

**Optimierung einer Lipase aus *Bacillus subtilis* mit neuen Methoden
der gerichteten Evolution**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Susanne Aileen Funke

aus Witten

Jülich, November 2004

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

Referent: Prof. Dr. K.-E. Jäger

Korreferent: Prof. Dr. M. Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2005

Diese Arbeit wurde vom Graduiertenkolleg „Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gefördert.

Für meine Eltern und Christian

VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DER PROMOTION:

Funke, S.A., Eipper, A., Reetz, M.T., Otte, N., Thiel, W., van Pouderoyen, G., Dijkstra, B., Jaeger, K.-E. and Eggert, T. (2003) Directed evolution of an enantioselective *Bacillus subtilis* lipase. *Biocatal. Biotransform.* **21**: 67-73

Funke, S.A., Otte, N., Bocola, M., Jaeger, K.-E., Thiel, W., Eggert, T. *In silico* scanning of protein-sequence space by QM/MM accelerates enzyme optimization using directed evolution. *Angewandte Chemie*. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Eggert, T., Funke, S.A., Rao, N.M., Acharya, P., Krumm, H., Reetz, M.T., and Jaeger, K.-E. Multiplex-PCR-based recombination (MUPREC): a novel high fidelity recombination method for directed evolution. *ChemBioChem*. Zur Veröffentlichung eingereicht.

TAGUNGSBEITRÄGE:

Funke, S.A., Eipper, A., Reetz, M.T., Otte, N., Thiel, W., van Pouderoyen, G., Dijkstra, B.W., Jaeger, K.-E., Eggert, T. (2002) Directed evolution of an enantioselective lipase using complete saturation mutagenesis. Engineering enzymes for biocatalysis using directed evolution. Paris, Frankreich (Posterbeitrag)

Funke, S.A., A. Eipper, W. Wiesenhöfer, M.T. Reetz, K.-E. Jaeger, T. Eggert (2003) Directed evolution of an enantioselective *Bacillus subtilis* lipase using complete saturation mutagenesis. VAAM-Jahrestagung, Berlin (Vortrag)

Funke, S.A., Eipper, A., Krumm, H., Reetz, M.T., Otte, N., Thiel, W., Jaeger, K.-E. and Eggert, T. (2003) Directed evolution of an enantioselective *Bacillus subtilis* lipase. VAAM-Sommer-Schule: Biokatalyse. Bad Herrenalb (Posterbeitrag)

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Lipolytische Enzyme: Lipasen..... | 1 |
| 1.1.1 | Die Definition von Lipasen..... | 3 |
| 1.1.2 | Die Struktur und der katalytische Mechanismus von Lipasen | 4 |
| 1.1.3 | Die Lipasen LipA und LipB aus <i>Bacillus subtilis</i> | 6 |
| 1.2 | Industrielle Biokatalyse..... | 9 |
| 1.3 | Die gerichtete Evolution von Biokatalysatoren..... | 11 |
| 1.3.1 | <i>In vitro</i> Mutagenese-Methoden..... | 14 |
| 1.3.2 | Identifizierung von optimierten Enzymvarianten..... | 18 |
| 1.4 | Ziele dieser Arbeit..... | 21 |
| 2. | Material und Methoden..... | 23 |
| 2.1 | Chemikalien und Enzyme..... | 23 |
| 2.2 | Lipase-/Depolymerase-Substrate..... | 23 |
| 2.3 | Bakterienstamm und Plasmide..... | 24 |
| 2.4 | Oligonukleotide..... | 26 |
| 2.5 | Nährmedien..... | 31 |
| 2.6 | Anzucht und Lagerung von Bakterien..... | 31 |
| 2.7 | Isolierung von Nukleinsäuren..... | 31 |
| 2.8 | Gelelektrophorese von Nukleinsäuren..... | 31 |
| 2.9 | <i>In vitro</i> Rekombination von DNA..... | 32 |
| 2.10 | Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA..... | 32 |
| 2.11 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 32 |
| 2.11.1 | Standard-PCR-Reaktion..... | 32 |
| 2.11.2 | Ortspezifische Mutagenese..... | 32 |
| 2.11.3 | Sättigungsmutagenese..... | 32 |
| 2.12 | Sequenzierung von DNA..... | 33 |
| 2.13 | Bestimmung von Proteinkonzentrationen..... | 33 |
| 2.14 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 33 |
| 2.15 | Chromatographische Reinigung der Lipase-Varianten..... | 33 |
| 2.16 | Herstellung von Zellrohextrakten..... | 34 |
| 2.17 | Fraktionierung von <i>E. coli</i> -Zellen..... | 34 |
| 2.18 | Nachweis und Bestimmung von Enzymaktivitäten..... | 34 |
| 2.18.1 | Herstellung von Substratsuspensionen/-emulsionen..... | 34 |
| 2.18.2 | Indikatoragarplatten..... | 34 |
| 2.18.3 | Spektrometrische Nachweise von Depolymerase-Aktivität..... | 35 |
| 2.18.4 | Spektrometrische Methode zur Bestimmung von Lipase-Aktivität... .. | 35 |
| 2.19 | Bestimmung von Enantioselektivitäten..... | 35 |
| 2.19.1 | Bestimmung von Enantioselektivitäten mittels Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)..... | 35 |
| 2.19.2 | Bestimmung von Enantioselektivitäten/Enzymaktivitäten mittels chiraler Gaschromatographie-Analyse..... | 36 |
| 2.20 | Bestimmung von Thermo- und pH-Stabilität..... | 36 |
| 2.21 | Bestimmung der lipolytischen Aktivität nach Inkubation der Enzyme in ionischen Flüssigkeiten..... | 37 |
| 2.22 | Computerprogramme und Online-Datenbanken..... | 37 |
| 3. | Ergebnisse..... | 38 |
| 3.1 | Biochemische Charakterisierung der Lipasen A (BSLA) und B (BSLB) aus <i>Bacillus subtilis</i> | 38 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.1.1 | Überexpression des <i>lipA</i> - und <i>lipB</i> -Gens im heterologen Wirt <i>E. coli</i> und chromatographische Reinigung der korrespondierenden Proteine..... | 38 |
| 3.1.2 | BSLA und BSLB weisen Depolymerase-Aktivität auf | 39 |
| 3.1.3 | Die BSLA und die BSLB zeigen eine Erhöhung ihrer lipolytischen Aktivität in einigen ionischen Flüssigkeiten..... | 41 |
| 3.2 | Evolution der Enantioselektivität der BSLA durch Erstellung einer vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank..... | 43 |
| 3.2.1 | Herstellung einer vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank der BSLA..... | 43 |
| 3.2.2 | Screening auf BSLA-Varianten mit gesteigerter Enantioselektivität mittels ESI- MS | 45 |
| 3.2.3 | Charakterisierung der BSLA-Proteinvarianten mit umgekehrter Enantioselektivität | 48 |
| 3.2.4 | Alle BSLA-Varianten mit einem Aminosäureautausch an der Position 18 zeigen umgekehrte Enantioselektivität gegenüber <i>meso</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten..... | 51 |
| 3.2.5 | Screening auf BSLA-Varianten mit veränderter Enantioselektivität gegenüber 1-(2-Naphthyl)ethylacetat (NEA)..... | 55 |
| 3.3 | Gerichtete Evolution verbesserter BSLA-Varianten durch <i>in vitro</i> Rekombination..... | 59 |
| 3.3.1 | Biochemische Charakterisierung der thermostabilen Variante von LipA..... | 59 |
| 3.3.2 | Etablierung einer Methode zur <i>in vitro</i> Rekombination von Punktmutationen..... | 62 |
| 3.3.3 | Anwendung der unter 3.3.3 entwickelten Methode MUPREC für die Optimierung enantioselektiver BSLA-Varianten..... | 66 |
| 3.3.4 | Die Doppelvariante N18Q; Y49V hat einen <i>ee</i> -Wert von 82 % bei der Hydrolyse von <i>meso</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten und eine höhere lipolytische Aktivität als die Variante N18Q..... | 69 |
| 4. | Diskussion | 73 |
| 4.1 | Biochemische Charakterisierung der BSLA und BSLB..... | 73 |
| 4.1.1 | BSLA und BSLB können mittels immobilisierter Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) effektiv gereinigt werden..... | 74 |
| 4.1.2 | BSLA und BSLB weisen Depolymerase-Aktivität und Protease-Aktivität auf | 75 |
| 4.1.3 | BSLA und BSLB zeigen nach der Inkubation in ionischen Flüssigkeiten Steigerungen ihrer lipolytischen Aktivität..... | 78 |
| 4.2 | Evolution der BSLA..... | 80 |
| 4.2.1 | Erstellung einer vollständigen BSLA-Sättigungsmutagenese-Bank... | 81 |
| 4.2.2 | Gerichtete Evolution der BSLA zur Verbesserung der Enantioselektivität gegenüber dem Modellsubstrat <i>meso</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten | 85 |
| 4.2.3 | Die Aminosäureposition 18 ist für die Enantioselektivität der BSLA gegenüber bestimmten Substraten von Bedeutung..... | 90 |
| 4.2.4 | Screening der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank auf die veränderte Enantiopräferenz gegenüber dem Substrat 1-(2-Naphthyl)ethylacetat (NEA)..... | 94 |
| 4.3 | Entwicklung einer neuen Methode zur <i>in vitro</i> Rekombination | 97 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.3.1 | Die weitere Rekombination der in ihrer Enantioselektivität optimierten BSLA-Varianten durch die Anwendung von MUPREC..... | 99 |
| 4.4 | Ausblick..... | 102 |
| 5. | Zusammenfassung..... | 104 |
| 6. | Summary..... | 106 |
| 7. | Literatur..... | 108 |
| 8. | Anhang..... | 121 |
| 8.1 | Mathematische Formeln..... | 121 |
| 8.1.1 | Formel zur Berechnung der Lipaseaktivität nach spektrometrischer Bestimmung mit dem Substrat <i>p</i> -Nitrophenylpalmitat..... | 121 |
| 8.1.2 | Formel zur Berechnung des <i>ee</i> -Wertes (<i>enantiomeric excess</i>)..... | 121 |
| 8.1.3 | Formel zur Berechnung des E-Wertes..... | 121 |
| 8.1.4 | Formel zur Berechnung der Wechselzahl..... | 122 |
| 8.2 | Pläne der in dieser Arbeit konstruierten rekombinanten Plasmide..... | 122 |
| 8.3 | Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Substrate..... | 124 |

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

| | Seite | |
|--------|--|-----|
| Abb.1 | Reversible, Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Esters | 2 |
| Abb.2 | Allgemeines Faltungsmuster der α/β -Hydrolasen (VAN POUDEROYEN <i>et al.</i> , 2001). | 4 |
| Abb.3 | Der Katalyse-Mechanismus von Lipasen (nach JAEGER <i>et al.</i> , 1999). | 6 |
| Abb.4 | Struktur der BSLA als schematische Zeichnung (nach POUDEROYEN <i>et al.</i> , 2001). | 8 |
| Abb.5 | Allgemeine Strategie der gerichteten Evolution. | 12 |
| Abb.6 | Generelle Schemata der nichtrekombinativen, rekombinativen homologieabhängigen und homologieunabhängigen Methoden zur <i>in vitro</i> Rekombination. | 17 |
| Abb.7 | Beispiel für den zeitlichen Verlauf der Absorptionsänderung während der Lipase-katalysierten Hydrolyse des (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-Enantiomers von (<i>R,S</i>)-2-Methyldecansäure- <i>p</i> -nitrophenylester. | 20 |
| Abb.8 | Asymmetrischen Hydrolyse von <i>pseudo-meso</i> -1-Trideuteroacetoxy-4-acetoxy-2-cyclopenten durch die BSLA. | 20 |
| Abb.9 | SDS-PAGE-Analysen von gereinigtem BSLA- und BSLB-Protein. | 39 |
| Abb.10 | Depolymerase-Aktivität der BSLA und der BSLB. | 40 |
| Abb.11 | pH-Indikator-Test zum Nachweis von hydrolytischer Aktivität. | 41 |
| Abb.12 | Klärhofbildung auf Skim-Milk-Platten durch die BSLA und die BSLB. | 41 |
| Abb.13 | Strategien für die Erstellung einer vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank der BSLA. | 44 |
| Abb.14 | Reaktion der asymmetrischen Hydrolyse der Verbindung <i>pseudo-meso</i> -1-Trideuteroacetoxy-4-acetoxy-2-cyclopenten | 45 |
| Abb.15 | Aminosäurepositionen, die in der Desymmetrisierung von <i>meso</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten als „hot spot“-Positionen für eine veränderte Enantioselektivität identifiziert wurden und Lage der in der BSLA identifizierten „hot-spot“-Positionen. | 46 |
| Abb.16 | Screeningergebnisse von aktiven BSLA-Varianten mit einem Aminosäureaustausch an der Position 18. | 47 |
| Abb.17 | Lipolytische Aktivitäten der BSLA und der Enzymvarianten mit veränderter Enantioselektivität. | 49 |
| Abb.18 | Thermostabilitäten der BSLA und der Enzymvarianten mit veränderter Enantioselektivität. | 51 |
| Abb.19 | Tributyryn-Agar-Platte mit <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Klonen. | 52 |
| Abb.20 | SDS-PAGE-Analysen der Zellrohextrakte von <i>E. coli</i> BL21(DE3) mit den jeweiligen Plasmiden pET19lipA-N18X (X = alle Aminosäureaustausche) nach 3 Stunden Expression. | 53 |
| Abb.21 | Enantioselektivität der BSLA und deren Varianten mit Aminosäureaustauschen an der Position 18 bei dem Umsatz von <i>meso</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten. | 54 |
| Abb.22 | Beispiele für eine (<i>R</i>)-NEA-haltige und für eine (<i>S</i>)-NEA-haltige Agar-Platte. | 56 |
| Abb.23 | SDS-PAGE-Analysen nach Fraktionierung von 3 h exprimierten <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Kulturen mit den Plasmiden pET22lipA, pET22lipA-NEA2, -NEA3 und-NEA4 in periplasmatische- und cytoplasmatische Fraktion. | 57 |
| Abb.24 | Temperaturstabilität der BSLA und einiger Enzymvarianten bei 55 °C. | 60 |
| Abb.25 | Temperaturstabilität der BSLA und verschiedener Varianten. | 61 |
| Abb.26 | Schematische Darstellung der <i>in vitro</i> Rekombination nach Protokoll 1. | 63 |
| Abb.27 | Schematische Darstellung der neu entwickelten <i>in vitro</i> Rekombinations-Methode nach Protokoll 2 und Protokoll 3. | 64 |
| Abb.28 | Agarose-Gel-Elektrophorese zur Kontrolle der einzelnen Schritte bei der <i>in vitro</i> Rekombination nach Protokoll 2. | 64 |
| Abb.29 | Screening-Ergebnisse 192 durchgeführter Kontrollversuche. | 68 |
| Abb.30 | <i>E. coli</i> BL21(DE3) mit verschiedenen Plasmiden auf Tributyrin-Agar. | 70 |
| Abb.31 | Darstellung der Enzymkinetiken der BSLA und der Varianten N18Q und N18Q, Y49V nach LINEWEAVER-BURK. | 71 |
| Abb.32 | Strukturformel des Esters von Citronellol und α -Eleostearat. | 93 |
| Abb.33 | Mit dem Programm „Pymol“ modelliertes Enzymmodell der BSLA mit dem (<i>R</i>)-Enantiomer von 1-(2-Naphthyl)ethylacetat. | 96 |
| Abb.34 | Karte des rekombinanten Plasmids pET19lipA. | 122 |
| Abb.35 | Karte des rekombinanten Plasmids pET22lipA. | 123 |

| | | |
|---------|--|-----|
| Tab.1 | Beispiele für kommerzielle Lipasen und deren Quellen, Anwendungen und Lieferanten | 2 |
| Tab.2 | Überblick über wichtige industrielle Biokatalyseverfahren nach SYLDATK <i>et al.</i> , 2001 | 10 |
| Tab.3 | Beispiele für die Optimierung von verschiedenen Enzymen durch gerichtete Evolution. | 13 |
| Tab.4 | Beispiele für die Optimierung enantioselektiver Lipasen oder Esterasen mit Hilfe der gerichteten Evolution. | 14 |
| Tab.5 | Auflistung einiger wichtiger, nichtrekombinativer oder rekombinativer <i>in vitro</i> Mutagenese-Methoden. | 15 |
| Tab.6 | Übersicht der verwendeten Lipase-/Depolymerase-Substrate. | 23 |
| Tab.7 | Der verwendete Bakterienstamm. | 24 |
| Tab.8 | Übersicht der verwendeten Vektoren für <i>E. coli</i> . | 24 |
| Tab.9 | Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide. | 24 |
| Tab.10 | Übersicht der für die Sättigungsmutagenesen verwendeten Oligonukleotide. | 26 |
| Tab.11 | Übersicht der für die ortsspezifischen Mutagenesen verwendeten Oligonukleotide | 30 |
| Tab.12 | Übersicht der zur Rekombination und zur Herstellung der thermostabilen <i>lipA</i> -Genvarianten verwendeten Oligonukleotide. | 30 |
| Tab.13 | Ausbeuten bei der Reinigung der BSLA und BSLB-Proteine. | 39 |
| Tab.14 | Lipolytische Aktivitäten der BSLA und der BSLB nach Inkubation in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten. | 2 |
| Tab.15 | BSLA-Varianten, die bei der Hydrolyse von <i>meso</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten eine veränderte Enantioselektivität aufweisen. | 48 |
| Tab.16 | Umsätze gegenüber zwei verschiedenen racemischen Substraten durch die BSLA und Enzymvarianten mit umgekehrter Enantioselektivität. | 50 |
| Tab.17 | Stereoselektivität der einzelnen BSLA-Varianten mit einem Aminosäureaustausch an der Position 18 gegenüber IPG-Butyrat. | 55 |
| Tab.18 | Aminosäure-, Basenaustausche und Stereoselektivität der BSLA und dreier Varianten gegenüber verschiedenen Substraten. | 58 |
| Tab.19 | Ergebnisse der Hydrolyse von <i>meso</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten durch die BSLA und verschiedene Varianten. | 62 |
| Tab.20 | Effizienzen der durchgeführten Protokolle zur <i>in vitro</i> Rekombination. | 65 |
| Tab.21 | Für die <i>in vitro</i> Rekombination genutzte Varianten. | 67 |
| Tab.22 | Bestimmung der Restaktivität der im ESI-MS identifizierten Varianten mit umgekehrten <i>ee</i> -Wert und vor und nach der Hitzeinkubation gleichbleibenden Umsätzen. | 69 |
| Tab.23 | Die Doppelvariante N18Q; Y49V zeigt bei gleichbleibendem <i>ee</i> -Wert einen höheren Umsatz als die Variante N18Q gegenüber <i>meso</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten. | 70 |
| Tab.24 | Die Enzym-Charakteristika der BSLA und der Varianten N18Q und N18Q; Y49V gegenüber dem Substrat <i>p</i> -Nitrophenyl-Palmitat. | 72 |
| Tab.25 | Vergleich der konservierten Sequenzen der PLA-Depolymerase PlaA aus <i>Paenibacillus amylolyticus</i> und der Lipasen aus den Familien I-4 und I-5 nach AKUTSO-SHIGENO <i>et al.</i> , 2003. | 77 |
| Tab.26 | Der universelle genetische Code. | 84 |
| Tab. 27 | Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Substrate | 124 |

ABKÜRZUNGEN

Im folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgelistet. Dabei sind die in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen und SI-Einheiten ausgenommen. Darüber hinaus wurden Aminosäuren in dem gebräuchlichen Ein-oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

| | |
|---------------|---|
| 6-APA | 6-Aminopenicillat |
| a | Jahr |
| A. dest | destilliertes Wasser |
| Abb. | Abbildung |
| BHT | Butylhydroxytoluen |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin) |
| GC | Gaschromatographie, gaschromatographisch |
| Da | Dalton |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| <i>D</i> -Phg | <i>D</i> -Phenylglycin |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>ee</i> | Enantiomeren-Überschuß |
| epPCR | <i>error-prone-polymerase chain rection</i> |
| EPPS | (<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazine- <i>N'</i> -(3-propansulfonat) |
| ESI-MS | Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie |
| h | Stunde(n) |
| IMAC | immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie |
| IPG | Isopropylidenglycerol |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalaktosid |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| M | Molar |
| min | Minute(n), minütig |
| MOPS | Morpholinpropansulfonat |
| NEA | 1-(2-Naphthyl)ethylacetat |
| O.D. | Optische Dichte |

| | |
|------------------|--|
| p.A. | <i>per analyse</i> |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Poly-(Butylen-Succinat) |
| PBSA | Poly-(Butylen-Succinat- <i>co</i> -Adipat) |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PEA | 1-Phenylethylacetat |
| PHB <i>co</i> VA | Poly-(3-Hydroxybutyrat- <i>co</i> -3-hydroxyvalerat) |
| PLA | Poly-(D,L-Lactid) |
| RBS | Ribosomenbindestelle |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Tab. | Tabelle |
| TCA | Trichloressigsäure |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tween | Polyoxyethylensorbitolmonolaurat |
| U | Enzymeinheiten |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen |

1 EINLEITUNG

Enzyme spielen bei nahezu allen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Ohne die Fähigkeiten dieser Biokatalysatoren, welche Reaktionsgeschwindigkeiten erhöhen und sich dabei durch eine hohe Spezifität bezüglich der Art der Reaktion und der Reaktanden auszeichnen, würden die meisten der in lebenden Zellen ablaufenden chemischen Reaktionen nur in unüberschaubaren Zeitrahmen vollzogen. Schon 6000 vor Christus erkannte die Menschheit den Nutzen von Enzymen zum Brot backen, Bier brauen und Wein keltern, ohne sich dabei über ihr Vorhandensein bewusst zu sein. Heute gilt die Biotechnologie neben der Informations- und der Siliziumtechnologie als die dritte Megatechnologie des 21. Jahrhunderts und eine Vielzahl von Enzymen findet aufgrund ihrer positiven Eigenschaften wie Spezifität, Effektivität und Selektivität in der Lebensmittelindustrie, Pharmazie und in der chemischen Industrie ihre biotechnologische Anwendung. Die Produktion chiraler Komponenten mit Hilfe von Enzymen oder Bakterien wird auch als „weiße Biotechnologie“ beschrieben. Durch den heutigen Stand der Technik ist es möglich, die Eigenschaften bestimmter Enzyme durch rationale oder evolutive Methoden den gewünschten Bedingungen einer biotechnologischen Anwendung anzupassen oder durch die Anwendung dieser Methoden die Funktionsweise der Enzyme zu erforschen. Eine besonders bedeutende Enzymgruppe stellen aufgrund ihrer Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten durch ihr breites Substratspektrum bei gleichzeitig hoher Enantio- oder Regioselektivität und Lösungsmittelstabilität die Lipasen [EC 3.1.1.3] dar (OECD, 1998; BORNSCHEUER & KAZLAUSKAS, 1999; LIESE *et al.*, 2000; JAEGER & EGGERT, 2004; JAEGER, 2004).

1. Lipolytische Enzyme: Lipasen

Lipolytische Aktivität wurde 1901 erstmals von C. EIJKMANN dokumentiert. Zu den lipolytischen Enzymen, die Umsetzungen von Lipiden katalysieren, gehören Lipasen, (Triacylglycerol-Hydrolasen) [EC 3.1.1.3], Phospholipasen [EC 3.1.4.3], Lysophospholipasen (verschiedene Einträge unter [EC 3.1.x.x]) und Esterasen [EC 3.1.1.1] (IUBMB, 1992; BAIROCH, 1999).

Lipasen werden von vielen Spezies des Tier- und Pflanzenreiches sowie von vielen Mikroorganismen gebildet (BROCKERHOFF & JENSEN, 1974). Aufgrund der positiven Eigenschaften der Lipasen, wie einem breiten Substratspektrum, hohe Enantio- oder Regioselektivität, Stabilität in organischen Lösungsmitteln und der Funktionsweise ohne Kofaktoren, rückten die Lipasen früh in das Interesse der Biotechnologen. Heute erscheinen jährlich über 1000 wissenschaftliche Publikationen zum Thema Lipasen. Lipasen werden in einer Vielzahl von

biotechnologischen Anwendungen, wie zum Beispiel in der Lebensmittel-, der kosmetischen- und pharmazeutischen-Industrie, für Detergenzien, Öle und Fette, Biopolymere und für die Papierherstellung angewendet. Darüber hinaus sind sie die meistgenutzten Enzyme in der organischen Synthese. Hier katalysieren sie die chemo-, regio oder enantioselektive Hydrolyse von zahlreichen Esterverbindungen oder die umgekehrte Reaktion in organischen Lösungsmitteln, wie in Abb. 1. gezeigt (SCHMIDT & VERGER, 1998; JAEGER *et al.*, 1999; BORNSCHEUER & KAZLAUSKAS, 1999; KOELLER & WONG, 2001; JAEGER & EGGERT, 2002, REETZ, 2002).

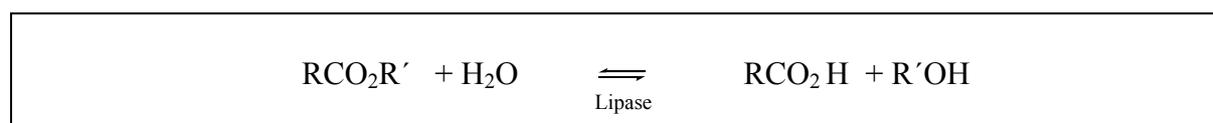


Abb. 1: Reversible, Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Esters.

Lipasen mikrobiellen Ursprungs werden am häufigsten für biotechnologische Anwendungen und in der organischen Chemie verwendet. Beispiele für auf bakteriellen Lipasen basierende Produkte sind in Tab. 1 angegeben (GUPTA *et al.*, 2004). Das biokatalytische Potential von Lipasen kann durch die Verbesserung bestimmter enzymatischer Eigenschaften, wie zum Beispiel der Aktivität, der Selektivität oder der Stabilität, mit Methoden wie dem rationalen Protein-Design, der gerichteten Evolution oder der Veränderung des umgebenden Mediums verbessert werden (BORNSCHEUER *et al.*, 2002; REETZ, 2002).

