate-binding arginine-171 by hydrophobic tyrosine or tryptophan residues in the L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry* **28**: 6605-10.
- Magnuson M. A., Morioka H., Tecce M. F., and Nikodem V. M. (1986). Coding nucleotide sequence of rat liver malic enzyme mRNA. *J Biol Chem* **261**: 1183-6.

- Mahajan S. K., Chu C. C., Willis D. K., Templin A., and Clark A. J. (1990). Physical analysis of spontaneous and mutagen-induced mutants of *Escherichia coli* K-12 expressing DNA exonuclease VIII activity. *Genetics* **125**: 261-73.
- Mason C. A., and Bailey J. E. (1989). Effects of Plasmid Presence on Growth and Enzyme Activity of *Escherichia coli* DH5-Alpha. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 54-60.
- Matsumura M., Signor G., and Matthews B. W. (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature* **342**: 291-3.
- Matthews B. W., Nicholson H., and Becktel W. J. (1987). Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6663-6667.
- May B. J., Zhang Q., Li L. L., Paustian M. L., Whittam T. S., and Kapur V. (2001). Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3460-5.
- McEvoy J. J., and Joyce A. (1974). Production of L-phenylalanine by DL-phenylalanine hydroxamate-resistant Tyr- mutants of *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Biochem* **4**: 191-5.
- Misono H., Yonezawa J., Nagata S., and Nagasaki S. (1989). Purification and characterization of a dimeric phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus maris* K-18. *J Bacteriol* **171**: 30-6.
- Moore J. C., Jin H. M., Kuchner O., and Arnold F. H. (1997). Strategies for the in vitro evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. *J Mol Biol* **272**: 336-47.
- Nakamura A., Urabe I., and Okada H. (1986). Anchimeric assistance in the intramolecular reaction of glucose- dehydrogenase-polyethylene glycol NAD conjugate. *J Biol Chem* **261**: 16792-4.
- Nakayama K., Araki K., and Kase H. (1978). Microbial production of essential amino acid with *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Adv Exp Med Biol* **105**: 649-61.
- Neubauer P., Ahman M., Tornkvist M., Larsson G., and Enfors S. O. (1995). Response of guanosine tetraphosphate to glucose fluctuations in fed- batch cultivations of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **43**: 195-204.
- Nicholls D. J., Davey M., Jones S. E., Miller J., Holbrook J. J., Clarke A. R., Scawen M. D., Atkinson T., and Goward C. R. (1994). Substitution of the amino acid at position 102 with polar and aromatic residues influences substrate specificity of lactate dehydrogenase. *J Protein Chem* **13**: 129-33.
- Nossal G. J. (1980). Human insulin through recombinant DNA technology. *Med J Aust* **2**: 295-6.
- Ohshima T., Takada H., Yoshimura T., Esaki N., and Soda K. (1991). Distribution, purification, and characterization of thermostable phenylalanine dehydrogenase from thermophilic actinomycetes. *J Bacteriol* **173**: 3943-8.
- Okazaki N., Hibino Y., Asano Y., Ohmori M., Numao N., and Kondo K. (1988). Cloning and nucleotide sequencing of phenylalanine dehydrogenase gene of *Bacillus sphaericus*. *Gene* **63**: 337-41.
- Oliphant A. R., and Struhl K. (1989). An efficient method for generating proteins with altered enzymatic properties: application to beta-lactamase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9094-8.