Tab. 1: Beispiele für kommerzielle Lipasen und deren Quellen, Anwendungen und Lieferanten. Nach GUPTA *et al.*, 2004

| Lipase | Quelle | Hersteller | Anwendung | Referenz |
|------------------|---------------------------------|---|----------------------------------|--|
| Lumafast | <i>Pseudomonas menodocina</i> | GENENCOR INTERNATIONAL, USA | Detergenz | JAEGER <i>et al.</i> , 1994; JAEGER & REETZ 1998 |
| Lipomax | <i>P. alcaligenes</i> | GIST-BROCADES, Niederlande, GENENCOR INTERNATIONAL, USA | Detergenz | JAEGER <i>et al.</i> , 1994; JAEGER & REETZ 1998 |
| Lipase 50P | <i>Chromobacterium viscosum</i> | BIOCATALYSTS, UK | Biotransformationen, Chemikalien | GODFREY & WEST, 1996 |
| Combizyme 23P | nicht spezifiziert | BIOCATALYSTS, UK | Abfallbehandlung | GODFREY & WEST, 1996 |
| Greasex (Lipase) | nicht spezifiziert | NOVO NORDISK, Dänemark | Leder | GODFREY & WEST, 1996 |

1.1.1 Die Definition von Lipasen

Nach der ersten Beschreibung von EIJKMANN im Jahre 1901 wurde lipolytische Aktivität durch HOLWERDA *et al.* (1936) und SCHÖNHEYDER & VOLQVARTZ (1945) erstmals umfassender charakterisiert. In der darauf folgenden Zeit wurde die Definition von „Lipase“ mehrfach verändert. In frühen vergleichenden Studien wurde von SARDA & DESNUELLE (1958) festgestellt, dass es unter den gegebenen Versuchsbedingungen Unterschiede im kinetischen Verhalten von Lipasen und Esterasen gab. Lipasen wurden daraufhin als lipolytische Enzyme definiert, die bei dem Überschreiten der kritischen Micellarkonzentration des Substrates einen sprunghaften Anstieg der Aktivität zeigten („Interphasen-Aktivierung“), während Esterasen einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik folgen sollten. Diese Bevorzugung von wasserunlöslichen Substraten durch die Lipasen wurde durch eine notwendige Konformationsänderung strukturell erklärt (DESNUELLE, 1960). Unterstützung fand diese These nach der Aufklärung der ersten beiden 3D-Strukturen von Lipasen, der Pankreas-Lipase des Menschen und der Lipase aus *Rhizomucor miehei* (BRADY *et al.*, 1990; WINKLER *et al.*, 1990). Bei beiden Lipasen wird das aktive Zentrum durch eine Peptidkette, die auch als „Deckel“-Domäne bezeichnet wird, verdeckt. Die „Interphasen-Aktivierung“ wurde anschließend durch eine Reorientierung der „Deckel“-Domäne bei Kontakt mit einer Substrat-Wasser-Interphase erklärt und später durch die Auflösung der Strukturen der Enzyme mit gebundenem Inhibitor bestätigt (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991). Während der letzten Dekade wurde eine große Anzahl Lipasen isoliert, charakterisiert und in ihrer 3D-Struktur aufgeklärt. Unter ihnen fanden sich auch Enzyme ohne „Deckel“-Domäne und ohne „Interphasen-Aktivierung“ wie zum Beispiel die Pankreas-Lipase des Meerschweinchens, die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* und die Lipasen aus *Bacillus subtilis* (MARTINEZ *et al.*, 1992; HJORTH *et al.*, 1993; LESUISSE *et al.*, 1993; VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001; EGGERT *et al.*, 2000; EGGERT *et al.*, 2001).

Des Weiteren wurden Lipasen mit „Deckel“-Domäne aber ohne „Interphasen-Aktivierung“, wie zum Beispiel die Lipasen aus *P. glumae*, *P. aeruginosa* und *Candida antarctica* B sowie die Pankreas-Lipase aus *Myocastor coypus* (JAEGER *et al.*, 1993; NOBEL *et al.*, 1993; THIRSTRUP *et al.*, 1994; UPPENBERG *et al.*, 1994; VERGER, 1997), charakterisiert. Die *Staphylococcus hyicus*-Lipase zeigte nur mit bestimmten Substraten „Interphasen-Aktivierung“ (VAN OORT *et al.*, 1998). Eine Definition der Lipasen über die „Interphasen-Aktivierung“ oder über die „Deckel“-Domänen erschien aufgrund dieser Ausnahmen als wenig sinnvoll. 2002 wurde von FOJAN *et al.* eine Unterscheidung von Lipasen und Esterasen durch das Muster der hydrophoben Aminosäuren um das aktive Zentrum vorgeschlagen. Für diese

Art der Unterscheidung ist jedoch die Kenntnis der 3D-Struktur des jeweiligen Enzymes vonnöten. Heute werden Lipasen als Carboxyl-Ester-Hydrolasen definiert, die im Gegensatz zu den Esterasen die Fähigkeit besitzen, wasserunlösliche und langkettige (Kettenlänge $C > 9$) Triacylglycerole zu spalten. Dabei können Lipasen durchaus auch kurzkettigere „Esterase-Substrate“ spalten, sie besitzen aber maximale Aktivität gegenüber Substraten, die Emulsionen bilden (VERGER, 1997; CHAHINIAN *et al.*, 2002).

1.1.2 Die Struktur und der katalytische Mechanismus von Lipasen

Nach der Auflösung der ersten beiden 3D-Strukturen von Lipasen (BRADY *et al.*, 1990; WINKLER *et al.*, 1990) wurden viele weitere Lipase-Strukturen bestimmt. Eine Zusammenstellung von Lipasen und Lipase-Strukturen findet sich auf der Internet-Homepage des INSTITUTS FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE der UNIVERSITÄT STUTTGART (FISCHER & PLEISS, 2003), auf der zur Zeit 806 Lipasen und 197 Lipase-Strukturen aufgelistet sind. Allen gemeinsam ist ein charakteristisches Faltungsmuster, das α/β -Hydrolasemotiv, welches 1992 von OLLIS *et al.* beschrieben wurde und das auch eine Vielzahl von anderen Enzymen mit sehr unterschiedlichen Aminosäuresequenzen und Substratspezifitäten (HEIKINHEIMO *et al.*, 1999; NARDINI & DIJKSTRA, 1999; HOTELIER *et al.*, 2004), wie zum Beispiel Haloalkandehalogenasen, Carboxypeptidasen und Epoxid-Hydrolasen (FRANKEN *et al.* 1991; OLLIS *et al.*, 1992; ZOU *et al.*, 2000), auszeichnet. α/β -Hydrolasen besitzen ein zentrales und paralleles, aus acht Strängen bestehendes (der 2. Strang ist antiparallel ausgerichtet) β -Faltblatt, das auf beiden Seiten durch α -Helices flankiert ist. Diese verbinden die parallelen Stränge $\beta 3$ bis $\beta 8$. Die einzelnen β -Stränge sind so gegeneinander verdreht, dass die außenliegenden Stränge in einem 90° -Winkel zueinander liegen. Dieser Aufbau dient der Bildung und Ausrichtung der hochkonservierten katalytischen Triade zum aktiven Zentrum, welches bei den Lipasen aus den Aminosäuren Serin, Aspartat oder Glutamat und Histidin gebildet wird.

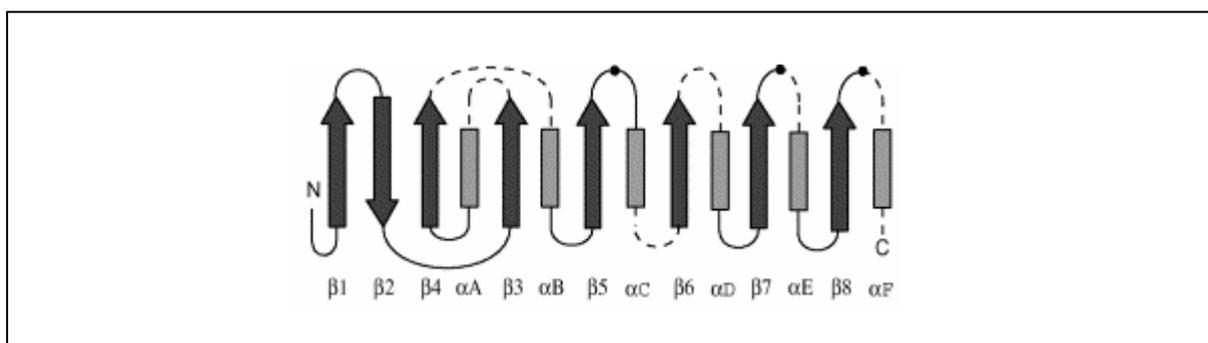


Abb. 2: Allgemeines Faltungsmuster der α/β -Hydrolasen (VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001). In diesem Bild sind die α -helicalen Regionen der Proteine als Balken, die β -Stränge als Pfeile dargestellt. Die Lage der katalytischen Triade ist mit Punkten markiert.

Das nukleophile Serin befindet sich eingebettet in einem hochkonservierten Gly-X-Ser-X-Gly-Pentapeptid, in einem scharfen γ -„turn“ zwischen dem β 5-Strang und der darauffolgenden α -Helix. Der γ -„turn“ zeichnet sich durch energetisch ungünstige Torsionswinkel im Peptidrückgrat aus, welche erforderlich sind, um das Serin in eine exponierte Position zu bringen, von der aus es sowohl mit dem Substrat als auch mit den anderen katalytisch aktiven Aminosäuren wechselwirken kann. Die saure, katalytisch aktive Aminosäure befindet sich meist hinter dem β 7-Strang und der katalytisch aktive Histidinrest hinter dem β 8-Strang (OLLIS *et al.*, JAEGER *et al.*, 1999). Bei vielen Lipasen wird das aktive Zentrum durch eine sogenannte „Deckel“-Domäne verdeckt. Bei Kontakt mit einer Lipid-Wasser-Phase erfolgt eine strukturelle Änderung und die „Deckel“-Domäne wird geöffnet, womit das aktive Zentrum dem Substrat zugänglich wird (BRZOWSKI *et al.*, 1991; DEREWENDA *et al.*, 1992; VAN TILBEURGH *et al.*, 1993). Dabei bilden Struktur und Zusammensetzung der „Deckel“-Domäne einen Teil des aktiven Zentrums und sind entscheidende Faktoren im Hinblick auf die Substratspezifität des jeweiligen Enzyms (THIRSTRUP *et al.*, 1993; EGLOFF *et al.*, 1995; CARRIÈRE *et al.*, 1997; SECUNDO *et al.*, 2004).

Der Reaktionsmechanismus der Lipasen gleicht dem der Serin-Proteasen und wurde durch verschiedene Strukturanalysen mit gebundenem Lipase-Inhibitor bestätigt (Abb. 3):

Der nukleophile Angriff des Sauerstoff-Atoms der Serinseitenkette auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom der zu spaltenden Esterbindung führt zu der Ausbildung der ersten tetraedrischen Zwischenstufe, die dem Übergangszustand energetisch und strukturell am ähnlichsten ist. Bei diesem Angriff wird der nukleophile Charakter des Serins durch die Abstraktion eines Protons durch das katalytisch aktive Histidin verstärkt. Der Imidazolring des Histidins wird mit Hilfe des Glutamat/Aspartat-Restes korrekt ausgerichtet. Dieser Rest gleicht auch eine am Histidin-Rest entstehende positive Ladung aus. Die negative Ladung des Carbonyl-Sauerstoffs während des Übergangszustandes wird durch das sogenannte „Oxyanion hole“ des Enzyms stabilisiert. Dieses wird aus zwei Amid-Gruppen des Peptid-Rückgrats gebildet (eines hinter dem aktiven Serin und eines am Ende des β 3- Stranges) (KAZLAUSKAS, 1994; SCHRAG *et al.*, 1997; LANG *et al.*, 1998).

Der Alkohol wird durch den Transfer des Protons vom Histidin auf das Sauerstoffatom des Esters im tetraedrischen Übergangszustand freigesetzt. Die Deacylierung des zurückbleibenden Acyl-Enzymkomplexes erfolgt durch den Angriff eines Nukleophils, das durch das Histidin durch die Abstraktion eines Protons aktiviert wurde (Wasser im Fall der Hydrolyse). Das Nukleophil greift das Carbonyl-Kohlenstoffatom der kovalent am Enzym gebundenen Acylgruppe an. Dabei wird ein zweiter Übergangszustand gebildet, der wiederum durch das

„Oxyanion hole“ des Enzymes stabilisiert wird. Der Histidinrest überträgt ein Proton auf das Sauerstoff-Atom des Serins und die Acylgruppe wird vom Enzym freigesetzt (JAEGER *et al.*, 1999).

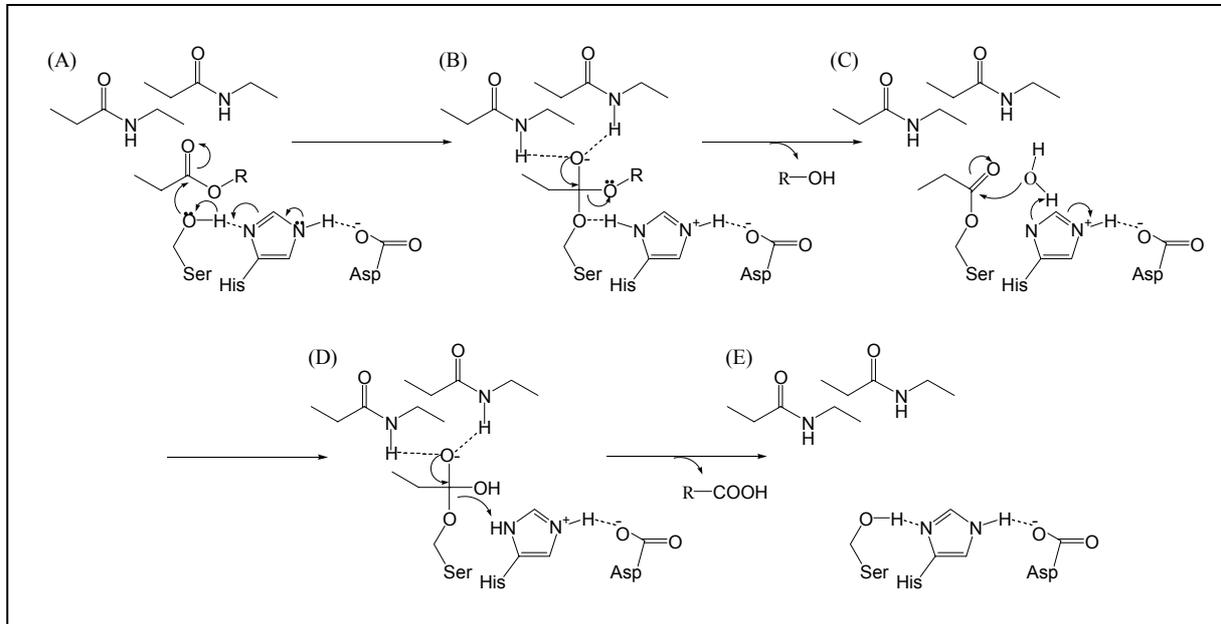


Abb. 3: Der Katalyse-Mechanismus von Lipasen (nach JAEGER *et al.*, 1999). Dargestellt sind die katalytisch aktiven Aminosäurereste Serin (Ser), Histidin (His) und Aspartat (Asp) sowie die für die Bildung des „Oxyanion hole“ wichtigen NH-Gruppen des Peptid-Rückgrades der Lipase. (A) Nach Aktivierung des Serins durch das Histidin erfolgt der nukleophile Angriff der Hydroxylgruppe des Serinrestes auf das Carbonyl-Kohlenstoff des zu spaltenden Esters. (B) Das gebildete tetraedische Intermediat wird am negativ geladenen Sauerstoffatom durch Wasserstoffbrücken zum „Oxyanion hole“ stabilisiert. (C) Durch Veresterung der Fettsäure mit dem Serin bildet sich ein kovalentes Zwischenprodukt. (D) Zweites tetraedisches Intermediat, das durch das „Oxyanion hole“ stabilisiert wird. (E) Das Enzym setzt die Fettsäure frei und kann ein neues Substrat binden.

1.1.3 Die Lipasen LipA und LipB aus *Bacillus subtilis*

B. subtilis ist ein Gram-positives, aerobes und Endosporen-bildendes Bakterium, das vor allem im Boden, in Gewässern und in Verbindung mit Pflanzen vorkommt. Sein Genom, sein Proteom und sein Sekretom sind sehr gut untersucht (KUNST *et al.*, 1997; HIROSE *et al.*, 2000; TJALSMA *et al.*, 2000). Von der FOOD AND DRUG ADMINISTRATION als „generally regarded as safe“ eingestuft, ist das Bakterium durch seine hohen Expressionsausbeuten sowohl homologer als auch heterologer Proteine als Wirt für industrielle Anwendungen hochinteressant (HARWOOD, 1992; SCHALLMEY *et al.*, 2004).

B. subtilis sekretiert mehrere extrazelluläre Enzyme. Dazu gehören neben 6 verschiedenen Proteasen, einer Levansucrase und mehreren β -Glucanasen mindestens zwei lipolytische Enzyme (FERRARI *et al.*, 1993): die Lipase LipA (BSLA) und die Esterase LipB (BSLB) (EGGERT *et al.*, 2000). Die physiologischen Rollen beider Enzyme für *B. subtilis* sind zurzeit noch nicht abschließend erforscht (EGGERT *et al.*, 2003).

Die BSLA rückte nach der Klonierung des *lipA*-Genes von DARTOIS *et al.* (1992 und 1994) und nach Expression, Reinigung und biochemischer Charakterisierung des Proteins durch LESUISSE *et al.* (1993) in das Interesse der Forschung, da das Enzym mehrere biotechnologisch interessante Eigenschaften vorwies: Mit 19348 Dalton (181 Aminosäuren) handelte es sich um die bis dahin kleinste bekannte Lipase. Diese hatte einen ungewöhnlich hohen pI-Wert von 9,9. Die Lipase zeigte maximale Stabilität bei einem pH-Wert von 12 und maximale enzymatische Aktivität bei einem pH-Wert von 10. Das bis 45 °C thermostabile Enzym hatte ein breites Substratspektrum gegenüber Triacylglyceriden und *p*-Nitrophenylestern mit unterschiedlichen Längen der Fettsäureseitenketten, zeigte aber keine „Interphasen-Aktivierung“. Ester mit C8-Acylgruppen wurden bevorzugt gespalten. Es wurden jedoch auch Substrate mit länger-kettigen Acylgruppen akzeptiert. Durch Zugabe von Detergenzien konnten Steigerungen der lipolytischen Aktivität des Enzyms erreicht werden (LESUISSE *et al.*, 1993; EGGERT, 2001).

Das später entdeckte *lipB*-Gen wurde kloniert und nach dessen Expression wurde das BSLB-Protein im Vergleich zur BSLA charakterisiert. Die BSLB (19490 Dalton, 182 Aminosäuren) ist auf Aminosäure-Ebene zu 74 % mit der BSLA identisch und zeigte fast gleiche Temperatur- und pH-Wert-Stabilitäten. Beide Enzyme konnten durch Inkubation mit unterschiedlichen Detergenzien in ihrer enzymatischen Aktivität gesteigert werden. Unterschiede ergaben sich während der Aufnahme von Substratspektren gegenüber einer Reihe von Substraten mit jeweils unterschiedlichen Längen der Fettsäureseitenketten. Da die BSLB im Gegensatz zu der BSLA keinerlei hydrolytische Aktivität gegenüber dem typischen Lipase-Substrat Triolein (C18:1) aufwies und deutliche Präferenzen für Substrate mit Acyl-Kettenlängen von C4-C8 (Maximum bei C8/C14) zeigte, wurde das Enzym zunächst als Esterase klassifiziert (EGGERT *et al.*, 2000; 2001 und 2002). Neueren Erkenntnissen nach spaltet die BSLB bevorzugt in micellarer Form vorliegende Substrate, was wiederum auf Lipase-typische Eigenschaften des Proteins hindeutet (VERGER, persönl. Mitteilung).

Auf Aminosäure-Ebene zeigen die BSLA und die BSLB statt des üblichen, für Lipasen typische Konsensusmotivs Gly-X-Ser-X-Gly (OLLIS *et al.*, 1992; NARDINI & DIJKSTRA, 1999) das Konsensusmotiv Ala-X-Ser-X-Gly. Dies haben sie mit anderen beschriebenen Lipasen aus *Bacillus* (MÖLLER *et al.*, 1991; DARTOIS *et al.*, 1992, NTHANGENI *et al.*, 2001) gemeinsam. Aufgrund von Sequenzhomologien werden die BSLA und die BSLB in dem von ARPIGNY & JAEGER (1999) vorgeschlagenen System zur Gliederung lipolytischer Enzyme der Familie der echten Lipasen, Unterfamilie 1.4, zugeordnet (JAEGER & EGGERT, 2002). Die Bedeutung des Konsensusmotivs Ala-X-Ser-X-Gly für die BSLB wurde 2000 von

EGGERT *et al.* untersucht. Ein Austausch des Alanins im Konsensusmotiv zu einem Glycin führte zu einem Enzym mit völlig neuen Eigenschaften.

2001 wurde von VAN POUDEROYEN *et al.* die Kristallstruktur der BSLA mit Röntgen-diffraktometrie und einer Auflösung von 1,5 Å aufgelöst. Bei der BSLA handelt es sich um ein globuläres Enzym mit den Ausmaßen 35 Å x 36 Å x 42 Å. Es besteht, wie in Abb. 4 ersichtlich, aus einer kompakten Domäne, die sich aus 6 parallel angeordneten β -Strängen mit 2 α -Helices auf der einen Seite und 3 α -Helices auf der anderen Seite zusammensetzt.

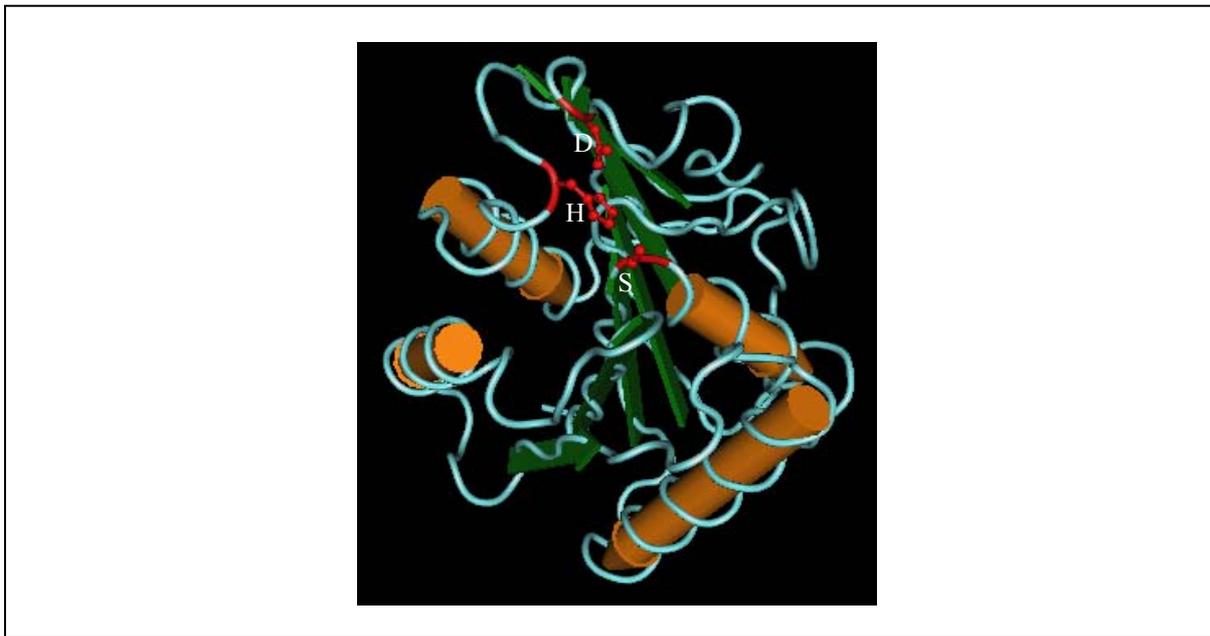


Abb. 4: Struktur der BSLA als schematische Abbildung (nach POUDEROYEN *et al.*, 2001). Die Seitenketten der katalytischen Triade Ser77 (S), Asp133 (D) und His156 (H) werden in roter „ball-and-stick“-Darstellung präsentiert.

Vergleicht man die Strukturelemente der BSLA mit den typischen Strukturelementen von α/β -Hydrolasen, fehlen die ersten beiden β -Stränge $\beta 1$ und $\beta 2$. Die α -Helix αD wird durch eine kleine 3_{10} -Helix ersetzt. Die α -Helices αA , αD und αF enthalten ebenfalls 3_{10} -Helices, die α -Helix αE ist außergewöhnlich klein. Der BSLA fehlt die sog. „Deckel“-Struktur, so dass die katalytische Triade frei zugänglich ist. Das Enzym gilt als „minimale“ α/β -Hydrolase, deren katalytische Triade sich aus den Aminosäuren Ser77, Asp133 und His156 zusammensetzt. Das zur Stabilisierung des Übergangszustandes essentielle „Oxianion-hole“ wird von den Aminosäuren Ile12 und Met78 gebildet.

2002 wurde die Kristallstruktur der BSLA von KAWASAKI *et al.* ein zweites Mal mit einer Auflösung von 1.3 Å gelöst. Im Gegensatz zu VAN POUDEROYEN *et al.* beschrieben die

Autoren alternierende Seitenketten-Konformationen des katalytisch aktiven Ser77, welche mit aktiven und inaktiven Zuständen des Enzyms einhergehen sollen. Auf Strukturebene mit der BSLA vergleichbare Hydrolasen mit ebenfalls minimalem Faltungsmotiv und fehlender „Interphasen-Aktivierung“ sind die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* (LONGHI *et al.*, 1997) und die Acetylxylosterase aus *Penicillium purpurogenum* (GHOSH *et al.*, 1999). Auch für diese Enzyme wurden alternierende Konformationen des katalytisch aktiven Serins beschrieben.