- Ondetti M. A., and Cushman D. W. (1981). Inhibition of the renin-angiotensin system. A new approach to the therapy of hypertension. *J Med Chem* **24**: 355-61.
- Oppenheimer N. J., and Kaplan N. O. (1974). Structure of the primary acid rearrangement product of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). *Biochemistry* **13**: 4675-85.
- Paalme T., Elken R., Kahru A., Vanatalu K., and Vilu R. (1997). The growth rate control in *Escherichia coli* at near to maximum growth rates: the A-stat approach. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**: 217-30.
- Paalme T., Tiisma K., Kahru A., Vanatalu K., and Vilu R. (1990). Glucose-limited Fed-batch Cultivation of *Escherichia coli* with Computer-Controlled Fixed Growth Rate. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 312-319.
- Pan J. G., Rhee J. S., and Lebeaut J. M. (1987). Physiological Constrains in Increasing Biomass Concentration of *Escherichia coli* B in Fed-batch Culture. *Biotechnol.Lett.* **9**: 89-94.
- Parkhill J., Dougan G., James K. D., Thomson N. R., Pickard D., Wain J., Churcher C., Mungall K. L., Bentley S. D., Holden M. T., Sebahia M., Baker S., Basham D., Brooks K., Chillingworth T., Connerton P., Cronin A., Davis P., Davies R. M., Dowd L., White N., Farrar J., Feltwell T., Hamlin N., Haque A., Hien T. T., Holroyd S., Jagels K., Krogh A., Larsen T. S., Leather S., Moule S., O'Gaora P., Parry C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., and Barrell B. G. (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**: 848-52.
- Pasquo A., Britton K. L., Baker P. J., Brearley G., Hinton R. J., Moir A. J., Stillman T. J., and Rice D. W. (1998). Crystallization of NAD⁺-dependent phenylalanine dehydrogenase from *Nocardia sp239*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**: 269-72.
- Rhee J. I., Bode J., Diaz-Ricci J. C., Poock D., Weigel B., Kretzmer G., and Schugler K. (1997). Influence of the medium composition and plasmid combination on the growth of recombinant *Escherichia coli* JM109 and on the production of the fusion protein EcoRI::SPA. *J Biotechnol* **55**: 69-83.
- Rice G. C., Goeddel D. V., Cachianes G., Woronicz J., Chen E. Y., Williams S. R., and Leung D. W. (1992). Random PCR mutagenesis screening of secreted proteins by direct expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5467-71.
- Riesenberg D. (1991). High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **2**: 380-4.
- Riesenberg D., and Guthke R. (1999). High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 422-30.
- Riesenberg D., Schulz V., Knorre W. A., Pohl H. D., Korz D., Sanders E. A., Ross A., and Deckwer W. D. (1991). High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J Biotechnol* **20**: 17-27.
- Ruzheinikov S. N., Burke J., Sedelnikova S., Baker P. J., Taylor R., Bullough P. A., Muir N. M., Gore M. G., and Rice D. W. (2001). Glycerol dehydrogenase. structure, specificity, and mechanism of a family III polyol dehydrogenase. *Structure (Camb)* **9**: 789-802.
- Sanden A. M., Shokri A., and Larsson G. (2002). Growth rate-dependent changes in *Escherichia coli* membrane structure and protein leakage. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**: 386-92.

- Sanger F., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes C. A., Hutchison C. A., Slocombe P. M., and Smith M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**: 687-95.
- Schütte H., Flossdorf J., Sahm H., and Kula M. R. (1976). Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur J Biochem* **62**: 151-60.
- Sekimoto T., Fukui T., and Tanizawa K. (1994). Involvement of conserved lysine 68 of *Bacillus stearothermophilus* leucine dehydrogenase in substrate binding. *J Biol Chem* **269**: 7262-6.
- Shaked S., and Whitesides G. (1980). Enzyme-catalyzed Organic Synthesis: NADH Regeneration by Using Formate Dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 7105-7107.
- Sharp P. M., Cowe E., Higgins D. G., Shields D. C., and Wolfe K. H. W., F. (1988). Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within species diversity. *Nucl. Acids Res.* **16**: 8207-8211.
- Shin C. S., Hong M. S., Bae C. S., and Lee J. (1997). Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnol Prog* **13**: 249-57.
- Slusarczyk H., Felber S., Kula M. R., and Pohl M. (2000). Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur J Biochem* **267**: 1280-9.
- Solovjeva O. N., and Kochetov G. A. (1999). Inhibition of transketolase by p-hydroxyphenylpyruvate. *FEBS Lett* **462**: 246-8.
- Stader J. (1995). Gene expression in recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess Technol* **22**: 1-51.
- Stemmer W. P. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-91.
- Stols L., and Donnelly M. I. (1997). Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2695-701.
- Takada H., Yoshimura T., Ohshima T., Esaki N., and Soda K. (1991). Thermostable phenylalanine dehydrogenase of *Thermoactinomyces intermedius*: cloning, expression, and sequencing of its gene. *J Biochem (Tokyo)* **109**: 371-6.
- Tedin K., Resch A., and Blasi U. (1997). Requirements for ribosomal protein S1 for translation initiation of mRNAs with and without a 5' leader sequence. *Mol Microbiol* **25**: 189-99.
- Thein S. L., and Wallace R. B. (1988). The use of synthetic oligonucleotides as a specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. *Human genetic diseases: a practical approach (Davis, K.E., ed.) IRL Press, Herndon, Virginia.*
- Uhlig H. (1991). Enzyme arbeiten für uns. Technische Enzyme und ihre Anwendung. *Carl Hanser Verlag, München.*
- Vacca J., Christen P., Malashkevich V. N., Jansonius J. N., and Sandmeier E. (1995). Substitution of apolar residues in the active site of aspartate aminotransferase by histidine-effects on reaction and substrate specificity. *Biochem.* **227**: 481-487.