1.2 Industrielle Biokatalyse

Die erste industrielle Anwendung von Biokatalysatoren war die Herstellung von Essigsäure aus Ethanol durch Hefezellen, die schon 2000 vor Christus in größerem Maßstab durchgeführt wurde (LIESE *et al.*, 2000). 1857 identifizierte LOUIS PASTEUR bei der Fermentation von Hefebakterien erstmals Biokatalysatoren als aktive Spezies in Fermentationsprozessen. Im Jahr 1858 beschrieb PASTEUR die erste kinetische Racematspaltung durch Mikroorganismen zur Darstellung von (-)-Weinsäure aus dem racemischen Natrium-Ammoniumsalz der Traubensäure mit Hilfe des Schimmelpilzes *Penicillium glaucum*. Der Begriff *en zym* (griech.: im Sauerteig) wurde 20 Jahre später von KÜHNE geprägt (1876). Die katalytische Aktivität der von ihm so bezeichneten nichtzellulären löslichen Bestandteile in einem Fermentationsprozess wurde 1897 durch BUCHNER bewiesen. 1930 wurde die chemische Umsetzung von 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon zu dem Antihistaminikum D-(-)-Ephedrin durch die KNOLL-AG, Ludwigshafen, von HILDEBRANDT & KLAVEHN patentiert, nachdem 1921 von NEUBERG & HIRSCH eine hefekatalysierte Kondensationsreaktion von Benzaldehyd mit Brenztraubensäure zu optisch aktivem 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon beschrieben worden war.

Heute werden sowohl Ganz-Zell-Systeme als auch isolierte Enzyme als Biokatalysatoren (GROTE & ANTRANIKIAN, 2003) in einer wachsenden Vielzahl von Anwendungen eingesetzt (LIESE *et al.*, 2000; ZAKS, 2001; STRAATHOF *et al.*, 2002; SCHOEMAKER *et al.*, 2003; CHEETHAM, 2004). Ein kurzer Überblick ist in Tab. 2 gegeben.

In der chemischen Industrie haben Biokatalysatoren seit der Mitte der achtziger Jahre vor allem in der stereoselektiven Synthese eine bedeutende Rolle gewonnen, mit der enantiomerenreine Verbindungen für den Pharma, Agro- und Lebensmittelsektor hergestellt werden können (SYLDATK *et al.*, 2001; BREUER *et al.*, 2004). Der Bedarf an enantiomerenreinen Komponenten durch die chemische- und pharmazeutische Industrie wächst stetig.

Tab. 2: Überblick über wichtige industrielle Biokatalyseverfahren nach SYLDATK *et al.*, 2001.

| Enzym | Maßstab [t/a] | Produkt | Firma |
|--|---------------|--|--|
| Glucoseisomerase | > 1.000.000 | Isosirup | Verschiedene |
| Nitrilhydratase Lipase aus <i>Mucor mihei</i> | > 10.000 | Acrylamid, Kakaobutter | NITTO, DSM, FUJI OIL Co., UNILEVER |
| Penicillinamidase | > 1.000 | 6-APA | Verschiedene |
| Aspartase | > 1.000 | <i>L</i> -Asp | TANABE |
| Hydantoinase/Carbamoylase | > 1.000 | <i>D</i> -Phg | Verschiedene |
| Lipase | > 1.000 | (<i>S</i>)-Methoxyiso- propylamin | BASF |
| Fumarase | > 100 | <i>L</i> -Malat | TANABE |
| Nitrilase | > 100 | (<i>R</i>)-Mandelsäure | BASF |
| Lipase | > 100 | optisch aktive Amine | BASF |
| Lipase | > 100 | optisch aktive Alko- hole | BASF |
| Lipase | > 10 | (<i>R</i>)-Glycidylbutarat | LONZA |

Der Weltumsatz enantiomerenreiner Wirkstoffe stieg von 133 Mrd. Dollar im Jahre 2000 auf 147 Mrd. Dollar im Jahre 2001. Der weltweite Absatz von chiralen, enantiomerenrein verkauften Feinchemikalien soll von 7 Mrd. Dollar (2002) bis zum Jahre 2009 auf 14,94 Mrd. Dollar steigen. Der Anteil der durch Biokatalyse hergestellten Produkte stieg gegenüber den mit traditionell-chemisch hergestellten Produkten von 10 % in 2000 auf 22 % in 2004 (STINSON, 2001; ROUHI, 2002; ROUHI, 2004). Vorteile von Biokatalysatoren sind neben der hohen Stereoselektivität deren hohe Substratspezifität, Regioselektivität und die hohe spezifische Aktivität. Biokatalysatoren arbeiten oft umweltfreundlich in wässrigem Milieu unter milden Reaktionsbedingungen, häufig ohne dass dabei Nebenprodukte entstehen. Trotz der genannten Vorteile werden aber erst relativ wenige Biokatalysatoren im industriellen Maßstab angewendet. Während eines Prozesses können sich zahlreiche Schwierigkeiten bezüglich des Enzyms ergeben: mangelnde Aktivität oder Selektivität, begrenztes Substratspektrum, Beschränkung der Anwendung auf wässrige Systeme, teure Herstellung oder Isolierung des Biokatalysators oder der Reaktionsprodukte, Abhängigkeit von Kofaktoren, Proteininstabilität oder Substrat-/Produkthemmungen (POWELL *et al.*, 2001; SCHMID *et al.*, 2001; STRAATHOF *et al.*, 2002).

Um den dadurch ständig bestehenden Bedarf an neuen oder in ihren Eigenschaften verbesserten Biokatalysatoren zu decken, sind verschiedene Vorgehensweisen möglich: (1) Das Durchmustern von aus der Umwelt isolierten, bakteriellen Kulturen nach nützlichen enzyma-

tischen Aktivitäten (DALBØGE & LANGE, 1998; OGAWA & SHIMIZU, 1999; ZENGLER *et al.*, 2002). Es sind jedoch nur geschätzte 0,001-1,0 % der in natürlichen Habitaten vorkommenden Mikroorganismen unter Laborbedingungen kultivierbar (MILLER, 2000). (2) Vergleich der Aminosäuresequenzen von Proteinen mit unbekannter Funktion mit denen bekannter Enzyme aus den Protein-Datenbanken („*database mining*“) [MARRS *et al.*, 1999; WACKETT, 2004]. (3) direkte Klonierung der in einer Umweltprobe vorhandenen enzymkodierenden DNA-Fragmente mit anschließender Expression der Gene und dem Durchmustern der entstehenden Proteine auf bestimmte Enzymaktivitäten (Metagenom-Ansätze) (VOGET *et al.*, 2003; STREIT *et al.*, 2004). (4) Anpassung von bereits bekannten Enzymen an die geforderten Prozessbedingungen. Dabei sind zwei verschiedene Ansätze möglich: (i) rationales Protein-Design und ii) die gerichtete Evolution, die in dem Abschnitt 1.4 beschrieben werden soll (NESS *et al.*, 2000; ARNOLD, 2001; POWELL *et al.*, 2001; REETZ 2002; HULT & BERGLUND, 2003; REETZ, 2004).

Beim rationalen Protein-Design können ausgehend von der Proteinstruktur und dem Reaktionsmechanismus mit den Methoden des „molecular modelling“ Einblicke in die Struktur-/Funktionsbeziehungen von Enzymen gewonnen und die Eigenschaften der Enzyme durch ortsspezifische Mutagenese verbessert werden. Einige Jahre zuvor galten solche Ansätze, vor allem in Bezug auf Enantioselektivität, als wenig vorhersagbar (KAZLAUSKAS, 2000; REETZ & JAEGER, 2000; ARNOLD, 2001). Heute sind durch verbesserte Kristallographie- und NMR-Techniken zahlreiche Proteinstrukturen gelöst, das Verständnis von Struktur-/Funktionsbeziehungen wächst, und es sind viele Beispiele der erfolgreichen rationalen Optimierung von Proteinen (CEDRONE *et al.* 2000; PETERSSON *et al.*, 2002; BRANNEYBY *et al.*, 2003), auch in Bezug auf ihre Selektivität (CHEN-GOODSPEED *et al.*, 2001; ROTTICCI *et al.*, 2001; MUGFORD *et al.*, 2004), beschrieben. Im Labor durchgeführte Studien zur gerichteten Evolution können durch verbesserte *in silico* Methoden rational gedeutet werden (BOCOLA *et al.*, 2004).

1.3 Die gerichtete Evolution von Biokatalysatoren

„The key (of breeding) is man’s power of accumulative selection: nature gives successive variations, man adds them up in certain directions useful to them“ CHARLES DARWIN, 1859

Mit Hilfe der gerichteten Evolution kann der natürliche Prozess der Evolution, also der von C. DARWIN schon 1859 beschriebene Weg des „survival of the fittest“, dem ungerichteten, zufälligen Verändern von Eigenschaften mit anschließender natürlicher Selektion des am besten angepassten Organismus, in verkürzter Zeit im Labor nachgeahmt werden. In diesem Prozess wird durch verschiedene molekularbiologische Methoden genetische Diversität in einem Ziel-

gen hervorgerufen. Nach erfolgter Expression werden die so entstandenen, unterschiedlichen Protein-Varianten auf die gewünschten Eigenschaften getestet. Nach dem ersten Durchmuster der Proteinbanken kann die DNA verbesserter Varianten einem neuen Zyklus der gerichteten Evolution unterzogen werden (Abb. 5).

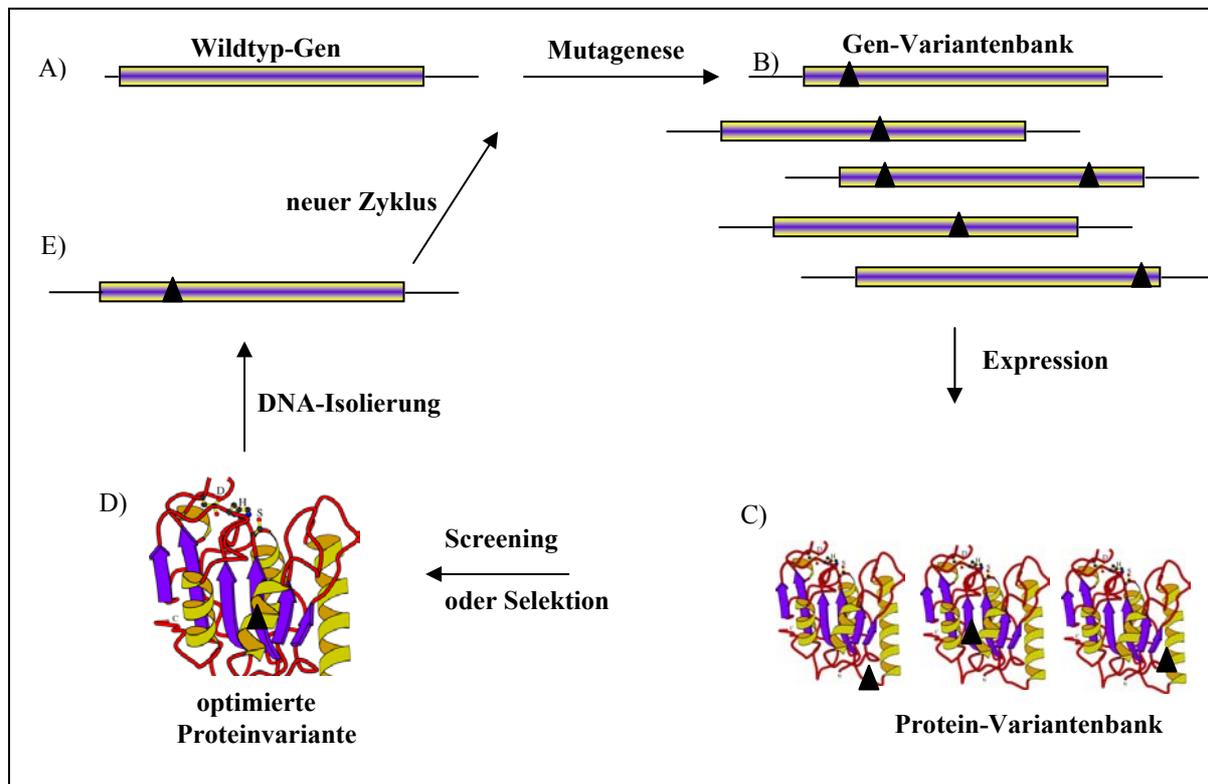


Abb. 5: Allgemeine Strategie der gerichteten Evolution. Ausgehend von einem oder mehreren Wildtyp-Genen (A) werden mit unterschiedlichen Methoden Genvarianten (B) hergestellt, die anschließend exprimiert werden. Die erhaltenen Protein-Variantenbanken (C) werden auf die gewünschte, zu optimierende Eigenschaft durch Selektion oder Screening überprüft. Die DNA ausgewählter Proteinvarianten (hier: LipA aus *B. subtilis*, VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001) (D) wird isoliert (E) und kann dann einem neuen Zyklus der gerichteten Evolution unterzogen werden. Schwarze Dreiecke stellen mutierte Gen-/Proteinbereiche dar.

Für die Anwendung dieser Methode sind weder strukturelle noch mechanistische Kenntnisse von dem zu optimierenden Enzym nötig (ROBERTS *et al.*, 1992; CHEN & ARNOLD, 1993). In Kombination mit anderen, biochemischen oder biophysikalischen Methoden, wie kinetischen oder thermodynamischen Analysen und Röntgen-Kristallographie und/oder mit „*in silico*“-Methoden, können Kenntnisse über Struktur-/Funktionsbeziehungen von Proteinen gewonnen werden oder die gerichtete Evolution kann durch Vorauswahl der zu verändernden Proteinregionen erleichtert werden (HORSMAN *et al.*, 2003; KOGA *et al.*, 2003; BOCOLA *et al.*, 2004).

Das Prinzip der gerichteten Evolution wurde erstmals 1967 von MILLS *et al.* für Nukleinsäuren vorgestellt. EIGEN (1984) und KAUFFMAN (1993) leisteten weitere Pionierarbeit, bis

CHEN & ARNOLD (1993) und ROBERTS *et al.* (1992) das Prinzip der gerichteten Evolution erstmals für die Optimierung von Biokatalysatoren nutzten. Seit dem Beginn der neunziger Jahre wächst die Zahl der Veröffentlichungen zum Thema „gerichtete Evolution“ nahezu exponentiell an, ein Trend, von dem erwartet wird, dass er noch einige Jahre anhalten wird (JAEGER & EGGERT, 2004; ZHAO & ZHA, 2004).

Durch das Durchmustern von Proteinbanken mit unterschiedlichem „Selektionsdruck“ konnten bis heute zahlreiche Enzyme mit veränderten Eigenschaften evolviert werden. Beispiele sind in Tab. 3 angegeben. Dabei konnten Enzyme auch zeitgleich bezüglich zweier oder mehrerer Eigenschaften optimiert werden (NESS *et al.*, 1999; MIYAZAKI *et al.*, 2000; GLIEDER *et al.*, 2002). Im unteren Teil der Tabelle sind Enzyme angegeben, die in ihrer Enantioselektivität verbessert wurden.

Tab. 3: Beispiele für die Optimierung von verschiedenen Enzymen durch gerichtete Evolution.

| Enzym-Typ | optimierte Eigenschaft | Referenz |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Esterase | Substratspezifität | BORNSCHEUER <i>et al.</i> , 1999 |
| Cephalosporin-Acylase | Substratspezifität | OTTEN <i>et al.</i> , 2002 |
| Glycosynthase | Aktivität | KIM <i>et al.</i> , 2004 |
| Peroxidase | Expression | LIN <i>et al.</i> , 1999 |
| Laccase | Expression | BULTER <i>et al.</i> , 2003 |
| Amylase | Thermostabilität | KIM <i>et al.</i> , 2003 |
| Peroxygenase | Thermostabilität | SALAZAR <i>et al.</i> , 2003 |
| Lipase | Thermostabilität | ZHANG <i>et al.</i> , 2003 |
| Protease | Lösungsmittelstabilität | CHEN & ARNOLD, 1993 |
| Phospholipase | Lösungsmittelstabilität | SONG & RHEE, 2001 |
| Aldolase | Enantioselektivität | WILLIAMS <i>et al.</i> , 2003 |
| Aldolase | Enantioselektivität | WADA <i>et al.</i> , 2003 |
| Amin-Oxidase | Enantioselektivität | CARR <i>et al.</i> , 2003 |
| Cyclohexanon-Monooxygenase | Enantioselektivität | REETZ <i>et al.</i> , 2004b |
| Epoxid-Hydrolase | Enantioselektivität | REETZ <i>et al.</i> , 2004a |
| Epoxid-Hydrolase | Enantioselektivität | VAN LOO <i>et al.</i> , 2004 |
| Hydantoinase | Enantioselektivität | MAY <i>et al.</i> , 2000 |
| Nitrilase | Enantioselektivität | DESANTIS <i>et al.</i> , 2003 |

Bis heute gibt es nur wenige Beispiele für die Veränderung der Enantioselektivität von Lipasen oder Esterasen durch gerichtete Evolution. Beispiele sind in Tab. 4 aufgeführt.

Die Bedingungen für die erfolgreiche Optimierung eines Enzyms durch gerichtete Evolution sind die Auswahl der optimalen Mutagenese-Strategie aus der Vielzahl der zurzeit veröffent-

lichten Methoden und die Entwicklung eines passenden Hochdurchsatz-Musterungs-Ansatzes (Screening) (REETZ, 2004).

Tab. 4: Beispiele für die Optimierung enantioselektiver Lipasen oder Esterasen mit Hilfe der gerichteten Evolution.

| Enzym | enantiomerenreines Produkt | Referenz |
|--|---|---|
| Lipase (<i>P. aeruginosa</i>) | (<i>S</i>)-2-Methyldekansäure | REETZ <i>et al.</i> , 1997 LIEBETON <i>et al.</i> , 2000 REETZ <i>et al.</i> , 2001 |
| Lipase (<i>P. aeruginosa</i>) | (<i>R</i>)-2-Methyldekansäure | ZHA <i>et al.</i> , 2001 |
| Lipase A (<i>B. subtilis</i>) | <i>meso</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten | EGGERT, 2001 FUNKE <i>et al.</i> , 2003 |
| Esterase (<i>P. fluorescens</i>) | 3-Phenylbutyrat-Resorofin-Ester | HENKE & BORNSCHEUER, 1999 |
| Esterase (<i>P. fluorescens</i>) | (<i>S</i>)-3-Bromo-2-methylpropanoat; Ethyl-(<i>R</i>)-3-phenylbutyrat | HORSMAN <i>et al.</i> , 2003 |
| KWI-56 Lipase (<i>Burkholderia cepacia</i>) | Ethyl-3-phenylbutyrat | KOGA <i>et al.</i> , 2003 |

1.3.1 *In vitro* Mutagenese-Methoden

In den letzten Jahren ist von unterschiedlichen Autoren eine große Vielzahl von *in vitro*-Mutagenese-Methoden publiziert worden. Diese stellen im Prinzip Weiterentwicklungen der fehlerhaften PCR (TINDALL & KUNKEL, 1988; ECKERT & KUNKEL, 1990; CIRINO *et al.*, 2003) und des DNA-Shufflings (STEMMER, 1994a+b), beides Meilensteine der Methoden zur gerichteten Evolution, dar (LUTZ & PATRICK, 2004). In diesem Abschnitt soll ein kurzer Überblick über einige ausgesuchte Methoden gegeben werden.

Durch die *in vitro* Mutagenese-Methoden werden die beiden natürlichen Evolutionsprozesse zur Erlangung von Diversität auf DNA-Ebene imitiert: 1) die Zufallsmutagenese, die in der Natur durch Fehler bei der DNA-Replikation auftritt und 2) die Rekombination. Die Zufallsmutagenese kann in vier Klassen eingeteilt werden: a) Basenaustausch b) Basendeletion c) Baseninsertion oder d) Baseninversion (LI & GRAUR, 1991).

Zu den Klassen a-c konnten erfolgreich *in vitro* Mutagenese-Methoden entwickelt werden, die zum Teil in Tab. 5 wiedergegeben sind.

Tab. 5: Auflistung einiger wichtiger, nichtrekombinativer oder rekombinativer *in vitro* Mutagenese-Methoden.

| Methode | Referenz |
|---|---|
| <u>Nichtrekombinative Methoden</u> | |
| epPCR | TINDALL & KUNKEL, 1988; ECKERT & KUNKEL, 1990 |
| Kombinatorische Kassettenmutagenese | CRAMERI & STEMMER, 1995 |
| Mutatorstämme | GREENER <i>et al.</i> , 1996 |
| Sättigungsmutagenese | AIRAKSINEN & HOVI, 1998 GEORGESCU <i>et al.</i> , 2003 |
| Random Insertion/Deletion Mutagenesis (RID) | MURAKAMI <i>et al.</i> , 2002 |
| MAX Randomization | HUGHES <i>et al.</i> , 2003 |
| Codon-Shuffling | CHOPRA <i>et al.</i> , 2003 |
| Sequence Saturation Mutagenesis (SeSaM) | WONG <i>et al.</i> , 2004 |
| <u>Rekombinative, homologieabhängige Methoden</u> | |
| DNA-Shuffling | STEMMER, 1994a+b; |
| Family-Shuffling | CRAMERI <i>et al.</i> , 1998 |
| High-Fidelity-Shuffling | ZHAO & ARNOLD, 1997 |
| Random-Priming Rekombination (RPR) | SHAO <i>et al.</i> , 1998 |
| Staggered Extension Process (StEP) | ZHAO <i>et al.</i> , 1998 |
| Random Chimeragenesis on Transient Templates (RACHITT) | COCO <i>et al.</i> , 2001 |
| Degenerate Oligonucleotide Gene-Shuffling (DOGS) | GRIBBS <i>et al.</i> , 2001 |
| Genom-Shuffling | ZHANG <i>et al.</i> , 2002 |
| Mutagenic and Unidirectional Reassembly (MURA) | SONG <i>et al.</i> , 2002 |
| Degenerate Homoduplex Recombination (DHR) | COCO <i>et al.</i> , 2002 |
| Synthetic-Shuffling | NESS <i>et al.</i> , 2002 |
| Assembly of Designed Oligonucleotides (ADO) | ZHA <i>et al.</i> , 2003 |
| Recombined Extension on Truncated Templates (RETT) | LEE <i>et al.</i> , 2003 |
| <u>Rekombinative, homologieunabhängige Methoden</u> | |
| Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes (ITCHY) | OSTERMEIER <i>et al.</i> , 1999 |
| SCRATCHY | LUTZ <i>et al.</i> , 2001 |
| Sequence Homology-Independent Protein Recombination (SHIPREC) | SIEBER <i>et al.</i> , 2001 |
| Structure-based Combinatorial Protein Engineering (SCOPE) | O'MAILLE <i>et al.</i> , 2002 |
| Sequence-Independent Site-Directed Mutagenesis (SISDC) | HIRAGA & ARNOLD, 2003 |

Die fehlerhafte Polymerasekettenreaktion (epPCR für „*error prone polymerase chain reaction*“) ist der am häufigsten verwendete Ansatz zu Beginn einer gerichteten Evolution.

Hierbei wird die natürliche Fehlerrate der *Taq*-DNA-Polymerase, die keine Korrekturlesefunktion besitzt, während der Amplifikation des Zielgenes (PCR) durch die Zugabe von $MnCl_2$ oder unphysiologisch hohen Konzentrationen von $MgCl_2$ erhöht.

Die Fehlerrate im Ansatz kann durch Konzentrationsänderungen von $MnCl_2$ oder $MgCl_2$ variiert werden (TINDALL & KUNKEL, 1988; ECKERT & KUNKEL, 1990; CIRINO *et al.*, 2003).

Die Methode der epPCR besitzt jedoch Einschränkungen: Da mehrere durch Fehler der Polymerase verursachte Basenaustausche innerhalb eines Codons selten sind, sind einige Aminosäureaustausche aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unwahrscheinlich. Hinzu kommt die Bevorzugung bestimmter Basenaustausche (EGGERT *et al.*, 2004). Um solche Einschränkungen zu überwinden, können andere, in Tab. 5 genannte, nichtrekombinative Methoden angewendet werden. Bei der *Sättigungsmutagenese* wird die Aminosäure an einer oder mehreren Positionen des Enzyms gegen sämtliche natürlich vorkommenden Aminosäuren ausgetauscht. Auf DNA-Ebene kann hierbei entschieden werden, ob das für die auszutauschende Aminosäure codierende Basentriplett gegen alle 64 möglichen oder gegen weniger Codons ausgetauscht werden soll (AIRAKSINEN & HOVI, 1998; GEORGESCU, 2003). Bei der Methode *MAX-Randomization* werden nur 20 für *E. coli* optimierte Codons eingesetzt, was den Aufwand bei dem anschließenden Screening verkleinern soll (HUGHES *et al.*, 2003).

Rekombinative Mutagenese-Methoden starten in der Regel von unterschiedlichen Varianten eines Gens oder von Gen-Familien. Es wird zwischen rekombinativen, homologieabhängigen- und rekombinativen, homologieunabhängigen Methoden unterschieden (Generelle Schemata unter Abb. 6). Einige Methoden beider Art sind in Tab. 5 aufgelistet. Vorreiter für sämtliche homologieabhängigen Methoden ist das 1994 von STEMMER entwickelte *DNA-Shuffling*, bei dem Varianten eines Gens oder verschiedene, homologe Gene (*Family-Shuffling*, CRAMERI *et al.*, 1989) durch Verdau mit DNaseI fragmentiert und anschließend in einem PCR-ähnlichen Ansatz wieder zusammengesetzt werden. In diesem Ansatz dienen sich die Fragmente gegenseitig als PCR-Startermoleküle und es kommt zur Rekombination durch Austausch von Fragmenten („*template switch*“). Während des Shuffling-Prozesses entstehen zusätzliche Punktmutationen, die die genetische Diversität zusätzlich erhöhen. 1997 wurde von ZHAO & ARNOLD ein DNA-Shuffling-Prozess entwickelt, bei dem die Rate zusätzlich eingeführter Punktmutationen von durchschnittlich 0,7 % auf durchschnittlich 0,05 % verringert werden kann.

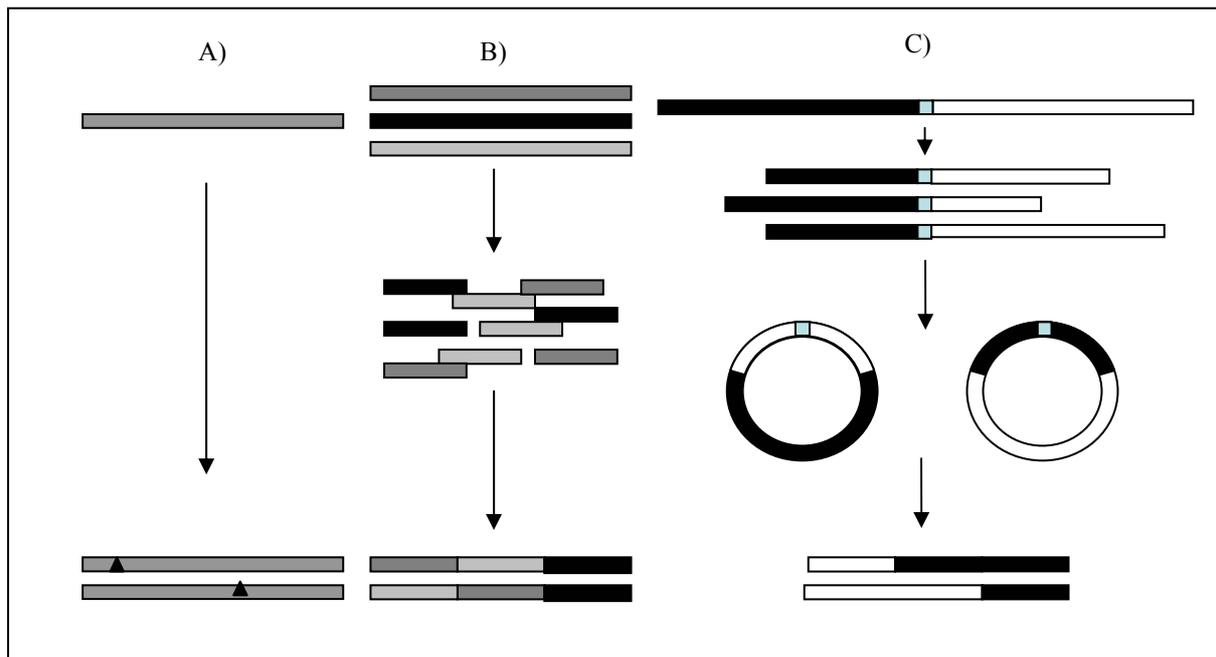


Abb. 6: Generelle Schemata der nichtrekombinativen und rekombinativen homologieabhängigen und homologieunabhängigen Methoden zur *in vitro* Rekombination. A) Mit den nichtrekombinativen Methoden werden Punktmutationen in ein Wildtyp-Gen eingeführt. B) Bei den rekombinativen, homologieabhängigen Methoden werden homologe Ausgangsgene fragmentiert und anschließend durch PCR wieder verknüpft. C) Rekombination nicht-homologer Gene am Beispiel von SHIPREC (SIEBER *et al.*, 2001). Zwei Gene werden durch eine „linker“-Sequenz miteinander verknüpft. Die verknüpften Gene werden zufällig fragmentiert und Fragmente der passenden Größe werden isoliert. Die ausgesuchten Fragmente werden cirkularisiert und dann durch Restriktionsverdau der „Linker“-Region wieder linearisiert. Es entstehen chimäre Genvarianten. Schwarze Dreiecke stellen mutierte Genbereiche dar.

Von der Technik des DNA-Shuffling gibt es weitere, nicht in Tab. 5 aufgeführte Variationen (KIKUCHI *et al.*, 1999; KIKUCHI *et al.*, 2000; MIYAZAKI, 2002; QIANG *et al.*, 2004). Das Prinzip der *in vitro* Rekombination wurde in vielen der in Tab. 5 genannten, homologieabhängigen Methoden weiter verbessert oder bestimmten experimentellen Bedingungen angepasst. COCO *et al.* (2002) NESS *et al.* (2002) und ZHA *et al.* (2003) entwickelten unterschiedliche, auf DNA-Shuffling basierende Methoden, bei denen statt durch DNaseI gewonnenen Genfragmenten sorgfältig ausgewählte Oligonukleotide in den Rekombinationsansatz eingesetzt wurden. Hierdurch kann eine höhere Diversität der entstehenden Genvarianten gesichert werden (OSTERMEIER, 2003).

Bei der Vorreiter-Methode der homologieunabhängigen Rekombination, *Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes (ITCHY)* (OSTERMEIER *et al.*, 1999), werden zwei Gene unterschiedlicher Herkunft mittels Endonuklease III restringiert und anschließend fusioniert. Somit können Gen-Chimären mit je einem Crossover erhalten werden. Auf einem ähnlichen Prinzip beruht die Methode *Sequence Homology-Independent Protein Recombination (SHIPREC)* (SIEBER *et al.*, 2001), siehe auch Abb. 6. Mit den Methoden *Structure-based Combinatorial Protein Engineering (SCOPE)* (O'MAILLE *et al.*, 2002) und *Sequence-Inde-*

pendent Site-Directed Mutagenesis (SISDC) [HIRAGA & ARNOLD, 2003] werden gezielt Proteinbereiche mit ähnlichen Strukturen miteinander rekombiniert.

Ziel eines jeden Ansatzes zur gerichteten Evolution ist es, maximale Diversität bei kleinstmöglicher Anzahl der zu screenenden Proteinvarianten zu erhalten (REETZ, 2004). Dies ist vor Allem im Hinblick auf den Screening-Aufwand der entstehenden Proteinbanken von Bedeutung: Mit der Formel $N = (19^M X!)/(X - M)! M!$ lässt sich die Anzahl der zu erwartenden Enzymvarianten (N) berechnen, dabei werden die Anzahl der Aminosäuresubstitutionen im Enzym (M) und die Gesamtanzahl der Aminosäuren des Enzyms (X) mit einbezogen. Anhand der Formel ergeben sich für ein Modellprotein, welches aus 300 Aminosäuren besteht, und einer angenommenen Mutationsrate von 2 Aminosäuresubstitutionen bereits 16.190.850 theoretisch entstehende Proteinvarianten (ARNOLD, 1996). So wird von den Forschern mehr und mehr das Ziel verfolgt, Mutantenbanken von geringerer Quantität, aber höherer Qualität zu generieren. Um dieses Ziel zu erreichen, werden verstärkt Computer-Algorithmen zur besseren Abschätzung des Ansatzes zur gerichteten Evolution eingesetzt. Durch die Computer-gestützte Vorhersage können gezielt bestimmte Enzymbereiche oder sogar bestimmte Aminosäuren mutagenisiert werden, was den Screening-Aufwand beträchtlich verringern kann (OSTERMEIER, 2003; MOORE & MARANAS, 2004; LUTZ & PATRICK, 2004).

1.3.2 Identifizierung von optimierten Enzymvarianten

Wie im oberen Abschnitt bereits beschrieben, können bei Ansätzen zur gerichteten Evolution zahlreiche Enzymvarianten entstehen, die auf ihre verbesserten Eigenschaften untersucht werden müssen. Um solche Protein-Variantenbanken sorgfältig durchmustern zu können, sind verschiedene Ansätze möglich.

Bei den Selektionsmethoden wird die Funktion der Enzymvariante (Phänotyp) mit der zugrundeliegenden genetischen Information (Genotyp) verknüpft. Hierbei kann es sich um zelluläre Expressionssysteme handeln, aber auch um zellhaltige oder zellfreie Display-Systeme. Beispiele sind *Single Molecule-PCR-Linked in vitro-Expression* (SIMPLEX, RUNGPRAGAYPHAN *et al.*, 2002), *Microbeads* in Wasser/Öl-Emulsionsystemen (GRIFFITHS & TAWFIK, 2003), *Ribosomen-Display* (HANES & PLÜCKTHUN, 1997; LIPOVSEK & PLÜCKTHUN, 2004) und *Phage-Display* (MATTHEWS & WELLS, 1993; DRÖGE *et al.*, 2003a). Die Selektion erfolgt dann aufgrund von Wuchsvorteilen oder Wuchsnachteilen der Organismen, die das gewünschte Enzym in aktiver Form exprimieren (WANG *et al.*, 2001; DESANTIS *et al.*, 2002; ROBERTSON *et al.*, 2004) oder mit Hilfe sogenannter Biopanning-Techniken, bei denen die gewünschten Enzyme in Anreicherungsverfahren an

Liganden, wie immobilisierten Suizid-Substraten, gebunden werden (DRÖGE *et al.*, 2003a; LAMLA & ERDMANN, 2003). Größter Vorteil der Selektion ist der hohe Durchsatz an bis zu 10^{10} Protein-Varianten (BRAKMANN, 2001; TAYLOR *et al.*, 2001). Bisher konnte noch keine Methode entwickelt werden, die die Selektion von enantioselektiven Enzymen ermöglicht. Es konnte jedoch die Bindung von auf Phagen exprimierter, aktiver Lipase durch Phosphonsäure-Suizid-Inhibitoren gezeigt werden (DEUSSEN *et al.*, 1999a und b; DANIELSEN *et al.*, 2001; DRÖGE *et al.*, 2003a).

Kann für einen Evolutionsansatz kein Selektionssystem entwickelt werden, erfolgt die Suche nach einem verbesserten Enzym über Screeningstrategien. Im Gegensatz zur Selektion erfolgt hier eine aktive physikalische oder chemische Untersuchung jeder einzelnen Enzymvariante auf die gewünschte Eigenschaft (TAYLOR *et al.*, 2001). Dabei beträgt die maximale Zahl der zu screenenden Varianten $10^5 - 10^7$ Enzymvarianten, je nach System können täglich zwischen 1400 und 10.000 Varianten getestet werden (REETZ, 2003a). Das Screeningsystem muss mehreren Anforderungen genügen: Der Test sollte für das zu testende Enzym spezifisch sein, ohne dass Neben- oder größere Hintergrundaktivitäten auftreten. Die Substrate müssen unter Testbedingungen stabil sein. Der Test sollte schnell durchzuführen und möglichst automatisierbar sein (BORNSCHEUER, 2004).

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Screeningsystemen beschrieben, die der Identifizierung von enantioselektiven Enzymen dienen. Darunter befinden sich viele UV/Vis-gestützte Systeme (REETZ *et al.*, 1997; JANES & KAZLAUSKAS, 1997; JANES *et al.*, 1998; BORNSCHEUER *et al.*, 1999; PENCREAC'H *et al.*, 2002), bei denen häufig beide Enantiomere getrennt voneinander getestet werden. Somit kann die Enantioselektivität zunächst nur ungefähr bestimmt werden (Beispiel in Abb. 7).

Fluoreszenz-Methoden haben den Vorteil sehr hoher Sensitivität (BADALASSI *et al.*, 2000). Bei den *Enzym-Fingerprints*, bei denen sowohl UV/Vis als auch Fluoreszenz-Methoden zur Anwendung kommen, werden die Aktivität und die Selektivität eines Enzyms für eine Reihe von Substraten bestimmt (REYMOND & WAHLER, 2002, WAHLER *et al.*, 2002). Es ergibt sich dann für jedes Enzym ein individuelles Muster. Enzymatische Methoden (BAUMANN *et al.*, 2001; ABATO & SETO, 2001, REJEB *et al.*, 2004) beruhen auf der Idee, dass die nach einer enantioselektiven Reaktion freiwerdenden Reaktionsprodukte in einer Nebenreaktion von einem weiteren Enzym umgesetzt werden. Dabei entstehen wiederum nachweisbare Produkte. Immunologische Methoden (TARAN *et al.*, 2002) nutzen die Spezifität von Antikörpern gegen die verschiedenen Enantiomere eines Produktes.

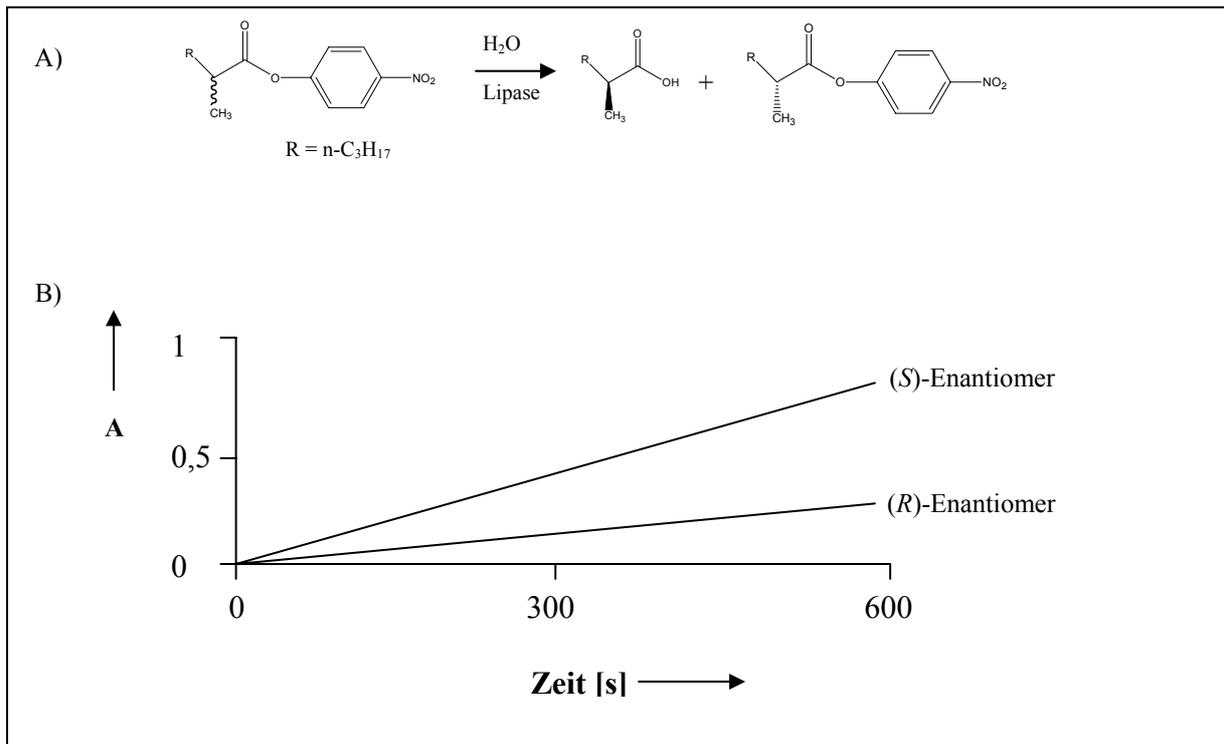


Abb. 7: Beispiel für den zeitlichen Verlauf der Absorptionsänderung während der Lipase-katalysierten Hydrolyse des (*S*)- und (*R*)-Enantiomers von (*R,S*)-2-Methyldecansäure-*p*-nitrophenylester. A) Verlauf der Reaktion. Das Produkt *p*-Nitrophenolat kann durch UV/Vis-Spektroskopie nachgewiesen werden. B) Die Aktivität der einzelnen Varianten wird für jedes Enantiomer einzeln vermessen. Anschließend kann die Enantioselektivität durch Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten für die beiden Enantiomere abgeschätzt werden. A: Absorption. Nach REETZ *et al.*, 1997

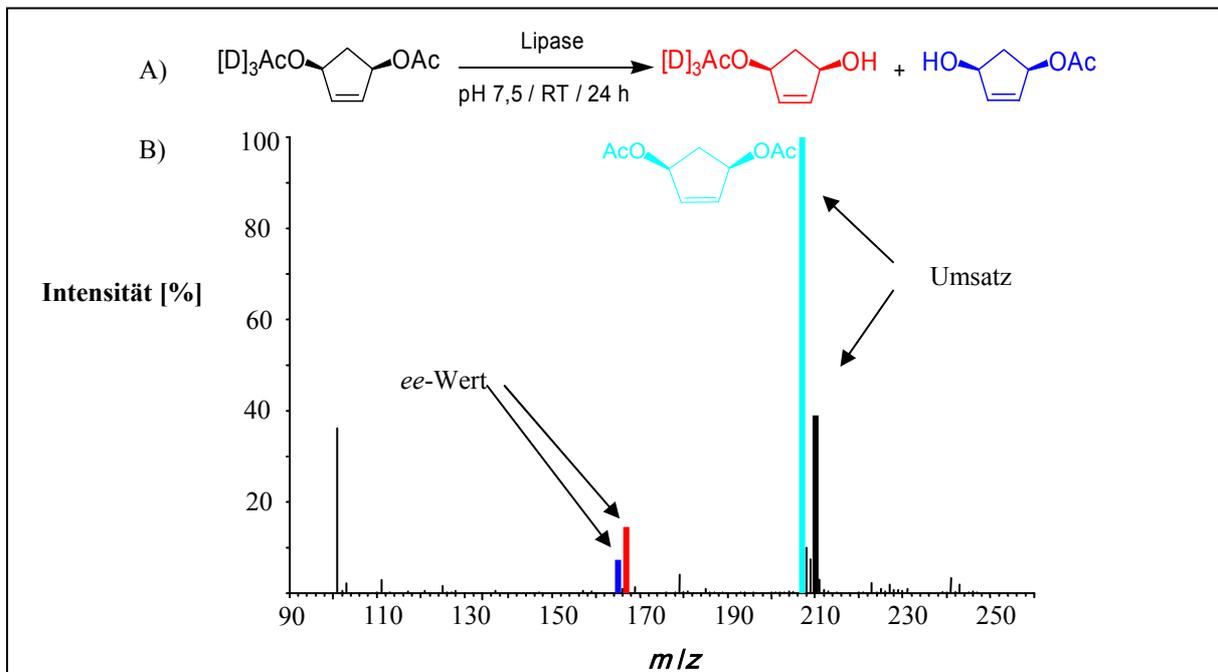


Abb. 8: Asymmetrische Hydrolyse von *pseudo-meso*-1-Trideuteroacetoxy-4-acetoxy-2-cyclopenten durch die BSLA. A) Darstellung der Strukturformeln B) ESI-Massenspektrum der Hydrolyseprodukte. Das Substrat wird in diesem Beispiel durch den BSLA-Wildtyp mit einer Selektivität von 48 % ee für das (*1R,4S*)-Enantiomer umgesetzt. Der ee -Wert wurde durch das Verhältnis der Intensitäten der Hydrolyse-Produkte errechnet. Der Umsatz wird mittels eines mitgemessenen Standards (hellblau) bestimmt.

Eine Reihe von weiteren Methoden wurde von der Arbeitsgruppe REETZ publiziert. Diese beruhen auf: *IR-Thermographie* (REETZ *et al.*, 1998), *FTIR* (TIELMANN *et al.*, 2003), *NMR* (REETZ *et al.*, 2004), *Circulardichroismus* (REETZ *et al.*, 2000a), *Kapillarelektrophorese* (REETZ *et al.*, 2000b) und *Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie*. Bei dieser Methode werden isotopenmarkierte, pseudo-chirale Substrate hergestellt. Nach der Umsetzung durch das jeweilige Enzym kann das nicht-markierte vom isotopenmarkiertem Enantiomer massenspektrometrisch unterschieden werden (REETZ *et al.*, 1999; REETZ, 2003b). Ein Beispiel ist in Abb. 8 dargestellt.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die BSLA ist aufgrund der geringen Größe, des hohen pH-Optimums und des großen Substratspektrums ein biotechnologisch hochinteressantes Protein (DARTOIS *et al.*, 1992 und 1994; LESUISSE *et al.*, 1993). Um die biochemischen Eigenschaften und die Struktur-/Funktionsbeziehungen des Enzyms zu erforschen, sollten in dieser Arbeit folgende Teilaspekte bearbeitet werden:

1) *Biochemische Charakterisierung*: Die BSLA und die BSLB sollten mittels immobilisierter Affinitäts-Chromatographie (IMAC) aufgereinigt werden. Anschließend sollten beide Proteine hinsichtlich ihrer hydrolytischen Aktivität gegenüber verschiedenen industriell bedeutsamen Polymeren und nach der Inkubation in ionischen Liquiden untersucht werden.

2) *Optimierung der Enantioselektivität der BSLA gegenüber verschiedenen Substraten mittels vollständiger Sättigungsmutagenese*: In einem vorangehenden Projekt konnte die Enantioselektivität der BSLA in der Hydrolyse des Modellsubstrates *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten durch gerichtete Evolution von 48 % *ee* (1*R*,4*S*) für das Wildtypenzym auf 70 % *ee* (1*R*,4*S*) für die beste Variante und 39 % *ee* für die beste Variante mit Umkehrung der Enantioprefärenz verändert werden. Eine weitere Verbesserung der Enantioselektivität war mit den in dieser Arbeit angewandten Mutagenese-Methoden (fehlerhafte PCR, Kassettenmutagenese, DNA-Shuffling) nicht möglich. Des Weiteren zeigte sich, dass die Akkumulation von Mutationen in dem kleinen Enzym die Enzymstabilität nachhaltig beeinträchtigte (EGGERT, 2001). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine neuartige Mutagenese-strategie zur Entwicklung enantioselektiver Lipasen zur Anwendung kommen. Es sollte eine vollständige Sättigungsmutagenese-Bank angelegt werden, in der jede Aminosäure des Enzyms einzeln gegen die 19 natürlich vorkommenden Aminosäuren ausgetauscht werden sollte. Neben dem Screening auf verbesserte Enantioselektivität bei der Hydrolyse des Modellsubstrats *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten sollte getestet werden, ob sich die Enantiopreferenzen der

einzelnen Varianten gegenüber dem Substrat *rac*-1-(2-Naphthyl)ethylacetat ändert. Neben dem Ziel der Entwicklung von enantioselektiven Biokatalysatoren sollte die Frage beantwortet werden, welche Aminosäuren des Enzyms für die Enantioselektivität gegenüber verschiedenen Substraten verantwortlich sind und warum.

3) *Entwicklung einer neuen Methode zur in vitro Rekombination*: In ihrer Enantioselektivität verbesserte BSLA-Varianten sollten durch *in vitro* Rekombination weiter optimiert werden. Dazu sollte eine neue Methode zur *in vitro* Rekombination entwickelt werden, in der einzelne Mutationen schnell und einfach miteinander rekombiniert werden können, ohne dass dabei neue, zufällige Punktmutationen in das Zielgen eingefügt wurden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Antibiotika und Enzyme wurden von den folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen:

Antibiotika: SERVA (Heidelberg)

Chemikalien: FLUKA (Sternheim), MERCK (Darmstadt), ROTH (Karlsruhe) und SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen).

Enzyme: Restriktionsenzyme wurden von der Firma MGI FERMENTAS (St. Leon-Roth) bezogen. *Pfu*-Polymerasen wurden bei der Firma STRATAGENE (Heidelberg) erworben. *Taq*-Polymerasen stammten von der Firma MGI FERMENTAS (St. Leon-Roth). Die T4-DNA-Ligase wurde von der Firma MGI FERMENTAS (St. Leon-Roth) bezogen. Weitere Enzyme: DNaseI von ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim) und Lysozym von SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen).

Medienkomponenten: INVITROGEN (Karlsruhe), OXOID (Wesel), ROTH (Karlsruhe) und SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen).

2.2 Lipase-/Depolymerase-Substrate

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Lipase-/Depolymerase-Substrate. Die Strukturformeln sind im Anhang gezeigt.

| Name | Quelle |
|--|--|
| <i>pseudo-meso</i> -1-Trideuteroacetoxy-4-acetoxy-2-cyclopenten und <i>meso</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten | Arbeitskreis Prof. Dr. REETZ, MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR KOHLEN-FORSCHUNG (Mülheim a.d. Ruhr) |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-Palmitat | SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen) |
| (<i>R</i>)/(<i>S</i>)-1-(2-Naphthyl)ethylacetat (NEA) | Arbeitskreis Prof. Dr. REETZ, MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR KOHLEN-FORSCHUNG (Mülheim a.d. Ruhr) |
| <i>rac</i> -1-Phenylethylacetat (PEA) | „ |
| Menthylacetat | „ |
| <i>rac</i> - α,β -Isopropylidenglycerol-Butyrat (IPG-Butyrat) | „ |
| <i>rac</i> - β -Citronellyl-Butyrat | SYMRISE (Holzminden) |
| <i>cis</i> -1,2-Cyclohexandiol-bis-acetat | AG Dr. M. MÜLLER, INSTITUT FÜR BIOTECHNOLOGIE 2, FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH |
| <i>rac-trans</i> -1,2-Cyclohexandiol-bis-acetat | AG Dr. M. MÜLLER, INSTITUT FÜR BIOTECHNOLOGIE 2, FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH |
| Poly-(D,L-Lactid) (PLA) | SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen) |
| Bionolle 1001/3001 | SHOWA-DENKO (Düsseldorf) |
| Poly-(3-Hydroxybutyrat- <i>co</i> -3-hydroxyvalerat) (PHB <i>co</i> Va) | SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen) |

2.3 Bakterienstamm und Plasmide

Der in dieser Arbeit verwendete Bakterienstamm und alle verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide sind in Tab.7, Tab.8 und Tab.9 aufgeführt.