- van den Bogaard P. T., Kleerebezem M., Kuipers O. P., and de Vos W. M. (2000). Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *J Bacteriol* **182**: 5982-9.
- van Soolingen D., Hermans P. W., de Haas P. E., Soll D. R., and van Embden J. D. (1991). Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence- dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **29**: 2578-86.
- Vanhooke J. L., Thoden J. B., Brunhuber N. M., Blanchard J. S., and Holden H. M. (1999). Phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4: high-resolution X-ray analyses of inhibitory ternary complexes reveal key features in the oxidative deamination mechanism. *Biochemistry* **38**: 2326-39.
- Vellanoweth R. L., and Rabinowitz J. C. (1992). The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in vivo. *Mol Microbiol* **6**: 1105-14.
- Watts J. L., Lowery D. E., Teel J. F., Ditto C., Horng J. S., and Rossbach S. (2001). Phylogenetic studies on *Corynebacterium bovis* isolated from bovine mammary glands. *J Dairy Sci* **84**: 2419-23.
- Wendel U., Koppelkamm M., and Hummel W. (1991). Enzymatic phenylalanine estimation for the management of patients with phenylketonuria. *Clin Chim Acta* **201**: 95-8.
- Wendel U., Koppelkamm M., Hummel W., Sander J., and Langenbeck U. (1990). A new approach to the newborn screening for hyperphenylalaninemia: use of L-phenylalanine dehydrogenase and microtiter plates. *Clin Chim Acta* **192**: 165-70.
- Wichmann R., Wandrey C., Bückmann A. F., and Kula M. R. (1981). Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 2789-2802.
- Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M., Carter P., and Winter G. (1984). A large increase in enzyme-substrate affinity by protein engineering. *Nature* **307**: 187-8.
- Willeford K. O., and Wedding R. T. (1987). Evidence for a multiple subunit composition of plant NAD malic enzyme. *J Biol Chem* **262**: 8423-9.
- Winberry L. K., Morris S. M., Jr., Fisch J. E., Glynias M. J., Jenik R. A., and Goodridge A. G. (1983). Molecular cloning of cDNA sequences for avian malic enzyme. Nutritional and hormonal regulation of malic enzyme mRNA levels in avian liver cells in vivo and in culture. *J Biol Chem* **258**: 1337-42.
- Wong C., and Whitesides G. (1981). Enzyme-catalyzed Organic Synthesis: NAD(P)H Cofactor Regeneration by using Glucose-6-Phosphate and the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconoctoc mesenteroides*. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 4890-4899.
- Xu Y., Shen M., Zhao Q., and Zhang H. (1994). Construction and expression of high efficiency expressing plasmid of transforming growth factor alpha-Pseudomonas aeruginosa exotoxin fusion protein TGF alpha-PE40. *Chin J Biotechnol* **10**: 233-9.
- Yang Q. H., Wu C. L., Lin K., and Li L. (1997). Low concentration of inducer favors production of active form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **10**: 320-4.

- Yee L., and Blanch H. W. (1992). Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* **10**: 1550-6.
- You L., and Arnold F. H. (1996). Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide [published erratum appears in *Protein Eng* 1996 Aug;9(8):719]. *Protein Eng* **9**: 77-83.
- Zaks A. (2001). Industrial biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* **5**: 130-6.
- Zhang Z., Schofield C. J., Baldwin J. E., Thomas P., and John P. (1995). Expression, purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase from tomato in *Escherichia coli*. *Biochem J* **307**: 77-85.
- Zhao H., and Arnold F. H. (1999). Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. In "Protein Eng", pp. 47-53.
- Zhao H., Giver L., Shao Z., Affholter J. A., and Arnold F. H. (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat Biotechnol* **16**: 258-61.
- Zhou L., Zhao Y., and Bi R. (1996). Thermal stable subtilisin with oxidation-resistant property. *Enzyme Engineering VIII. Ann. N.Y. Acad. Sci.* **799**: 82-84.
- 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**: 119-22.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die durch Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere danke ich

Herrn Priv.- Doz. Dr. Werner Hummel für die Überlassung des Themas, seine vielfältigen konstruktiven Anregungen, seine stete Diskussionsbereitschaft und für die kritische Durchsicht der Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Cornelis P. Hollenberg für die Übernahme des Korreferats,

Frau Prof. Dr. M. –R. Kula für die Möglichkeit, diese Dissertation am Institut für Enzymtechnologie durchführen zu können und für die sehr guten Arbeitsbedingungen an ihrem Institut,

Herrn Dipl. Chem. Frank Schneider für die kritische Durchsicht der Arbeit,

allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, die mir mit fachlichen Ratschlägen zur Seite standen.