Tab. 7: Der verwendete Bakterienstamm.

| Stamm | Genotyp | Referenz/Bezugsquelle |
|--------------------------|--|--|
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | <i>F-dcm ompT hsdS</i> (Γ_B - m_B -) <i>gal</i> λ (DE3) | STUDIER & MOFFAT, 1986 NOVAGEN (Madison, USA) |

Tab. 8: Übersicht der verwendeten Vektoren für *E. coli*.

| Vektor | genetische Marken | Referenz/Bezugsquelle |
|-----------|---|---------------------------|
| pET19b | ColE1 P _{T7} Φ ₁₀ <i>lacI</i> ^q Amp ^r „His-Tag“ | NOVAGEN (Madison, USA) |
| pET22b(+) | ColE1 P _{T7} Φ ₁₀ <i>lacI</i> ^q <i>pelB</i> -Signalsequenz „His-Tag“ Amp ^r | NOVAGEN (Madison, USA) |

Tab. 9: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide.

| Rekombinante Plasmide | Beschreibung | Referenz |
|-----------------------|--|--|
| pUlipA | pUC18 mit 563 bp <i>lipA</i> -PCR Fragment (ohne Signalsequenz) | EGGERT, 2001 |
| pET22lipA | pET22b(+) mit 557 bp <i>EcoRV/SacI</i> Fragment aus pUlipA (<i>pelB-lipA</i> -Fusion, P _{lac} kontrolliert). | EGGERT, 2001 FUNKE <i>et al.</i> , 2003 |
| pET19lipA | pET19b mit 549 bp <i>NdeI/XhoI</i> Fragment aus <i>lipA</i> , ohne Signalsequenz | ROSENBAUM, 2003 |
| pET19lipB | pET19b mit 549 bp <i>NdeI/XhoI lipB</i> -PCR-Fragment, ohne Signalsequenz | ROSENBAUM, 2003 |
| pET22lipA-N18Q | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18Q Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-N18A | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18A Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-S130T | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18T Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-N18I | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18I Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-N18L | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18L Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-Y49C | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für Y49C Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-F3 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18Q und Y49V Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-N18T | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18T Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-N18C | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18C Substitution | diese Arbeit |

Fortsetzung Tab. 9

| | | |
|------------------|---|--------------|
| pET19lipA-N18A | pET19lipA mit Punktmutationen für N18A Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18R | pET19lipA mit Punktmutationen für N18R Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18D | pET19lipA mit Punktmutationen für N18D Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18C | pET19lipA mit Punktmutationen für N18C Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18E | pET19lipA mit Punktmutationen für N18E Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18G | pET19lipA mit Punktmutationen für N18G Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18H | pET19lipA mit Punktmutationen für N18H Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18K | pET19lipA mit Punktmutationen für N18K Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18M | pET19lipA mit Punktmutationen für N18M Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18F | pET19lipA mit Punktmutationen für N18F Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18P | pET19lipA mit Punktmutationen für N18P Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18T | pET19lipA mit Punktmutationen für N18T Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18W | pET19lipA mit Punktmutationen für N18W Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18Y | pET19lipA mit Punktmutationen für N18Y Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18V | pET19lipA mit Punktmutationen für N18V Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18Q | pET19lipA mit Punktmutationen für N18Q Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18I | pET19lipA mit Punktmutationen für N18I Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18L | pET19lipA mit Punktmutationen für N18L Substitution | diese Arbeit |
| pET19lipA-N18S | pET19lipA mit N18S Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-L114P | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für L114P Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-A132D | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für A132D Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-N166Y | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N166Y Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-Rao-2x | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für L114P und A132D Substitutionen | diese Arbeit |
| pET22lipA-Rao-3x | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für L114P ; A132D und N166Y Substitutionen | diese Arbeit |

Fortsetzung Tab. 9

| | | |
|----------------|---|--------------|
| pET22lipA-NEA2 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für H76L Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-NEA3 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für H76A Substitution | diese Arbeit |
| pET22lipA-NEA4 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für H76A Substitution | diese Arbeit |
| 16-02-D1 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18L; N166Y Substitutionen | diese Arbeit |
| 16-02-B1 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18S; L114P; N166Y Substitutionen | diese Arbeit |
| 37-02-F2 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18H; N166Y Substitutionen | diese Arbeit |
| 37-02-B12 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18Q; Y49V Substitutionen | diese Arbeit |
| 16-02-F1 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18Q; L114P Substitutionen | diese Arbeit |
| 16-02-G1 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18Q; L114P; A132D; N166Y Substitutionen | diese Arbeit |
| 37-03-A3 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18S; Y49I; L114P Substitutionen | diese Arbeit |
| 37-01-G5 | <i>pelB-lipA</i> -Fusion wie pET22lipA mit Punktmutationen für N18Q; Y49V Substitutionen | diese Arbeit |

2.4 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma THERMO (Ulm) bezogen und sind im Detail in den Tab. 10-12 aufgeführt.

Tab. 10: Übersicht der für die Sättigungsmutagenesen verwendeten Oligonukleotide.

| Name | DNA-Sequenz (5'→3' Richtung) | Merkmale/ Modifikationen |
|----------|---|-----------------------------|
| mut1up | CTCCTCGCTGCCCA GCCGGCGATG | <i>MisI</i> |
| mutS3low | ATATAAGCTTCAGCAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTC | <i>HindIII</i> |
| A1X | CTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGNN <u>SGAACACA</u> ATCC | Ala ₁ → X |
| E2X | CTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGCTNN <u>SCACA</u> ATCC | Glu ₂ → X |
| H3X | CTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGCTGAAN <u>NSA</u> ATCC | His ₃ → X |
| N4X | CTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGCTGAACACN <u>NSCC</u> | Asn ₄ → X |
| P5X | CTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGCTGAACACAAT <u>NN</u> SGTCGTTATGGTTC | Pro ₅ → X |
| V6X | ACCGTGAACCATAACSNNTGGATTGTGTTTCAGC | Val ₆ → X |

Fortsetzung Tab. 10

| | | |
|------|---|-----------------------|
| V7X | AATACCGTGAACCATSNNGACTGGATTGTGTTC | Val ₇ → X |
| M8X | TCCAATACCGTGAACSNNAACGACTGGATTGTG | Met ₈ → X |
| V9X | CCCTCCAATACCGTCSNNCATAACGACTGGATTG | Val ₉ → X |
| H10X | TGCCCTCCAATACCSNNAACATAACGACTGG | His ₁₀ → X |
| G11X | TGATGCCCTCCAATSNNGTGAACCATAACGAC | Gly ₁₁ → X |
| I12X | GAATGATGCCCTCCSNNACCGTGAACCATAAC | Ile ₁₂ → X |
| G13X | ATTGAATGATGCCCSNNAATACCGTGAACCATAAC | Gly ₁₃ → X |
| G14X | AAAATTGAATGATGCSNNTCCAATACCGTGAAC | Gly ₁₄ → X |
| A15X | CGCAAATGAATGASNNCCCTCCAATACCGTG | Ala ₁₅ → X |
| S16X | TCCCGCAAATGAASNNTGCCCTCCAATACC | Ser ₁₆ → X |
| F17X | AATCCCAGCAAATSNNTGATGCCCTCCAATAC | Phe ₁₇ → X |
| N18X | CTTAATCCCAGCAAASNNGAATGATGCCCTCC | Asn ₁₈ → X |
| F19X | GCTCTTAATCCCAGCSNNATTGAATGATGCCCT | Phe ₁₉ → X |
| A20X | GCTCTTAATCCSNNAAAATTGAATGATGC | Ala ₂₀ → X |
| G21X | ATAGCTCTTAATSNNCGCAAATGAATGATGC | Gly ₂₁ → X |
| I22X | TACGAGATAGCTTSSNNTCCCGCAAAAAT | Ile ₂₂ → X |
| I23X | AGATACGAGATAGCTSNNAATTCCCGCAAAAATTG | Ile ₂₃ → X |
| K24X | CTGAGATACGAGATASNNTTAATCCCAGC | Lys ₂₄ → X |
| Y25X | GCCCTGAGATACGAGSNNGCTCTTAATCCCAGC | Tyr ₂₅ → X |
| L26X | CCAGCCCTGAGATACSNNATAGCTCTTAATTCC | Leu ₂₆ → X |
| V27X | CGACCAGCCCTGAGASNNGAGATAGCTCTTAATTC | Val ₂₇ → X |
| S28X | CCGCGACCAGCCCTGSNNTACGAGATAGCTC | Ser ₂₈ → X |
| Q29X | GTCCCGCAGCCAGCCSNNAGATACGAGATAGCT | Gln ₂₉ → X |
| G30X | CTTGTCCTCGACCASNNTGAGATACGAGATAG | Gly ₃₀ → X |
| W31X | CAGCTTGTCGCGASNNGCCCTGAGATACGAG | Trp ₃₁ → X |
| S32X | ATACAGCTTGTCGCSNNCCAGCCCTGAGATAC | Ser ₃₂ → X |
| R33X | TGCATACAGCTTGTCSNNCGACCAGCCCTGAG | Arg ₃₃ → X |
| D34X | AACTGCATACAGCTTSSNNTCCGCGACCAGCCCTG | Asp ₃₄ → X |
| K35X | ATCAACTGCATACAGSNNGTCCCGCAGCCAGCC | Lys ₃₅ → X |
| L36X | AAAATCAACTGCATASNNTTGTCGCGACCAGC | Leu ₃₆ → X |
| Y37X | CCAAAAATCAACTGCSNNCAGCTTGTCGCGAC | Tyr ₃₇ → X |
| A38X | GTCCCAAAAATCAACSNNATACAGCTTGTCGCG | Ala ₃₈ → X |
| V39X | CTTGTCGCAAAAATCSNNTGCATACAGCTTGTC | Val ₃₉ → X |
| D40X | TGTCTTGTCGCAAAAASNNACTGCATACAGCTT | Asp ₄₀ → X |
| F41X | GCCTGTCTTGTCSSNNATCAACTGCATACAG | Phe ₄₁ → X |
| W42X | TGTGCTGTCTTGTCSSNNAATACTCAACTGCATA | Trp ₄₂ → X |
| D43X | ATTTGTCCTGTCTTSSNNCAAAAATCAACTGC | Asp ₄₃ → X |
| K44X | ATAATTTGTGCTGTSSNNGTCCCAAAAATCAAC | Lys ₄₄ → X |
| T45X | GTTATAATTTGTGCCSNNTTGTCGCAAAAATC | Thr ₄₅ → X |
| G46X | ATTGTTATAATTTGTGSSNNTGTCTTGTCGCAAAAATC | Gly ₄₆ → X |
| T47X | TCCATTGTTATAATSSNNGCCTGTCTTGTCGCAAAAATC | Thr ₄₇ → X |
| N48X | CGGTCCATTGTTATASNNTGTGCTGTCTTGTC | Asn ₄₈ → X |
| Y49X | TACCGTCCATTGTTSSNNTTTGTGCTGTCTT | Tyr ₄₉ → X |
| N50X | TAATACCGTCCATTSSNNATAATTTGTGCTGT | Asn ₅₀ → X |
| N51X | TGATAATACCGTCCSNNGTTATAATTTGTGCC | Asn ₅₁ → X |
| G52X | TCGTGATAATACCGSSNNATTGTTATAATTTGTG | Gly ₅₂ → X |
| P53X | AAATCGTGATAATACSNNTCCATTGTTATAATT | Pro ₅₃ → X |
| V54X | CACAAATCGTGATAASNNCGGTCCATTGTTATA | Val ₅₄ → X |
| L55X | TTGCACAAATCGTGASNNTACCGGTCCATTG | Leu ₅₅ → X |
| S56X | CTTTTGACAAATCGSNNTAATACCGGTCCATTG | Ser ₅₆ → X |
| R57X | AACCTTTTGACAAASNNTGATAATACCGGTCC | Arg ₅₇ → X |
| F58X | TAAAACCTTTTGACASNNTCGTGATAATACCGG | Phe ₅₈ → X |
| V59X | ATCTAAAACCTTTGSSNNAATCGTGATAATAC | Val ₅₉ → X |
| Q60X | TTCATCTAAAACCTTSSNNCACAAATCGATAA | Gln ₆₀ → X |
| K61X | CGTTCCATCTAAAACSNNTTGCACAAATCGTG | Lys ₆₁ → X |
| V62X | ACCGTTTCATCTAASNNTTTTGACAAATCG | Val ₆₂ → X |
| L63X | CGCACCCGTTTCATCSNNAACCTTTTGACAAATC | Leu ₆₃ → X |
| D64X | TTTCGCACCCGTTTCSNNATAAACCTTTTGAC | Asp ₆₄ → X |
| E65X | TTTTTCGCACCCGTSNNATCTAAAACCTTTTG | Glu ₆₅ → X |

Fortsetzung Tab. 10

| | | |
|-------|---|------------------------|
| T66X | CACTTTTTTCGCACCSNNTTCATCTAAAACC | Thr ₆₆ → X |
| G67X | ATCCACTTTTTTCGCSNNCGTTTCATCTAAAAC | Gly ₆₇ → X |
| A68X | AATATCCACTTTTTTSNNACCCGTTTCATCTAAAAC | Ala ₆₈ → X |
| K69X | GACAATATCCACTTTTSNNCGCACCCGTTTCATC | Lys ₆₉ → X |
| K70X | AGCGACAATATCCACSNNTTTCGCACCCGTTTC | Lys ₇₀ → X |
| V71X | GTGAGCGACAATATCSNNTTTTTTCGCACCCGT | Val ₇₁ → X |
| D72X | GCTGTGAGCGACAATSNNCACTTTTTTCGCACC | Asp ₇₂ → X |
| I73X | CATGCTGTGAGCGACSNNATCCACTTTTTTCGC | Ile ₇₃ → X |
| V74X | CCCCATGCTGTGAGCSNNAATATCCACTTTTTTC | Val ₇₄ → X |
| A75X | GCCCCCATGCTGTGSNNGACAATATCCACTTTTTTC | Ala ₇₅ → X |
| H76X | CGCGCCCCCATGCTSNNAGCGACAATATCCAC | His ₇₆ → X |
| S77X | GTTGCGCCCCCATSNNGTGAGCGACAATATC | Ser ₇₇ → X |
| M78X | TGTGTGCGCCCCCSNNGCTGTGAGCGACAATATC | Met ₇₈ → X |
| G79X | AAGTGTGTTGCGCGCSNNCGCTGTGAGCGAC | Gly ₇₉ → X |
| G80X | GTAAGTGTGTTGCGSNNCCCATGCTGTGAGC | Gly ₈₀ → X |
| A81X | GTAGTAAAGTGTGTTSNNGCCCCCATGCTGTG | Ala ₈₁ → X |
| N82X | TATGTAGTAAAGTGTSNNCGCGCCCCCATGCTG | Asn ₈₂ → X |
| T83X | TTTTATGTAGTAAAGSNNGTTCGCGCCCCCATG | Thr ₈₃ → X |
| L84X | ATTTTTATGTAGTASNNATGTTGCGCGCCCC | Leu ₈₄ → X |
| Y85X | CAGATTTTTATGTASNNAAGTGTGTTGCGGCC | Tyr ₈₅ → X |
| Y86X | GTCCAGATTTTTATSNNGTAAAGTGTGTTGCGC | Tyr ₈₆ → X |
| I87X | GCCGTCCAGATTTTTSNNGTAGTAAAGTGTGTT | Ile ₈₇ → X |
| K88X | TCCGCCGTCCAGATTSNNATGTTAGTAAAGTGTG | Lys ₈₈ → X |
| N89X | ATTTCCGCCGTCCAGSNNTTTATGTAGTAAAG | Asn ₈₉ → X |
| L90X | TTATTTCCGCCGTCSNNATTTTTATGTAGTAAAG | Leu ₉₀ → X |
| D91X | AACTTTATTTCCGCCSNNCAGATTTTTATGTAG | Asp ₉₁ → X |
| G92X | TGCAACTTTATTTCCSNNGTCCAGATTTTTATG | Gly ₉₂ → X |
| G93X | GTTTGCAACTTTATTSNNGCCGTCCAGATTTTTATG | Gly ₉₃ → X |
| N94X | GACGTTTGCAACTTTSNNTCCGCCGTCCAGATTTTTATG | Asn ₉₄ → X |
| K95X | CACGACGTTTGCAACSNNATTTCCGCCGTCCAG | Lys ₉₅ → X |
| V96X | CGTCACGACGTTGCSNNTTTATTTCCGCCGTCC | Val ₉₆ → X |
| A97X | AAGCGTCACGACGTTSNNAACTTTATTCCTGCC | Ala ₉₇ → X |
| N98X | GCCAAGCGTCACGACSNNTGCAACTTTATTTCC | Asn ₉₈ → X |
| V99X | GCCGCCAAGCGTCACSNNGTTTGCAACTTTATTTCC | Val ₉₉ → X |
| V100X | CGCGCCGCAAGCGTSNNGACGTTTGCAAC | Val ₁₀₀ → X |
| T101X | GTTGCGCCGCAAGSNNCACGACGTTTGCAAC | Thr ₁₀₁ → X |
| L102X | ACGGTTCGCGCCGCCSNNGTTCACGACGTTTGC | Leu ₁₀₂ → X |
| G103X | TAAACGTTTCGCGCCSNNAAGCGTCACGACGTT | Gly ₁₀₃ → X |
| G104X | CGTTAAACGGTTCGCSNNGCCAAGCGTCACGAC | Gly ₁₀₄ → X |
| A105X | TGTCGTTAAACGGTTSNNGCCGCCAAGCGTCAC | Ala ₁₀₅ → X |
| N106X | GCCTGTCGTTAAACGSNNCGCGCCGCCAAGCGTC | Asn ₁₀₆ → X |
| R107X | CTTGCTGTCGTCAASNNGTTCGCGCCGCCAGG | Arg ₁₀₇ → X |
| L108X | CGCCTTGCTGTCGTSNNACGGTTCGCGCCGCC | Leu ₁₀₈ → X |
| T109X | AAGCGCCTTGCTGTSNNCAAACGGTTCGCGCC | Thr ₁₀₉ → X |
| T110X | CCGAAGCGCCTTGCCSNNGTTCAAACGGTTCGC | Thr ₁₁₀ → X |
| G111X | TCCCGAAGCGCCTTSNNTGTCGTCAAACGGTTC | Gly ₁₁₁ → X |
| K112X | TGTTCCCCGAAGCGCSNNGCCTGTCGTCAAACG | Lys ₁₁₂ → X |
| A113X | ATCTGTTCCCGGAAGSNNTTGCCTGTCGTAAAC | Ala ₁₁₃ → X |
| L114X | TGGATCTGTTCCCGSNNGCCTTGCTGTCG | Leu ₁₁₄ → X |
| P115X | ATTTGGATCTGTTCCSNNAAGCGCCTTGCTGTC | Pro ₁₁₅ → X |
| G116X | TTGATTTGGATCTGTSNNCGGAAGCGCCTTGCC | Gly ₁₁₆ → X |
| T117X | CTTTTGATTTGGATCSNNTCCCGGAAGCGCCTTG | Thr ₁₁₇ → X |
| D118X | AATCTTTTGATTTGGSNNTGTTCCCGGAAGCGC | Asp ₁₁₈ → X |
| P119X | TAAAATCTTTTGATTSNNATCTGTTCCCGGAAG | Pro ₁₁₉ → X |
| N120X | GTATAAAATCTTTGSNNTGGATCTGTTCCCGG | Asn ₁₂₀ → X |
| Q121X | TGTGTATAAAATCTTSNNATTTGGATCTGTTCC | Gln ₁₂₁ → X |
| K122X | GGATGTGTATAAAATSNNTTGATTTGGATCTG | Lys ₁₂₂ → X |
| I123X | AATGGATGTGTATAASNNCTTTTGATTTGGATC | Ile ₁₂₃ → X |
| L124X | GTAATGGATGTGTASNNATTCTTTTGATTTGG | Leu ₁₂₄ → X |

Fortsetzung Tab. 10

| | | |
|-------|--|------------------------|
| Y125X | GCTGTAAATGGATGTSNNTAAAATCTTTTGATTTG | Tyr ₁₂₅ → X |
| T126X | ACTGCTGTAAATGGASNNGTATAAAAATCTTTTG | Thr ₁₂₆ → X |
| S127X | GGCACTGCTGTAAATSNNNTGTGTATAAAAATCTT | Ser ₁₂₇ → X |
| I128X | ATCGGCACTGCTGTASNNGGATGTGTATAAAAATC | Ile ₁₂₈ → X |
| Y129X | CATATCGGCACTGCTSNNAATGGATGTGTATAAAAATC | Tyr ₁₂₉ → X |
| S130X | AATCATATCGGCACTSNNGTAAATGGATGTG | Ser ₁₃₀ → X |
| S131X | GACAATCATATCGGCSNNGCTGTAAATGGATG | Ser ₁₃₁ → X |
| A132X | CATGACAATCATATCSNNACTGCTGTAAATGG | Ala ₁₃₂ → X |
| D133X | ATTCATGACAATCATSNNGGCACTGCTGTAAATG | Asp ₁₃₃ → X |
| M134X | GTAATTCATGACAATSNNATCGGCACTGCTGTAAATG | Met ₁₃₄ → X |
| I135X | TAAGTAATTCATGACSNNCATATCGGCACTGCTG | Ile ₁₃₅ → X |
| V136X | TGATAAGTAATTCATSNNAATCATATCGGCACTG | Val ₁₃₆ → X |
| M137X | TCTTGATAAGTAATTSNNGACAATCATATCGGC | Met ₁₃₇ → X |
| N138X | TAATCTTGATAAGTASNNCATGACAATCATATC | Asn ₁₃₈ → X |
| Y139X | ATCTAATCTTGATAASNNTTCATGACAATCATATCGGC | Tyr ₁₃₉ → X |
| L140X | ACCATCTAATCTTGASNNGTAAATTCATGACAATC | Leu ₁₄₀ → X |
| S141X | AGCACCATCTAATCTSNNTAAGTAATTCATGAC | Ser ₁₄₁ → X |
| R142X | TCTAGCACCATCTAASNNTGATAAGTAATTCATG | Arg ₁₄₂ → X |
| L143X | GTTTCTAGCACCATCSNNTCTTGATAAGTAATTC | Leu ₁₄₃ → X |
| 144X | AACGTTTCTAGCACCSNNTAATCTTGATAAGTAAT | Arg ₁₄₄ → X |
| G145X | TTGAACGTTTCTAGCSNNATCTAATCTTGATAAG | Gly ₁₄₅ → X |
| A146X | GATTTGAACGTTTCTSNNACCATCTAATCTTG | Ala ₁₄₆ → X |
| R147X | ATGGATTTGAACGTTSNNAGCACCATCTAATCTTG | Arg ₁₄₇ → X |
| N148X | GCCATGGATTTGAACSNNTCTAGCACCATCTAATC | Asn ₁₄₈ → X |
| V149X | AACGCCATCGATTTGSNNGTTTCTAGCACCATC | Val ₁₄₉ → X |
| Q150X | TCCAACGCCATGGATSNNAAACGTTTCTAGCACC | Gln ₁₅₀ → X |
| I151X | GTGTCCAACGCCATGSNNTTGAACGTTTCTAGC | Ile ₁₅₁ → X |
| H152X | GATGTGTCCAACGCCSNNGATTTGAACGTTTCTAG | His ₁₅₂ → X |
| G153X | GCCGATGTGTCCAACSNNATGGATTTGAACGTTTC | Gly ₁₅₃ → X |
| V154X | AAGGCCGATGTGTCCSNNGCCATGGATTTGAAC | Val ₁₅₄ → X |
| G155X | CAGAAGGCCGATGTGSNNAACGCCATGGATTTG | Gly ₁₅₅ → X |
| H156X | GTACAGAAGGCCGATSNNTCCAACGCCATGGATTTG | His ₁₅₆ → X |
| I157X | GCTGTACAGAAGGCCSNNGTGTCCAACGCCATG | Ile ₁₅₇ → X |
| G158X | GCTGCTGTACAGAAGSNNGATGTGTCCAACGCC | Gly ₁₅₈ → X |
| L159X | TTGGCTGCTGTACAGSNNGCCGATGTGTCCAAC | Leu ₁₅₉ → X |
| L160X | GACTTGCTGCTGTASNNAAGGCCGATGTGTCC | Leu ₁₆₀ → X |
| Y161X | GTTGACTTGGCTGCTSNNCAGAAGGCCGATGTG | Tyr ₁₆₁ → X |
| S162X | GCTGTTGACTTGGCTSNNGTACAGAAGGCCGATG | Ser ₁₆₂ → X |
| S163X | CAGGCTGTTGACTTGSNNGCTGTACAGAAGGCC | Ser ₁₆₃ → X |
| Q164X | AATCAGGCTGTTGACSNNGCTGCTGTACAGAAG | Gln ₁₆₄ → X |
| V165X | TTTAATCAGGCTGTTSNNTTGGCTGCTGTACAG | Val ₁₆₅ → X |
| N166X | TTCTTTAATCAGGCTSNNGACTTGGCTGCTGTAC | Asn ₁₆₆ → X |
| S167X | CCCTCCTTTAATCAGSNNGTTGACTTGGCTGCTG | Ser ₁₆₇ → X |
| L168X | CAGCCCTTCTTTAATSNNGCTGTTGACTTGGCTGCTG | Leu ₁₆₈ → X |
| I169X | GTTCAGCCCTTCTTTSNNCAGGCTGTTGACTTG | Ile ₁₆₉ → X |
| K170X | GCCGTTTCCAGCCCTCSNNAATCAGGCTGTTGAC | Lys ₁₇₀ → X |
| E171X | CCCGCCGTTCCAGCCCSNNTTTAATCAGGCTGTT | Glu ₁₇₁ → X |
| G172X | ATTCGTATTCTCGCCCCCGCCGTTCCAGSNNTTC | Gly ₁₇₂ → X |
| L173X | ATTCGTATTCTCGCCCCCGCCGTTSNNCCCTTC | Leu ₁₇₃ → X |
| N174X | ATTCGTATTCTCGCCCCCGCSNNCAGCCCTTC | Asn ₁₇₄ → X |
| G175X | ATTCGTATTCTCGCCCCSNNGTTCAGCCCTTC | Gly ₁₇₅ → X |
| G176X | ATTCGTATTCTCGCCSNNGCCGTTCCAGCCCTTC | Gly ₁₇₆ → X |
| G177X | ATTCGTATTCTCSNNCCCGTTCCAGCCCTTC | Gly ₁₇₇ → X |
| Q178X | GCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCATTCGTATTSNNGCC | Gln ₁₇₈ → X |
| N179X | GCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCATTCGTSNNCTC | Asn ₁₇₉ → X |
| T180X | GCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCATTSNNATT | Thr ₁₈₀ → X |
| N181X | GCCGCAAGCTTGTGACGGACTCSNNCGT | Asn ₁₈₁ → X |

IUB-Code: N = A;C;G;T S = G;C X= sämtliche AS

Tab. 11: Übersicht der für die ortsspezifischen Mutagenesen verwendeten Oligonukleotide.

| Name | DNA-Sequenz (5'→3'-Richtung) | Merkmale/ Modifikationen |
|---------|---|-----------------------------|
| mp19up | AGCGGCCATATCCACCACCACCACAAGCATATG | <i>NdeI</i> |
| mp19low | ATACTCGAGCAGCAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTC | <i>XhoI</i> |
| N18Qlow | CTTAATCCCCGCAAACAGGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Gln |
| N18Slow | CTTAATCCCCGAAAAGCGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Ser |
| N18Llow | CTTAATCCCCGAAAAGTGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Leu |
| N18Ilow | CTTAATCCCCGAAAATCGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Ile |
| N18Alow | CTTAATCCCCGAAAAGCGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Ala |
| N18Rlow | CTTAATCCCCGAAAACCGGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Arg |
| N18Dlow | CTTAATCCCCGAAAAGTCGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Asp |
| N18Clow | CTTAATCCCCGAAAAGCAGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Cys |
| N18Elow | CTTAATCCCCGAAAATTCGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Glu |
| N18Glow | CTTAATCCCCGAAAAGCCGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Gly |
| N18Hlow | CTTAATCCCCGAAAAGTGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → His |
| N18Klow | CTTAATCCCCGAAAATTTGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Lys |
| N18Mlow | CTTAATCCCCGAAAACATGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Met |
| N18Flow | CTTAATCCCCGAAAAAAGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Phe |
| N18Plow | CTTAATCCCCGAAAACGGGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Pro |
| N18Tlow | CTTAATCCCCGAAAAGGTGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Thr |
| N18Wlow | CTTAATCCCCGAAAACAGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Trp |
| N18Ylow | CTTAATCCCCGAAAATAGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Tyr |
| N18Vlow | CTTAATCCCCGAAAACGAATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → Val |

Tab. 12: Übersicht der zur Rekombination und zur Herstellung der thermostabilen *lipA*-Genvarianten verwendeten Oligonukleotide.

| Name | DNA-Sequenz (5'→3' Richtung) | Merkmale/ Modifikationen |
|----------|--|-----------------------------|
| mut1up | CTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATG | <i>MslI</i> |
| mutSlow | ATATAAGCTTCAGCAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTC | <i>HindIII</i> |
| N18X | CTTAATCCCCGAAAASNNGAATGATGATGCCCCCTCC | Asn ₁₈ → X |
| N18Sup | GGAGGGGCATCATTCCAGCTTTGCGGGAATTAAG | Asn ₁₈ → Ser |
| N18Qup | GGAGGGGCATCATTCCAGCTTTGCGGGAATTAAG | Asn ₁₈ → Gln |
| N18Iup | GGAGGGGCATCATTCCATGTTGCGGGAATTAAG | Asn ₁₈ → Ile |
| N18Lup | GGAGGGGCATCATTCCCTGTTGCGGGAATTAAG | Asn ₁₈ → Leu |
| I22Tup | TTCAATTTTTCGCGGAACTAAGAGCTATCTCG | Ile ₂₂ → Thr |
| I22Tlow | CGAGATAGCTCTTAGTTCCCGCAAAATTG | Ile ₂₂ → Thr |
| Y49Cup | AAGACAGGCACAAATTGTAACAATGGACCGTA | Tyr ₄₉ → Cys |
| Y49Clow | TACCGGTCCATTGTTACAATTTGTGCCTGTCTT | Tyr ₄₉ → Cys |
| Y49Iup | AAGACAGGCACAAATATCAACAATGGACCGTA | Tyr ₄₉ → Ile |
| Y49Ilow | TACCGGTCCATTGTTGATATTTGTGCCTGTCTT | Tyr ₄₉ → Ile |
| Y49Vup | AAGACAGGCACAAATGTCAACAATGGACCGTA | Tyr ₄₉ → Val |
| Y49Vlow | TACCGGTCCATTGTTGACATTTGTGCCTGTCTT | Tyr ₄₉ → Val |
| N50Sup | ACAGGCACAAATTATAGCAATGGACCGTATTATC | Asn ₅₀ → Ser |
| N50Slow | TAATACCGGTCCATTGCTATAATTTGTGCCTGT | Asn ₅₀ → Ser |
| F58Lup | CCGGTATTATCACGACTTGTGCAAAAGTTTTAG | Phe ₅₈ → Leu |
| F58Llow | TAAAACCTTTTGCACAAGTCGTGATAATACCGG | Phe ₅₈ → Leu |
| Q60Nup | TTATCACGATTTGTGTTGAAGTTTTAGATGAA | Gln ₆₀ → Leu |
| Q60Nlow | CATCTAAAACCTTCAACACAAATCGTGATAA | Gln ₆₀ → Leu |
| Q60Lup | TTATCACGATTTGTGAACAAGTTTTAGATG | Gln ₆₀ → Asn |
| Q60Llow | CATCTAAAACCTTGTTCACAAATCGTGATAA | Gln ₆₀ → Asn |
| L114Pup | ACGACAGGCAAGGCGCCTCCGGGAACAGATCC | Leu ₁₁₄ → Pro |
| L114Plow | TGGATCTGTTCCCGGAGGCGCCTTGCTGTCTG | Leu ₁₁₄ → Pro |
| C124Slow | GTAAATGGATGTGTATGAAATCTTTGATTTGG | Leu ₁₂₄ → Ser |
| A132Dup | TCCATTTACAGCAGTGACGATATGATTGTCATG | Ala ₁₃₂ → Asp |
| A132Dlow | CATGACAATCATATCGTCACTGCTGTAAATGG | Ala ₁₃₂ → Asp |
| N166Yup | TACAGCAGCCAAGTCTACAGCCTGATTAAGAAG | Asn ₁₆₆ → Tyr |
| N166Ylow | TTCTTTAATCAGGCTGTAGACTTGGCTGCTGTAC | Asn ₁₆₆ → Tyr |

2.5 Nährmedien

LB-Medium: 10 g/l Trypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefeextrakt
 2x LB/Medium: 20g/l Trypton; 10 g/l NaCl; 10 g/l Hefeextrakt
 LB/M9-Medium: 50 % (v/v) 2x LB/Medium; 10 % (v/v) M9-Lösung 1; 1 % (v/v) M9- Lösung 2; 1 % (v/v) M9-Lösung 3; 10 % (v/v) M9-Lösung 4
 M9-Lösung 1: 40 g/l Glucose
 M9-Lösung 2: 25 g/l MgSO₄ x 7H₂O
 M9-Lösung 3: 2 g/l CaCl₂
 M9-Lösung 4: 70 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O; 30 g/l KH₂PO₄; 5 g/l NaCl; 10 g/l NH₄Cl

Die Medien wurden vor der Anwendung autoklaviert. Nicht-hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm oder 0,45 µm, SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) und dem autoklaviertem Medium nach dem Erkalten hinzugesetzt. Zur Herstellung von Festmedien wurde dem entsprechendem Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

2.6 Anzucht und Lagerung von Bakterien

E. coli Stämme wurden in LB-Medium angeimpft und bei 37 °C bebrütet. Überexpressionskulturen wurden in LB/M9-Medium angezogen. Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden im Reagenzglas auf dem Brutroller angezogen. Flüssigkulturen größerer Volumina wurden im Erlenmeyerkolben auf einem Brutschüttler (GFL, Burgwedel) bei 150 UpM bebrütet. Das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyerkolben entsprach stets 1:10. Übernachtskulturen wurden mindestens 16 h kultiviert. Hauptkulturen wurden jeweils aus einer Übernachtskultur mit 1/100 Volumen angeimpft. Zur Durchmusterung von Enzybibibliotheken wurden Plasmid-tragende *E. coli* BL21(DE3)-Klone in Mikrotiterplatten mit 96 Trögen und einem Trogvolumen von 2 ml angezogen. Dabei betrug das Kulturvolumen 1 ml. Zur Expression der heterologen Gene wurde die Expression der T7-RNA-Polymerase bei dem Erreichen einer O.D._{580 nm} = 0,5-0,7 mit IPTG (Endkonzentration 0,4 mM) induziert.

Stämme mit Plasmid-codierten Resistenzmarken wurden stets unter Selektionsdruck durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin oder Carbenicillin kultiviert. Zur dauerhaften Lagerung der Stämme wurden Übernachtskulturen mit 7,5 % (v,v) DMSO versetzt und bei -80 °C tiefgefroren.

2.7 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde nach der von BIRNBOIM & DOLY (1979) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder unter Verwendung von Plasmid-Isolationskits der Firma QIAGEN (Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

2.8 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA und der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Dabei wurde die von SAMBROCK *et al.* 1989 beschriebene Methode angewendet. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 x TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM EDTA; pH 8,3) benutzt.

Als Größstandard für die DNA-Gele wurde die „1kb-ladder“ von INVITROGEN (Karlsruhe) verwendet. Zur Dokumentation der Gelelektrophorese-Ergebnisse wurde das Videodokumentationssystem „Gel Jet Imager Plus“ der Firma INTAS (Göttingen) benutzt.

Zur Reinigung der DNA aus Agarosegelen wurde das „NucleoSpin-Extract“-Kit der Firma MACHERRY-NAGEL (Düren) nach Herstellerangaben verwendet.

2.9 *In vitro* Rekombination von DNA

Die Restriktion und die Ligation von DNA-Fragmenten wurde nach SAMBROCK *et al.* (1989) sowie nach den Angaben der Hersteller der jeweiligen Enzyme durchgeführt. Die Reaktionen wurden in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.10 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* BL21(DE3)-Zellen sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden nach der RbCl-Methode von HANAHAN (1983) durchgeführt.

2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.11.1 Standard-PCR-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach SAIKI *et al.* (1988) durchgeführt. Standardmäßig wurden PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

1 ng Plasmid-DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Taq*- oder *Pfu*-DNA-Polymerase. Die Reaktionen wurden in den MgCl₂ oder MgSO₄ enthaltenden Puffern der Hersteller durchgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Automaten („Mastercycler gradient“) der Firma EPPENDORF (Hamburg) durchgeführt. Dabei kamen folgende zwei Programme zur Anwendung:

Programm 58: 1x (3 min 98 °C), 35x (1 min 95 °C; 2 min 58 °C; 1 min 72 °C) und 1x (7 min 72 °C).

Programm 65: 1x (3 min 98 °C), 35x (1 min 95 °C; 2 min 65 °C; 1 min 72 °C) und 1x (7 min 72 °C).

Zur Reinigung von PCR-Produkten wurde das „NucleoSpin Extract“-Kit der Firma MACHERRY-NAGEL (Düren) nach Herstellervorschrift gebraucht.

2.11.2 Ortspezifische Mutagenese

Zielgerichtete Basenaustausche wurden mit der „Megaprimer“-Methode nach BARETTINO *et al.* (1994) in das *lipA*-Strukturgen von *B. subtilis* eingeführt. Dabei wurde mit einer ersten Standard-PCR-Reaktion (Programm 65, siehe 2.11.1) ein Megaprimer synthetisiert, der durch den eingesetzten Mutagenese-Primer (Tab. 11) die gewünschte Punktmutation enthielt. In dieser Reaktion wurden als weiteres DNA-Startermolekül das Oligonukleotid mp19up und als Matrizen-DNA das Plasmid pET19lipA verwendet. In einer zweiten PCR-Reaktion (Programm 65, siehe 2.11.1) wurden zur Amplifizierung des kompletten *lipA*-Gens der Megaprimer zusammen mit den DNA-Startermolekülen mp19up und mp19low eingesetzt. In dieser zweiten PCR-Reaktion wurde als Matrizen-DNA das Plasmid pUlipA eingesetzt. Da dieses keine Bindungsstellen für das PCR-Startermolekül mp19up bot und das Oligonukleotid mp19low nicht mit der Matrizen-DNA der ersten PCR (pET19lipA) hybridisieren konnte, wurde eine Amplifikation der *lipA*-Wildtyp-Sequenz vermieden.

2.11.3 Sättigungsmutagenese

Sättigungsmutagenesen wurden durchgeführt, um ein bestimmtes Basen-Triplett vollständig zu mutagenisieren und so im Austausch gegen die Wildtyp-Aminosäure sämtliche anderen natürlichen Aminosäuren an dieser Position in das BSLA-Protein einzuführen. Für die Sättigungsmutagenese wurde ebenfalls die von BARETTINO *et al.* (1994) beschriebene Methode

der „Megaprimer“-PCR (2.11.2) verwendet. Das Protokoll wich wie folgt von dem unter 2.11.2. beschriebenen ab:

In der ersten PCR-Standard-Reaktion (Programm 58, 2.11.1) zur Herstellung des Megaprimers wurden das Oligonukleotid mut1up, der Mutagenese-Primer (Tab. 10) und das Plasmid pET22lipA als Matrizen-DNA verwendet. In der zweiten PCR-Standard-Reaktion (Programm 65, 2.11.1) wurden der Megaprimer und die Oligonukleotide mut1up und mutS3 eingesetzt. Das Plasmid pUlipA diente hierbei als Matrizen-DNA. Da dieses keine Bindungsmöglichkeit für das Oligonukleotid mut1up aufwies und das Oligonukleotid mutS3 nicht mit der Matrizen-DNA der ersten PCR-Reaktion (pET22lipA) hybridisieren konnte, wurde die Amplifikation der *lipA*-Wildtyp-Sequenz verhindert.

2.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma SEQUIERVE (Vaterstetten) durchgeführt.

2.13 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von BRADFORD (1976) spektralphotometrisch („UV-1602“, SHIMADZU, Duisburg) bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS in einem diskontinuierlichem Gelsystem (LAEMMLI, 1970), welches sich aus einem 5 % igem Sammelgel und aus einem 15 % igem Trenngel zusammensetzte. Dazu wurde die „Mini Protean II Dual Slap Cell“-Gelapparatur der Firma BIORAD (München) bei einer Spannung von 150 V verwendet. Vor der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteinproben in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und 10 min bei 98 °C denaturiert. Gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Elektrophorese durch eine TCA-Fällung nach PETERSON (1977) präzipitiert und in A. dest aufgenommen. Die aufgetrennten Proteine wurden mit „SimplyBlue SafeStain“ der Firma INVITROGEN (Karlsruhe) gefärbt.

2.15 Chromatographische Reinigung der Lipase-Varianten

Die Reinigung der Proteine erfolgte nach der intrazellulären Expression der korrespondierenden Gene mit Hilfe der Vektoren pET19lipA, pET19lipB, pET19lipA-N18Q und pET19lipA-F3 im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) (2.3) als N-terminale Poly-Histidin-Fusionsproteine durch immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) nach PORATH *et al.* (1975). Nach der Expression im 1 l-Maßstab wurden die enzymhaltigen Zellen durch Zentrifugation geerntet (SORVALL „SLC-4000“, KENDRO LABORATORY PRODUCTS, Langenselbold, 6000 UpM, 20 min, 4 °C), in 15 ml Lyse-Puffer (30 mM Imidazol; 300 mM NaCl; 50 mM NaH₂PO₄; pH 8,0) mit 20 mg Lysozym und 0,01 mg DNaseI aufgenommen und mit Ultraschall aufgeschlossen („Sonopuls HD 60“, BANDELIN, Berlin). Der so gewonnene Zellrohextrakt wurde zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugiert (SORVALL, SS-34, 18.000 UpM, 30 min, 4 °C), der dabei enthaltende Überstand filtriert (Porengröße 5 μ m, SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) und anschließend über eine mit mindestens fünf Säulenvolumen equilibrierte, „Ni-NTA superflow“-Säule (30 ml Säulenvolumen, QIAGEN, Hilden) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min gepumpt. Die Säule wurde mit Wasch-Puffer (50 mM Imidazol; 300 mM NaCl; 50 mM NaH₂PO₄; pH 8,0) gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm Lichtwellenlänge konstant blieb und anschließend mit Elutions-Puffer (250 mM Imidazol;

300 mM NaCl; 50 mM NaH₂PO₄; pH 8,0) bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Das Lipase-haltige Eluat wurde zur Entsalzung direkt auf eine mit mindestens fünf Säulenvolumen Lipase-Puffer (2 mM Glycin/NaOH; pH 11,0) equilibrierte „Sephadex G-25 Medium“-Säule (1 l Säulenvolumen, AMERSHAM-BIOSCIENCES, Freiburg) gepumpt. Diese wurde dann mit Lipase-Puffer mit einer Flussrate von 20 ml/min gespült und die Proteinelutionsfraktion aufgefangen. Gegebenenfalls wurde die Proteinlösung anschließend aufkonzentriert („Vivacell 250“, VIVASCIENCE, Hannover) und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C oder bei 4 °C gelagert.

2.16 Herstellung von Zellrohextrakten

Für die Bestimmung von Enzymaktivitäten und Enantioselektivitäten wurden zum Teil intrazellulär exprimierte Lipasevarianten in Zellrohextrakten eingesetzt. Dazu wurde die Zellsuspension nach der Expression in 1 ml Aliquots aufgeteilt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (13.000 UpM, 3 min, 4 °C), in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgenommen und anschließend mittels Ultraschall („Sonopuls HD 60“, BANDELIN, Berlin) aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (13.000 UpM, 15min, 4 °C) von den Zellrohextrakten abgetrennt.

2.17 Fraktionierung von *E. coli*-Zellen

Zur Untersuchung der Lokalisation unterschiedlicher Lipasevarianten nach der Protein-Expression (2.6) wurden die Zellsuspensionen in Kulturüberstand, Periplasmafraktion und Cytoplasmafraktion getrennt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (13.000 UpM, 5 min, 4 °C) wurde der Kulturüberstand sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,45 µm, SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) um Kontaminationen mit Zellen oder Zellfragmenten zu verhindern. Die Auftrennung in Periplasma- und Cytoplasmafraktion erfolgte nach einem Protokoll von WITHOLT *et al.* (1976).

2.18 Nachweis und Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.18.1 Herstellung von Substratsuspensionen/-emulsionen (modifiziert nach KOLATTUKUDY *et al.*, 1981)

(R)-/(S)-1-(2-Naphthyl)ethylacetat und Poly-(D,L)-Lactid: 0,25 mg des jeweiligen Esters wurden mit 300 mg Triton X-100 in 6 ml Dichlormethan gelöst. Das Dichlormethan wurde über Nacht unter dem Abzug abgedampft. Das verbleibende Substrat wurde in 6 ml A. dest aufgenommen und gründlich geschüttelt.

Poly-(3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat): 0,125 mg des Substrates wurden mit 300 mg Triton X-100 in 20 ml Diethylether gelöst. Nach dem Abdampfen des Diethylethers wurde das Substrat in 25 ml A. dest mit Hilfe einer Ultraschall-Sonde („Sonopuls HD 60“, BANDELIN, Berlin) emulgiert.

Bionolle 1001 und 3001: Die Substratsuspensionen wurden nach UCHIDA *et al.*, (2000) unter Anwendung von Triton X-100 als Detergenz hergestellt.

2.18.2 Indikatoragarplatten

Tributyryn-agar-Platten: Für den qualitativen Nachweis von Lipasen wurden aus Tributyrinagar (KOK *et al.*, 1993) hergestellte Indikatorplatten verwendet.

Skim-Milk-Platten: Für den qualitativen Nachweis von Proteaseaktivität wurde eine 6 % (w/v) Skim-Milk-Suspension für 30 min bei 105 °C autoklaviert und 1:1 mit LB-Agar (2.5) vermischt.

(R)-/(S)-1-(2-Naphthyl)ethylacetat-Platten: Zum Herstellen von enantiomerenreinen Indikatorplatten wurde die entsprechende Substratemulsion (2.18.1) 1:9 mit LB-Agar (2.5),

welcher mit 0,0375 g Solvent Blue 38 (SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen) angefärbt war, mit Hilfe eines „Ultra Turrax T25 basic“ (IKA LABORTECHNIK, Staufen) vermischt.

Poly-(D,L)-Laktid-Platten: Die entsprechende Substratsuspension (2.18.1) wurde 1:1 mit LB-Agar (2.5) und mit Hilfe eines „Ultra Turrax T25 basic“ (IKA LABORTECHNIK, Staufen) vermischt.

Poly-(3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat)-Platten: Die entsprechende Substratsuspension wurde 1:3 mit LB-Agar (2.5) und mit Hilfe eines „Ultra Turrax T25 basic“ (IKA LABORTECHNIK, Staufen) vermischt.

2.18.3 Spektrometrische Nachweise von Depolymerase-Aktivität

pH-Indikator-Test nach JANES *et al.*, (1998):

Die Hydrolyse von Polymeren wurde über einen pH-Indikator-Test nachgewiesen. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte 67 μ l der jeweiligen Substratsuspension (2.18.1) mit 120 μ l pH-Indikatorpuffer (5 mM EPPS-Puffer pH 8,0; 0,45 mM Phenolrot) vermischt und es wurden etwa 13 μ g der Enzyme BSLA und BSLB in gereinigter Form (2.15) in 13 μ l Lipase-Puffer (2 mM Glycin/NaOH; pH 11,0) hinzugegeben.

Turbiditäts-Tests (modifiziert nach AKUTSU-SHIGENO *et al.*, 2003):

Für den Nachweis des Abbaus von Polymeren durch Lipasen wurden die jeweiligen Substratsuspensionen der Polymere (2.18.1) mit 1 M Tris/HCL-Puffer (pH 7,5) verdünnt, bis sie im Spektralphotometer („UV-1602“, SHIMADZU, Duisburg) im Vergleich zu Puffer ohne Substratsuspension eine O.D._{580nm} von < 1 aufwiesen. Nach Zugabe von ca. 100 μ g gereinigter Lipase in Lipase-Puffer (2 mM Glycin/NaOH; pH 11,0) wurden die Ansätze unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und die Abnahme der O.D._{580 nm} nach unterschiedlichen Zeitintervallen gemessen.

2.18.4 Spektrometrische Methode zur Bestimmung von Lipase-Aktivität

Lipase-Aktivitäten von Kulturüberständen oder Zellrohextrakten wurden nach der von WINKLER & STUCKMANN (1979) beschriebenen Methode mit *para*-Nitrophenyl-Palmitat als Substrat bestimmt. Die Formel zur Berechnung der Lipaseaktivität ist im Anhang unter 8.1.1 angegeben.

2.19 Bestimmung von Enantioselektivitäten

2.19.1 Bestimmung von Enantioselektivitäten mittels Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Enantioselektivitäten der Lipase-Varianten wurden mit Hilfe einer auf ESI-MS basierenden Methode nach REETZ *et al.* (1999) bestimmt. Dafür wurde *pseudo-meso*-1-Trideuteroacetoxy-4-acetoxy-2-cyclopenten als Substrat eingesetzt.

Die Messungen wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR KOHLENFORSCHUNG (Mülheim a. d. Ruhr) von Herrn A. EIPPER und Herrn H. KRUMM im Arbeitskreis PROF. DR. REETZ durchgeführt.

Das spezielle Protokoll ist im Detail bei FUNKE *et al.* (2003) beschrieben. Abweichend davon wurden neben Kulturüberständen auch Zellrohextrakte (2.16) für die Bestimmungen von Enantioselektivität eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem LC-MS-System, welches aus einem „Waters ZMD“-Massenspektrometer, einem „Waters 2700“-Autosampler und einer „Waters600“-Pumpe der Firma WATERS (Manchester, UK) bestand. Bei Varianten mit veränderter Enantioselektivität wurden die Messwerte mit chiraler Gaschromatographie-Analyse (2.19.2) reproduziert.

2.19.2 Bestimmung von Enantioselektivitäten/Enzymaktivitäten mittels chiraler Gaschromatographie-Analyse

Die Messungen der Umsetzungen von meso-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten durch Lipasen in Zellrohextrakten wurden im MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR KOHLENFORSCHUNG (Mülheim an der Ruhr) zusammen mit Herrn H. KRUMM im Arbeitskreis PROF. DR. REETZ durchgeführt. Dafür wurden 120 µl Rohzelleextrakt mit 120 µl Phosphatpuffer (10 mM pH 7,5) und 20 µl Substratlösung (in DMSO), Endkonzentration 10 mM, für 24 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat gründlich vermischt. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation (5 min, 13.000 UpM) wurde die organische Phase abgenommen und mittels Gaschromatographie untersucht. GC-Bedingungen: Gaschromatograph HEWLETT PACKARD (Böblingen) „6890-2“. Chirale Säule „IVADEX“, 25 m. Trägergas: Helium. Temperaturprogramm: → 140 °C (5 °C/min), 140-340° (15 °C/min).

Die Analyse von Umsetzungen von cis- und rac-trans-1,2-Cyclohexandiol-bis-acetat, rac-1-Phenylethylacetat und rac-1-(2-Naphthyl)ethylacetat durch Lipase-Varianten in Kulturüberständen und Zellrohextrakten erfolgte am Gaschromatographen „GC-17A“ (SHIMADZU, Duisburg). GC-Bedingungen: chirale Säule „CP-Chirasil-DEX CB“, 25m x 0,25 mm ID (VARIAN, Darmstadt). Trägergas: Helium. Temperaturprogramm: 60 °C (5 min), 60-195 °C (5 °C/min). Der Testansatz enthielt, soweit nicht anders beschrieben, neben den Zellrohextrakten oder Kulturüberständen 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5) und 10 mM des jeweiligen Substrates, gelöst in DMSO. Die Inkubation der Ansätze erfolgte in der Regel über 24 h unter Schütteln bei Raumtemperatur. Die Analysen von Umsetzungen von rac- α , β -Isopropylidenglycerolbutyrat und rac- β -Citronellyl-Butyrat durch Lipase-haltige Zellrohextrakte wurden im Rahmen einer Kooperation im „LABORATORY OF PHARMACEUTICAL BIOLOGY“ der RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN, Niederlande mit Hilfe von Frau Y. BOERSMA in der Arbeitsgruppe von PROF. DR. QUAX durchgeführt.

Das spezielle Protokoll für Umsetzung und die gaschromatographische Analyse von rac- α , β -Isopropylidenglycerolbutyrat ist im Detail bei DRÖGE *et al.*, (2003b) beschrieben. Es wurden hierfür je 500 µl Zellrohextrakt eingesetzt.

Für die Umsetzungen von rac- β -Citronello-Butyrat durch Lipase-haltige Zellrohextrakte wurde zunächst durch das Lösen der Ester (2 mM Endkonzentration) in 14,3 % (w/v) Tween 80 enthaltendem 0,07 M MOPS-Puffer (pH 7,5) und durch das anschließende Verdünnen mit dem 5 fachen Volumen 0,07 M Mops-Puffer (pH 7,5) eine Substratlösung hergestellt. 500 µl von dieser wurden mit 500 µl Zellrohextrakt vermischt und der Ansatz wurde für 75 min bei 32 °C inkubiert. Nach der Umsetzung erfolgte eine Festphasenextraktion wie im Detail bei DRÖGE *et al.* (2003b) beschrieben. GC-Bedingungen: Gaschromatograph HEWLETT PACKARD (Böblingen) „5890 SERIES II“. Chirale Säule: „BETA DEX 225 Supelco“, 30 m x 0,25mm ID (SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen). Trägergas: Helium. Temperaturprogramm: 90 °C (35 min), 90-170 °C (4 °C/min).

2.20 Bestimmung von Thermo- und pH-Stabilität

Die Temperaturstabilität der Enzyme wurde durch die Bestimmung der lipolytischen Restaktivität nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen über verschieden lange Zeitspannen ermittelt. Die Aktivität wurde spektrophotometrisch mit para-Nitrophenyl-Palmitat als Substrat (2.18.4) bestimmt. Die Bestimmung der pH-Stabilität wurde wie bei EGGERT *et al.* (2000) beschrieben durchgeführt.

2.21 Bestimmung der lipolytischen Aktivität nach Inkubation der Enzyme in ionischen Flüssigkeiten

Die ionischen Flüssigkeiten Nr. 1-5 wurden freundlicherweise von PROF. DR. WILLBOLD, INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE BIOLOGIE der HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF, zur Verfügung gestellt. Aufgrund eines laufenden Patentverfahrens dürfen die Namen der Stoffe nicht angegeben werden. Es wurden je 2 µl gereinigte Lipase in 8 µl Lipase-Puffer (2 mM Glycin/NaOH; pH 11,0) oder in der jeweiligen ionischen Flüssigkeit für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in einen *p*-Nitrophenyl-Palmitat-Test auf lipolytische Aktivität (2.18.4) eingesetzt.

2.22 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA-, und Aminosäuresequenzen sowie Protein-Strukturuntersuchungen erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme „Clone Manager für Windows 7.0“, „Plasmid MapEnhancer 3.0“ (SCIENTIFIC AND EDUCATIONAL SOFTWARE, Durham, USA), „CS ChemDraw Pro 7.0“ (CAMBRIDGESOFT, Cambridge, USA) und „Cn3D4.1 des NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Homologie und Sequenzvergleiche wurden mittels der Internet-Datenbank des „NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION“ mit den BLAST-Algorithmen (ALTSCHUL *et al.*, 1997) durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe eines Scanners („HP Precisionscan Pro 3.1“, HEWLETT PACKARD, Böblingen), einer digitalen Kamera sowie einer Videodokumentationsanlage digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Bei diesen Ergebnissen handelt es sich um die der Agarosegelelektrophorese, der SDS-PAGE-Analysen sowie der Indikatorplatten für die qualitativen Enzymnachweise. Während der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Änderungen der Abbildungen vorgenommen.

Die Abbildung 33 wurde von Herrn N. OTTE des Arbeitskreises „THEORETISCHE CHEMIE“ von PROF. DR. THIEL des MAX-PLANCK INSTITUTS FÜR KOHLENFORSCHUNG, Mülheim a.d. Ruhr, mit dem Programm „Pymol“ angefertigt und zur Verfügung gestellt. Alle in dieser Arbeit gezeigten Strukturabbildungen basieren auf den Strukturdaten von VAN POUDEROYEN *et al.*, (2001).

3 ERGEBNISSE

3.1 Biochemische Charakterisierung der Lipasen A (BSLA) und B (BSLB) aus *Bacillus subtilis*

2001 wurden die BSLA und die BSLB im Rahmen einer Dissertation von EGGERT gereinigt und biochemisch charakterisiert. Dafür wurden zuerst die korrespondierenden Gene beider Lipasen im homologen Wirt *B. subtilis* exprimiert. Anschließend wurden beide Lipasen in einem aufwendigen 2-Schritt-Prozeß gereinigt, welcher nur zu geringen Ausbeuten von 1-12 % führte. Zusätzlich erwies sich diese Methode der Reinigung als nicht immer reproduzierbar. Für eine weiterführende Charakterisierung beider Proteine sollten die korrespondierenden Gene im Rahmen dieser Arbeit im heterologen Wirt *E. coli* überexprimiert und die Proteine mittels eines N-terminal fusionierten His-Tags affinitätschromatographisch gereinigt werden.

3.1.1 Überexpression des *lipA*- und *lipB*-Gens im heterologen Wirt *E. coli* und chromatographische Reinigung der korrespondierenden Proteine

Für die Expression beider Gene wurden die von ROSENBAUM 2003 gefertigten Konstrukte pET19lipA und pET19lipB verwendet (zur Konstruktion von pETlipA und pETlipB siehe Abb. 34 im Anhang). Diese wurden in den Expressionstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Nach der erfolgreichen Expression beider Gene entstehen intrazellulär verbleibende Lipasen mit N-terminalem Histidin-Decamer. Die SDS-PAGE-Analyse zeigte eine deutliche Proteinbande der BSLA und eine 10-fach geringere Proteinbande der BSLB (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Aufreinigung der im Zellrohextrakt vorliegenden Proteine erfolgte durch immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC). Danach wurde das Lipase-haltige Eluat mit Hilfe einer Sephadex G-25-Säule entsalzt. Abb. 9 zeigt SDS-PAGE-Analysen der gereinigten Enzyme. Es ist jeweils eine einzelne Bande bei etwa 21 kDa zu erkennen. Aus in einem Liter LB/M9-Medium für 3 h kultivierten *E. coli*-Zellen konnten 38 mg BSLA-Protein und etwa 4 mg BSLB-Protein gewonnen werden. Dabei lagen die Ausbeuten der Reinigung bei fast 30 % für das BSLA-Protein und bei etwa 15 % für das BSLB-Protein (siehe Tab. 13). Das in einem Tag durchführbare Reinigungsprotokoll erwies sich als reproduzierbar.

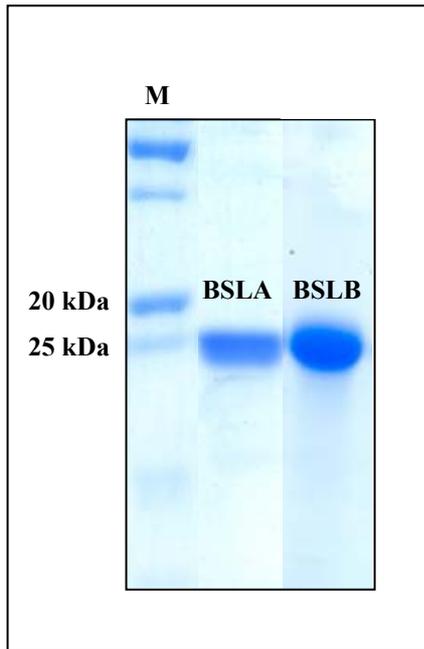


Abb. 9: SDS-PAGE-Analysen von gereinigtem BSLA- und BSLB-Protein. Es wurden jeweils etwa 20 µg Protein aufgetragen. M: Marker

Tab. 13: Ausbeuten bei der Reinigung der BSLA und BSLB-Proteine. Die *lipA*- und *lipB*-Gene wurden in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (Plasmide pET19lipA/pET19lipB) in einem Liter LB/M9-Medium für drei Stunden exprimiert. Es befanden sich in beiden Fällen etwa 380 mg Gesamtprotein im Zellrohextrakt, die Gesamtaktivität der Rohextrakte lag bei 14180 U für den BSLA-Ansatz und bei 4900 U für den BSLB-Ansatz. Die Reinigung erfolgte über immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie. Anschließend wurde das enzymhaltige Eluat mittels einer Sephadex G-25-Säule entsalzt. Die Aktivitäten wurden gegenüber dem Substrat *p*-Nitrophenyl-Palmitat bestimmt.

| Protein | Proteinmenge [mg] | Aktivität [U] | spezifische Aktivität [U/mg] | Ausbeute [%] |
|---------|----------------------|------------------|---------------------------------|-----------------|
| BSLA | 38 | 3990 | 105,0 | 28,0 |
| BSLB | 4,1 | 657 | 162,2 | 13,4 |

3.1.2 BSLA und BSLB weisen Depolymerase-Aktivität auf

Aliphatische Polyester wie Poly-(D,L-Lactid) (PLA), Poly-(butylen-succinat) (PBS, Handelsname Bionolle 1001), Poly-(butylen-succinat-*co*-adipat) (PBSA, Handelsname Bionolle 3001) und Poly-(Hydroxybutyrat-*co*hydroxyvalerat) (PHB*co*Va) gehören zu den biodegradierbaren, synthetischen Polyestern, die als Alternativen zu konventionellen, nicht biodegradierbaren Plastikwerkstoffen entwickelt wurden (VERT, 1989). Soweit bisher bekannt, sind nur wenige Mikroorganismen in der Lage, PLA zu hydrolysieren. 2003 wurde von AKUTSTU-SHIGENO *et al.* erstmalig die molekulare Analyse eines Gens beschrieben, dass für die PLA-Depolymerase/Lipase PlaA aus *Paenibacillus amylolyticus* codiert. Das korrespondierende Enzym weist einige Ähnlichkeiten zu den Lipasen auf, die der Familie I-4 und I-5 der Lipasen (ARPIGNY & JAEGER, 1999; JAEGER & EGGERT, 2002) angehören. Zu der BSLA und der BSLB weist es 45-50 % Aminosäuresequenz-Identität auf. Dabei ist die für die Enzymfamilie I-4 beschriebene Konsensussequenz A-H-S-M-G zu 100 % eingehalten.

Weitere Ähnlichkeiten finden sich bei dem Vergleich der Enzymgröße (PlaA: 170 Aminosäuren, 12,32 kDa Molekulargewicht), der katalytischen Triade (für PlaA vorhergesagt: Ser78, Asp128, His151), des pH-Optimums (PlaA: pH 10), der Temperaturstabilität (PlaA stabil bis: 50 °C) und des Substratspektrums (PlaA hydrolysiert bevorzugt *p*-Nitrophenyl-Ester mit Acyl-Kettenlängen von C4-C8). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten sollten die BSLA und die BSLB auf ihre katalytische Aktivität gegenüber den oben im Text genannten Polyestern geprüft werden.

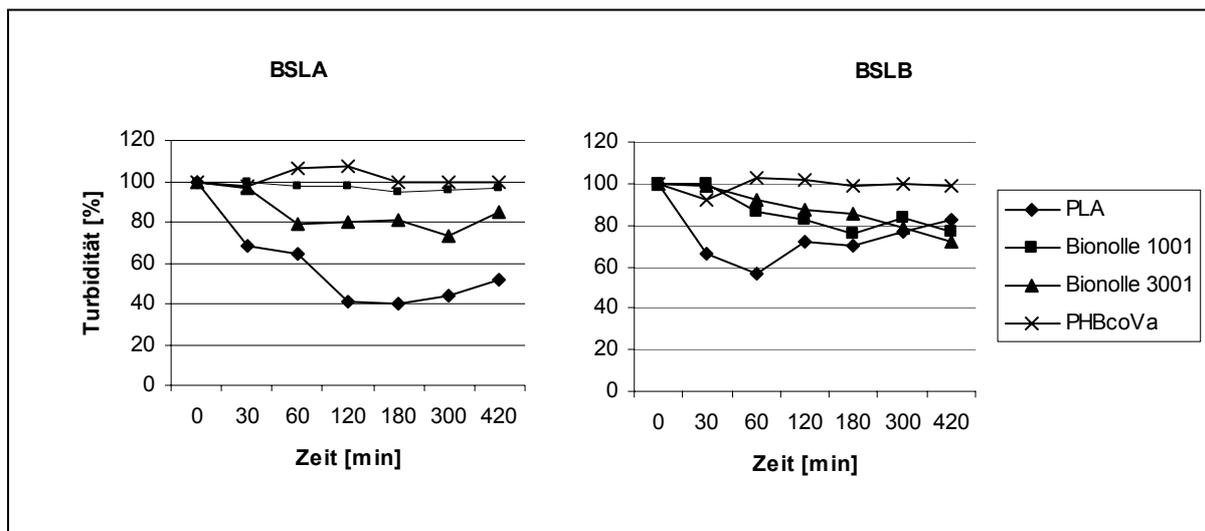


Abb. 10: Depolymerase-Aktivität der BSLA und der BSLB. Es wurden je 100 µg gereinigtes Enzym über 420 min mit der jeweiligen Substratsuspension bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde der enzymatische Verdau der Polyester indirekt über die Bildung löslicher Abbauprodukte nachgewiesen, wodurch die Turbidität des Testansatzes (gemessen über die O.D._{580nm}) abnahm. Es wurden drei voneinander unabhängige Messungen durchgeführt. Die durchschnittliche Standardabweichung liegt unter 5%. Als Kontrollen wurden die jeweiligen Substratsuspensionen vermessen, die anstelle von Enzym mit Lipase-Puffer (2 mM Glycin/NaOH; pH 11,0) inkubiert wurden.

Wie aus Abb. 10 ersichtlich, spalteten sowohl die BSLA als auch die BSLB das Substrat PLA. Während keines der Enzyme PHBcoVa umsetzte, wurde Bionolle 3001 von beiden Enzymen, Bionolle 1001 von LipB zu einem geringen Prozentsatz hydrolysiert. Zur Überprüfung dieser Befunde wurden alle Substrate zusammen mit den Lipasen in einem pH-Test eingesetzt, in dem der Abbau des Substrates und das dadurch bedingte Freiwerden von Fettsäuren durch Farbumschlag eines in dem Puffer befindlichen pH-Indikators nachgewiesen werden konnte. Die Substrate Bionolle 1001 und 3001 fielen in den Testlösungen sofort aus und konnten daher nicht geprüft werden. Wie in Abb. 11 gezeigt, deutete sich bei beiden Lipasen eine Spaltung von PLA durch den Farbumschlag des pH-Indikators an. Ebenfalls mit den Messungen des Turbiditätstest übereinstimmend zeigten beide Lipasen keine Hydrolyse von PHBcoVa.

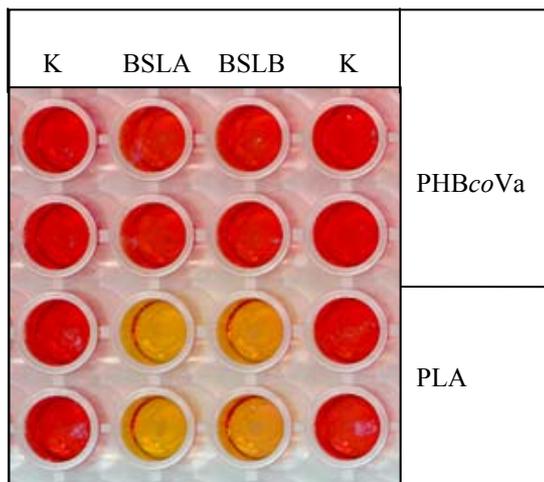


Abb. 11: pH-Indikator-Test zum Nachweis von hydrolytischer Aktivität. Zur Kontrolle (K) wurden Testansätze angelegt, in die statt 5 µg Lipase nur Lipase-Puffer (2mM Glycin/NaOH; pH 11,0) gegeben wurde.

Da von einigen Autoren angenommen wird, dass PLA von Enzymen hydrolysiert wird, welche Protease-ähnliche Eigenschaften aufweisen (WILLIAMS, 1981; LI *et al.*, 2002), wurden *E. coli* BL21(DE3)-Klone, welche die Plasmide pET22lipA und pET22lipB trugen, auf Skim-Milk-Agar-Platten auf eventuelle Protease-Aktivität geprüft. Durch die Bildung von Klärhöfen konnte Protease-Aktivität der Lipasen nachgewiesen werden (Abb. 12).

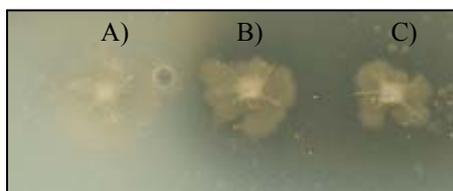


Abb. 12: Klärhofbildung auf Skim-Milk-Platten durch die BSLA (B) und die BSLB (C). Die *E. coli* BL21(DE3)-Klone tragen die Plasmide pET22lipA und pEt22lipB. Unter A) ist der Kontrollversuch gezeigt, für den der Bakterienstamm mit einem Leerplasmid transformiert wurde.

3.1.2 Die BSLA und die BSLB zeigen eine Erhöhung ihrer lipolytischen Aktivität in ionischen Flüssigkeiten

Ionische Flüssigkeiten sind hochpolare und nicht-flüchtige Salze, die bei Raumtemperatur flüssig bleiben. Biokatalytische Reaktionen, die in ihnen vollzogen werden, sind häufig von erhöhter Aktivität, Thermostabilität oder Enantioselektivität geprägt (PARK & KAZLAUSKAS, 2003; VAN RANTWIJK *et al.*, 2003). Daher sollte getestet werden, ob die BSLA und die BSLB nach der Inkubation in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten weiterhin lipolytische Aktivität zeigen. Aufgrund eines laufenden Patentverfahrens dürfen die Namen der ionischen Flüssigkeiten an dieser Stelle nicht erwähnt werden. Es wurden je 2 µl verdünnte Enzymlösung über 24 h bei Raumtemperatur in fünf verschiedenen ionischen Flüssigkeiten und, zur Kontrolle, in Lipase-Puffer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die

lipolytischen Aktivitäten mittels *p*-Nitrophenyl-Palmitat-Test bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 14 wiedergegeben. Während der Inkubation in den ionischen Flüssigkeiten Nr. 2 und Nr. 5 wurden beide Enzyme vollkommen inaktiviert. Die BSLA zeigte nach der Inkubation in den ionischen Flüssigkeiten Nr. 3 und Nr. 4 große Steigerungen der Aktivität. Die Aktivität der BSLB konnte durch Inkubation in der ionischen Flüssigkeit Nr. 4 deutlich gesteigert werden.

Tab. 14: Lipolytische Aktivitäten der BSLA und der BSLB nach Inkubation in ionischen Flüssigkeiten. Die Enzyme wurden 24 h bei Raumtemperatur in Lipasepuffer (2 mM Glycin/NaOH; pH 11,0) oder in den ionischen Flüssigkeiten inkubiert. Anschließend wurde die lipolytische Aktivität der Enzyme mittels *p*-Nitrophenyl-Palmitat-Test bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Messungen durchgeführt. Die Standardabweichung liegt unter 4 % für jeden einzelnen Wert. Die Aktivität der Lipasen in Lipase-Puffer (2 mM Glycin/NaOH; pH 11,0) wurde als 100 % definiert und die Aktivität der in ionischen Flüssigkeiten inkubierten Lipasen darauf bezogen.

| Inkubation in: | Aktivität [%] -BSLA | Aktivität [%]-BSLB |
|----------------------------|---------------------|--------------------|
| Lipasepuffer | 100 | 100 |
| Ionische Flüssigkeit Nr.1 | 44 | 12 |
| Ionische Flüssigkeit Nr. 2 | 0 | 0 |
| Ionische Flüssigkeit Nr. 3 | 1208 | 36 |
| Ionische Flüssigkeit Nr. 4 | 780 | 147 |
| Ionische Flüssigkeit Nr. 5 | 0 | 0 |

Die BSLA und die BSLB wurden mittels immobilisierter Metall-Affinitäts-Chromatographie gereinigt und das Eluat anschließend über eine Sephadex G-25-Säule entsalzt. Die Ausbeuten der Reinigung lagen bei etwa 30 % für die BSLA und bei etwa 15 % für die BSLB. Beide Proteine standen somit in ausreichenden Mengen für weiterführende Charakterisierungs-Studien zur Verfügung. In Tests auf Depolymerase-Aktivität zeigte sich, dass beide Enzyme PLA und in geringerem Ausmaß Bionolle hydrolysieren können. Sowohl die BSLA als auch die BSLB zeigten erhöhte Aktivitäten nach Inkubation in einigen ionischen Flüssigkeiten.

3.2 Evolution der Enantioselektivität der BSLA durch Erstellung einer vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank

Um Aminosäurepositionen zu identifizieren, die an der Ausbildung der Enantioselektivität der BSLA beteiligt sind, sollte das Enzym einem *in vitro* Evolutionsprozess unterworfen werden. Dafür sollte zunächst eine vollständige Sättigungsmutagenese-Bank angelegt werden, in der durch PCR-vermittelte Zufallsmutagenese an jeder einzelnen Position des Enzyms alle 19 anderen möglichen Aminosäuren eingeführt werden sollten. Anschließend waren die Varianten hinsichtlich ihrer Enantioselektivität bei der Umsetzung von zwei verschiedenen Substraten zu überprüfen. Ein besonderes Augenmerk wurde auf das Substrat *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten gerichtet. In ihrer Enantioselektivität bei der Umsetzung dieses Modellsubstrats verbesserte Varianten sollten als Ausgangspunkt für eine weitere Evolution dienen. Da in vorangegangenen Arbeiten zur gerichteten Evolution der BSLA gezeigt worden war, dass sich mit den für die gerichtete Evolution üblichen Mutagenese-Methoden, wie epPCR und DNA-Shuffling, kein hochgradig gegenüber dem Modellsubstrat in der Enantioselektivität verbessertes Enzym entwickeln ließ und zudem die Akkumulation von mehr als einem Aminosäureaustausch die Enzymstabilität stark beeinträchtigte (EGGERT, 2001), schien eine Mutagenese-Methode, in der zunächst nur ein Aminosäureaustausch pro Enzym eingeführt wurde, als vorteilhaft. Ein weiterer wichtiger Grund für das Anlegen einer vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank ist die überschaubare Anzahl der zu screenenden Varianten. In einem Screening sollte es möglich sein, sämtliche „hot spot“-Positionen des Enzyms, d.h. Aminosäurepositionen, die die Enantioselektivität gegenüber einem bestimmten Substrat beeinflussen, inklusive des optimalen Austausches zu identifizieren.

3.2.1 Herstellung einer vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank der BSLA

Zur Konstruktion der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank sollte eine PCR-Methode von BARRETTINO *et al.* (1994) zur Anwendung kommen. In dieser wird in einer ersten PCR die gewünschte Substitution eingeführt, indem ein Mutagenese-Oligonukleotid zusammen mit einem gegenläufigen, universellen Oligonukleotid eingesetzt wird. Da das „Megaprimer“ genannte PCR-Produkt noch nicht das vollständige Zielgen umfasst, muss der Megaprimer zusammen mit zwei universellen Oligonukleotiden in einer zweiten PCR eingesetzt werden (Abb. 13). Essentiell an dieser Methode ist die Verwendung einer Matrizen-DNA in der zweiten PCR, welche keine Bindestelle für das universelle „up“-Oligonukleotid besitzt. Das „up“-Oligonukleotid kann nur mit dem Megaprimer hybridisieren und so kann sichergestellt werden, dass nur die mutagenisierte DNA exponentiell amplifiziert werden kann, nicht aber

die ebenfalls vorhandene Wildtyp-DNA. Die Vorgehensweise nach BARATTINO *et al.* macht eine gelelektrophoretische Trennung von Megaprimer und Matrizen-DNA aus der ersten PCR mit anschließender Gelelution des Megaprimers nötig. Bei der in dieser Arbeit durchzuführenden Anzahl der Mutagenesen (181) musste die Megaprimer-Methode optimiert werden. Hierzu wurde in der zweiten PCR ein „low“-Oligonukleotid ausgewählt, das nicht an die für die erste PCR ausgewählte Matrizen-DNA binden konnte. Somit wurde im Vergleich zu der Methode nach BARETTINO *et al.* die zeitaufwendige Isolierung des Megaprimers vermieden. Das Prinzip der in dieser Arbeit angewendeten Methode zur Durchführung von Sättigungsmutagenesen ist in Abb. 13 dargestellt. Da erfahrungsgemäß für dieses Mutageneseprinzip ein Abstand von ungefähr 15 bp zwischen den universellen Oligonukleotiden und dem Mutageneseprimer nötig ist, mussten für die Sättigungsmutagenesen der für die Aminosäuren 1-5 und 178-181 codierenden Basen andere PCR-Strategien angewendet werden. Hierfür wurden die universellen Oligonukleotide bis an die zu mutagenisierende Position verlängert und es wurden in einer PCR mit dem jeweiligen universellen gegenläufigen Oligonukleotid die entsprechenden Austausche eingeführt (Abb. 13).

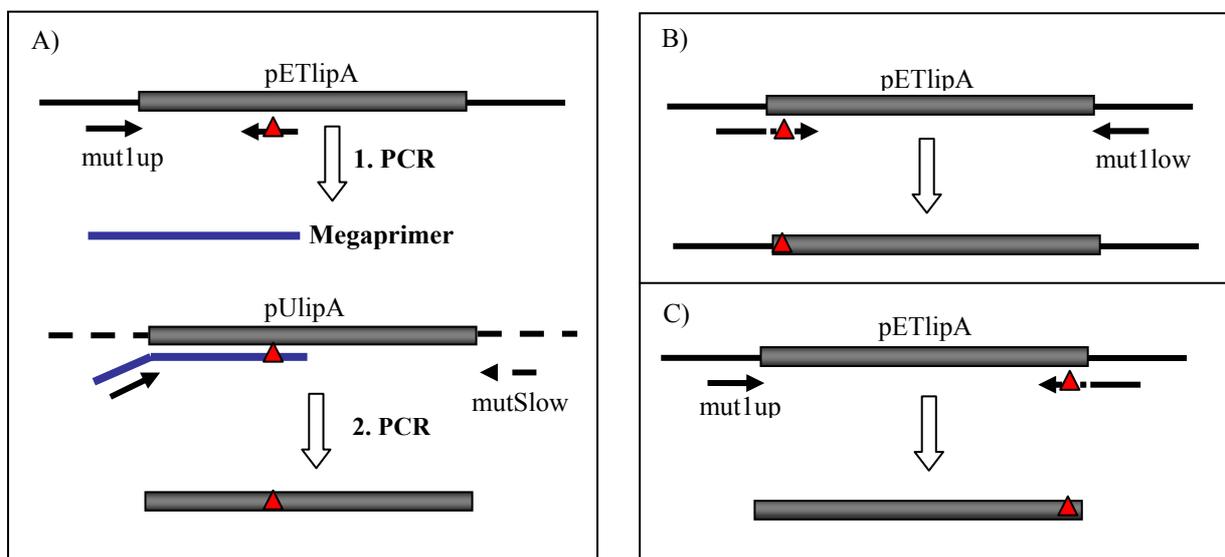


Abb. 13: Strategien für die Erstellung einer vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank der BSLA.

A) Prinzip der Megaprimer-Methode modifiziert nach BARRETTINO *et al.*, 1994. In der ersten PCR wurden das universelle Oligonukleotid mut1up und ein Mutagenese-Oligonukleotid, das an der zu mutagenisierenden Stelle ein Zufallscodon NNS enthielt, zusammen mit der Matrizen-DNA pETlipA eingesetzt. In der zweiten PCR wurde der so entstandene Megaprimer, das Oligonukleotid mut1up, das Oligonukleotid mutSlow und das Konstrukt pUlipA als Matrizen-DNA eingesetzt. Die Amplifikation von Wildtyp-DNA konnte durch den Wechsel des DNA-Tamplats verhindert werden. B) Für die Erstellung der Sättigungsmutagenese-Banken der Aminosäurepositionen 1-5 wurde das Oligonukleotid mut1up bis zu der zu mutagenisierenden Position verlängert und hier das zufällige Codon eingesetzt. Neben diesem Mutagenese-Oligonukleotid wurde in der einzelnen PCR das Oligonukleotid mut1low eingesetzt. C) Für die Erstellung der Sättigungsmutagenese-Banken der Aminosäurepositionen 178-181 wurde das Oligonukleotid mut1low bis an die zu sättigende Position verlängert und mit dem Oligonukleotid mut1up in die PCR eingesetzt.

Durch die gewählten Oligonukleotide wurden die Restriktionsschnittstellen *MlsI* und *Hind III* in die bei der PCR gewonnenen Genprodukte eingeführt. Die so restringierten Genprodukte wurden in den mit den gleichen Schnittstellen geöffneten Expressionsvektor pET22b(+) kloniert (zur Konstruktion siehe Abb. 35 im Anhang). In diesem Vektor ist das *lipA*-Gen mit der *pelB*-Signalsequenz fusioniert und steht unter der Kontrolle von P_{T7}. Wie bei EGGERT (2001) gezeigt, gelangt das korrespondierende BSLA-Protein nach erfolgter Expression in den Kulturüberstand. Von jeder Variantenbank der in den Vektor pET22b(+) ligierten 181 PCR-Produkte wurde ein Teil zur dauerhaften Aufbewahrung bei -20 °C gelagert.

Um den Erfolg der Sättigungsmutagenesen zu überprüfen, wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) mit stichprobenartig ausgesuchten, in den Vektor pET22b(+) ligierten, PCR-Produkten transformiert und die anschließend isolierte Plasmid-DNA wurde sequenziert. Von insgesamt 30 sequenzierten Genvarianten hatten 25 die erwarteten Basenaustausche an der gewünschten Position.

Es wurde eine vollständige Sättigungsmutagenese-Bank der BSLA hergestellt, in der jede der 181 Aminosäuren einzeln gegen alle 19 anderen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht wurde. Die Sättigungsmutagenese-Bank wurde in Form von in den Vektor pET22b(+) klonierten PCR-Produkten bei -20 °C gelagert und steht so dauerhaft für Screening-Anwendungen auf verschiedene Enzymeigenschaften zur Verfügung.

3.2.2 Screening auf BSLA-Varianten mit gesteigerter Enantioselektivität mittels ESI-MS

Das Modellsubstrat *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten wurde in dem Screening mittels ESI-MS durch das Deuterium-markierte *pseudo-meso*-1-Trideuteroacetoxy-4-acetoxy-2-cyclopenten ersetzt. Das BSLA-Wildtypenzym zeigte in der unter Abb. 14 dargestellten Umsetzung unter den gewählten Reaktionsbedingungen einen *ee*-Wert von 48 % für das (1*R*,4*S*)-Enantiomer.

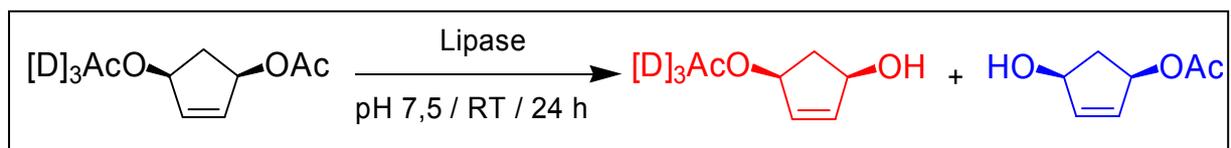


Abb. 14: Reaktion der asymmetrischen Hydrolyse der Verbindung *pseudo-meso*-1-Trideuteroacetoxy-4-acetoxy-2-cyclopenten zu dem (1*R*,4*S*)- und zu dem (1*S*,4*R*)-*pseudo*-Enantiomer. Im ESI-MS-Spektrum können die Produkte durch die Deuterium-Markierung des (1*R*,4*S*)-Enantiomeres unterschieden werden. Dabei führt die Integration der Peaks beider Produkte direkt zum *ee*-Wert. Da sich beim BSLA-Protein kein Isotopeneffekt beim Einsatz des zum Screening Deuterium-Ionen-markierten Substrats feststellen ließ, kann der *ee*-Wert direkt auf das nicht-markierte Modellsubstrat bezogen werden.

Für die Durchmusterung der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) mit den in den Vektor ligierten PCR-Produkten transformiert. Um alle theoretisch möglichen Proteinvarianten durchmustern zu können, wurden je Aminosäureposition zwischen 200 und 400 Proteinvarianten vermessen, was eine mindestens zehnfache Überabtastung des Sequenzraumes bedeutet. So sollte sichergestellt werden, dass jede Variante mindestens einmal getestet wurde. Insgesamt wurden zunächst etwa 55.000 BSLA-Varianten durch A. EIPPER im Arbeitskreis von PROF. DR. REETZ am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR KOHLENFORSCHUNG, Mülheim a.d. Ruhr, per ESI-MS auf ihre Enantioselektivität bei der Hydrolyse des Modellsubstrats geprüft. Dabei konnten insgesamt 6 Aminosäurepositionen der BSLA als „hot-spot“-Positionen für die Enantioselektivität identifiziert werden (Ergebnisse in Abb. 15).

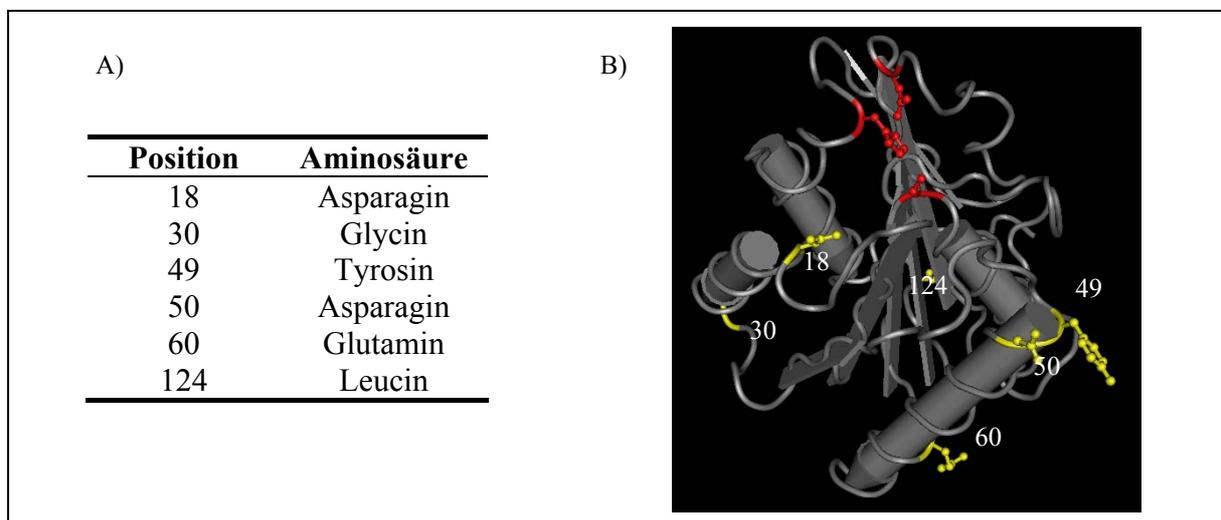


Abb. 15: A) Aminosäurepositionen, die in der Desymmetrisierung von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten als „hot-spot-Positionen“ für eine veränderte Enantioselektivität identifiziert wurden und B) Lage der in der BSLA identifizierten „hot-spot“-Positionen. Die „hot-spot“-Positionen sowie die Aminosäure-Seitenketten der katalytischen Triade sind durch „Ball and Stick“ Darstellung hervorgehoben. Dabei sind die Aminosäure-Seitenketten der katalytischen Triade in rot gezeigt und die der „hot-spot“-Positionen in gelb.

Aufgrund von Problemen bei der Lagerhaltung der bereits gescreenten Varianten in Gefrierkulturen wurden die in Abb. 15 angegebenen Variantenbanken neu erstellt und durch H. KRUMM des Arbeitskreis PROF. DR. REETZ in Mülheim ein weiteres Mal vermessen. Dabei ging der eigentlichen Durchmusterung auf gesteigerte Enantioselektivität ein sog. Vorscreening auf Tributyrin-Agar-Platten voraus, in dem die Varianten auf ihre generelle enzymatische Aktivität überprüft werden konnten. Varianten, die auf den Platten keine Hofbildung zeigten, wurden als „inaktiv“ aussortiert.

In Abb. 16 ist beispielhaft ein Teil der Screening-Ergebnisse aus der Variantenbank mit Aminosäureaustauschen an der Position 18 gezeigt. Diese Aminosäureposition erwies sich als besonders interessant.

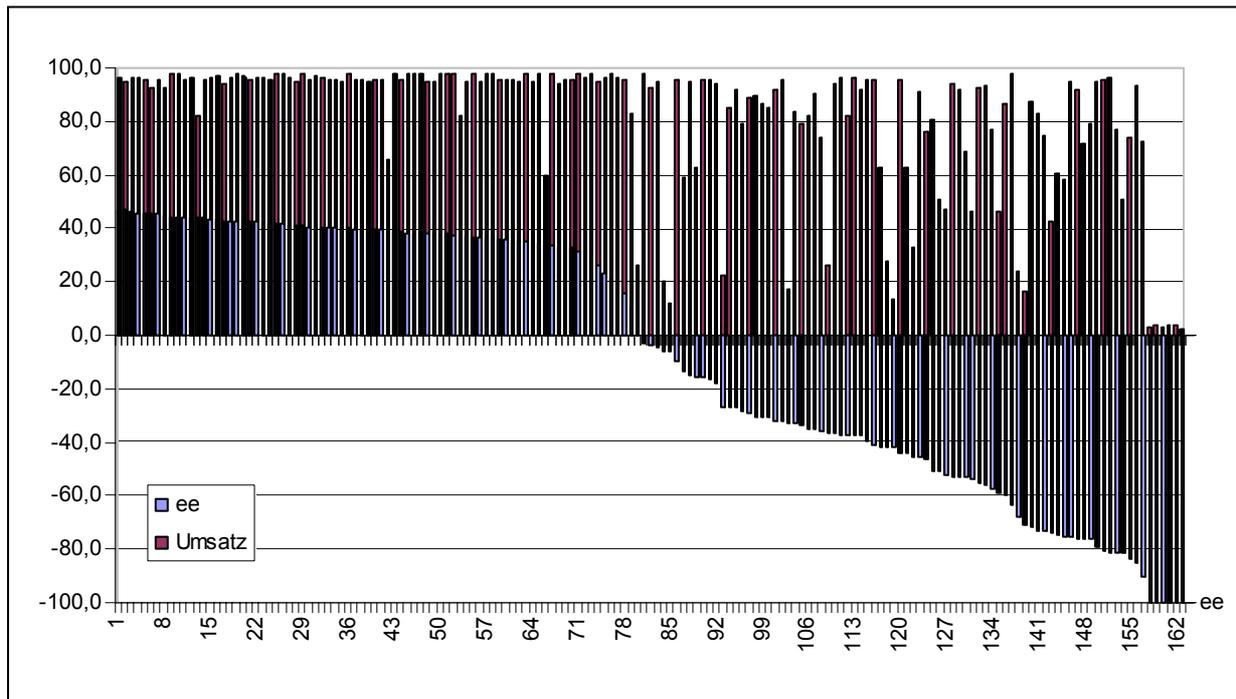


Abb. 16: Screeningergebnisse von aktiven BSLA-Varianten mit einem Aminosäureaustausch an der Position 18. Für jede Variante ist sowohl der Umsatz als auch der *ee*-Wert angegeben. Die einzelnen Werte wurden aus ESI-Massenspektrogrammen abgeleitet. Ergebnisse von Varianten, die keine Aktivität gegenüber dem Substrat aufwiesen, sind nicht gezeigt.

Ein Großteil der Varianten zeigte eine Umkehrung der Enantioselectivität.

Nach dem Screening der in Abb. 15 dargestellten Variantenbanken wurde von einem Teil der Varianten mit umgekehrter Enantioselectivität die DNA-Sequenz ermittelt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Proteinvarianten mit gleichen oder sehr ähnlichen *ee*-Werten gleiche oder ähnliche genetischen Eigenschaften besitzen und es wurde von Varianten mit ähnlichen *ee*-Werten jeweils nur eine DNA-Sequenz ermittelt. Die Sequenzierungsergebnisse der entsprechenden Varianten sind in Tab. 15 gezeigt.

Die der Berechnung der *ee*-Werte zugrundeliegende Formel ist im Anhang unter 8.1.3 dargestellt.

Insgesamt wurden sechs Varianten gefunden, bei denen ein Aminosäureaustausch an der Position 18 eine Umkehrung der Enantioselectivität gegenüber dem Modells substrat bewirkte. Dabei zeigten die Varianten N18Q und N18S umgekehrte Enantioselectivitäten von über 80 %. Fast alle Varianten hatten einen im Vergleich zum Wildtyp verringerten Umsatz gegenüber dem Modells substrat. Eine weitere Variante mit umgekehrter Enantioselectivität wies einen Aminosäureaustausch an der Position 49 auf. Diese zeigte jedoch einen ausgesprochen geringen Umsatz von nur 5 %.

Tab. 15: BSLA-Varianten, die bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten eine veränderte Enantioselektivität aufweisen. Angegeben sind die experimentell bestimmten Enantiomeren-Überschüsse (*ee*-Wert), die von der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresubstitutionen und die Basenaustausche des entsprechen Triplets. Die ausgetauschten Basen sind rot hervorgehoben.

| Variante | Aminosäure-austausch | Basen-austausch | Umsatz* [%] | <i>ee</i> -Wert (1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>) [%] |
|----------|----------------------|------------------|-------------|---|
| Wildtyp | - | | 100 | 48 |
| N18I | N18I | aat → atc | 90 | 14 rev. |
| N18A | N18A | aat → gcg | 100 | 21 rev. |
| N18L | N18L | aat → ctg | 75 | 65 rev. |
| N18C | N18C | aat → tgc | 85 | 72 rev. |
| N18Q | N18Q | aat → cag | 75 | 82 rev. |
| N18S | N18S | aat → agc | 50 | 83 rev. |
| Y49I | Y49I | tat → atc | 5 | 15 rev. |

*Zur Bestimmung des Umsatzes wurden mehrere Werte gemittelt. Der Umsatz zeigte sich bei unterschiedlichen Messungen stark variabel (Abweichungen bis zu 20 %), die Relationen der Werte untereinander blieben aber gleich.

3.2.3 Charakterisierung der BSLA-Proteinvarianten mit umgekehrter Enantioselektivität

Bei der gerichteten Evolution von Enzymen können neben den zu optimierenden Eigenschaften auch andere, unerwünschte Proteineigenschaften hinzukommen. Bei vorangehenden Arbeiten bezüglich der gerichteten Evolution einer enantioselektiven BSLA konnte von EGGERT (2001) gezeigt werden, dass in ihrer Enantioselektivität verbesserte BSLA-Varianten im Vergleich zum Wildtyp geringere lipolytische Aktivitäten und geringere Thermostabilitäten aufwiesen. Von diesen Einschränkungen waren Varianten mit mehr als einem Aminosäureaustausch verstärkt betroffen. Um zu testen, ob auch die in dieser Arbeit identifizierten BSLA-Varianten veränderte Proteineigenschaften aufwiesen, sollten die in Tab. 15 aufgelisteten BSLA-Varianten auf ihren Umsatz gegenüber *p*-Nitrophenyl-Palmitat und zwei verschiedenen racemischen Substraten, auf ihre pH-Stabilität und auf ihre Thermostabilität getestet werden.

In drei unabhängigen Versuchsreihen wurden das *lipA*-Gen und die verschiedenen Variantengene in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Zur Quantifizierung der Proteinmengen in den Kulturüberständen wurden gleiche Volumina mit SDS-PAGE-Analyse überprüft. Alle Enzymvarianten, bis auf Y49I, waren in vergleichbarer Menge im Kulturüberstand nachzuweisen (ohne Abbildung), so dass die lipolytischen Aktivitäten in den Kulturüberständen direkt miteinander verglichen werden konnten. Dabei wurde die Variante Y49I ausgenommen, da dieses Protein nicht mit der SDS-PAGE im Kulturüberstand nachzuweisen war.

Gleiche Volumina der gewonnenen Kulturüberstände wurden in ihrer Aktivität gegenüber *p*-Nitrophenyl-Palmitat (Abb. 17) und den beiden racemischen Substraten (Tab. 16) getestet. Da die Protein-Expressionsmengen je nach Kultur variierten, die Relationen der Aktivitäten untereinander aber gleich blieben, wurde die Aktivität der Wildtyp-BSLA jeweils als 100 % definiert. Die Aktivitäten der Varianten wurden anschließend darauf bezogen.

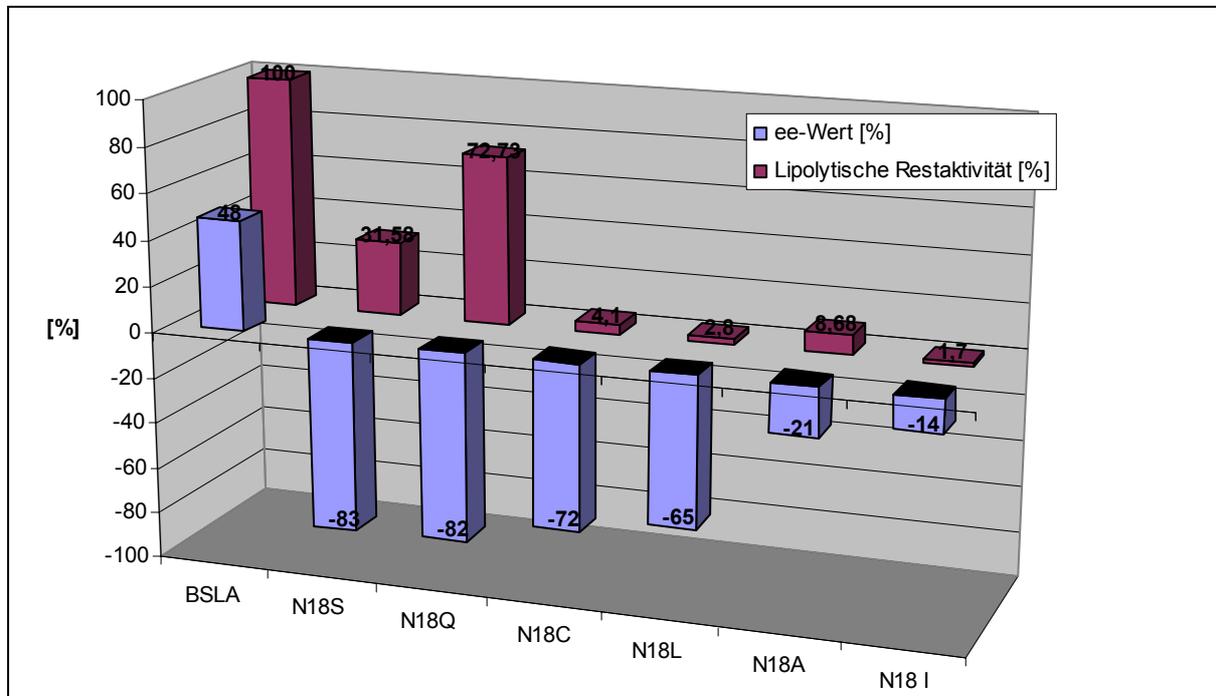


Abb. 17: Lipolytische Aktivitäten der BSLA und der Enzymvarianten mit veränderter Enantioselektivität. Die Enantioselektivität der einzelnen Varianten wurde für das Substrat *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten aus ESI-Massenspektrogrammen abgeleitet. Die lipolytische Aktivität der enzymhaltigen Kulturüberstände wurde gegenüber *p*-Nitrophenyl-Palmitat in drei unabhängigen Messreihen ermittelt, die Standardabweichung liegt bei unter 5 % für jeden einzelnen Wert. Die Aktivität der BSLA wurde als 100 % definiert und die Aktivität der Enzymvarianten wurde darauf bezogen.

Gegenüber *p*-Nitrophenyl-Palmitat zeigten sämtliche Enzymvarianten mit veränderter Enantioselektivität nach 15 min Inkubation signifikant geringere lipolytische Aktivität als der Wildtyp. Dabei sank die Aktivität der Varianten N18C, N18A, N18L und N18I unter 5%. Größere lipolytische Aktivitäten zeigten die Varianten N18Q und N18S (72,7 % und 31,6 %). Der BSLA-Wildtyp setzte in 24 h enantioselektiv nur das (*R*)-Enantiomer der Substrate *rac*-1-(2-Naphthyl)ethylacetat (NEA) und *rac*-1-Phenylethylacetat (PEA) (Strukturformeln sind im Anhang in Tab. 27 gezeigt) um. Die Varianten zeigten ebenfalls nur Aktivitäten gegenüber den (*R*)-Enantiomeren der Substrate, wobei die Umsätze zum Teil deutlich vermindert waren. Dies traf vor allem auf die Varianten N18S und N18L zu. In beiden Testreihen ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Enantioselektivität der Varianten und der Verringerung der Aktivität oder des Umsatzes feststellen.

Tab. 16: Umsätze von zwei racemischen Substraten durch die BSLA und BSLA-Varianten. Der Umsatz der einzelnen Varianten wurde nach 24 h Inkubation von Kulturüberständen aus drei unabhängigen Expressionen mit den jeweiligen Substraten mittels GC-Analyse bestimmt. Die Standardabweichungen liegen für jeden einzelnen Wert unter 5 %.

| Variante | Umsatz [%] (R)-NEA | Umsatz [%] (S)-NEA | Umsatz [%] (R)-PEA | Umsatz [%] (S)-PEA |
|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| BSLA | 100 | 0 | 100 | 0 |
| N18S | 2 | 0 | 2,8 | 0 |
| N18Q | 24,7 | 0 | 34,6 | 0 |
| N18C | 46,8 | 0 | 25,5 | 0 |
| N18L | 10 | 0 | 10,9 | 0 |
| N18A | 67,7 | 0 | 42,3 | 0 |

Neben Aktivität oder Umsatz der Enzymvarianten wurde als zweite Eigenschaft die Temperaturstabilität der BSLA und der Enzymvarianten ermittelt (Abb. 18). Der BSLA-Wildtyp zeigte sich über die Versuchsdauer von zwei Stunden als thermotolerant gegenüber der gewählten Inkubationstemperatur von 45°C. Die lipolytische Aktivität der BSLA veränderte sich nicht. Die Enzymvarianten (mit veränderter Enantioselektivität) zeigten bereits nach einer halben Stunde Inkubation bei 45 °C deutliche Verluste ihrer lipolytischen Aktivität. Nach zwei Stunden sank die lipolytische Aktivität fast aller Varianten auf ungefähr 20 %, die Variante N18I hatte sämtliche Aktivität verloren.

Als dritte Eigenschaft sollte die pH-Wert-Stabilität der BSLA und der einzelnen Enzymvarianten ermittelt werden. 1993 wurde von LESUISSE *et al.* die bemerkenswerte Stabilität der BSLA bei alkalischen pH-Werten gezeigt. Bei Experimenten zeigte das Enzym maximale Stabilität bei pH-Werten zwischen 11 und 12. Um zu prüfen, ob die Enzymvarianten mit veränderter Enantioselektivität ihre maximale Stabilität ebenfalls im alkalischen Bereich zeigen, wurde die Enzymstabilität der BSLA und der Varianten bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Dazu wurden die proteinhaltigen Kulturüberstände für 48 Stunden in Puffern verschiedener pH-Werte von pH 2 bis pH 12 inkubiert. Nach der Inkubation wurden die lipolytischen Aktivitäten der einzelnen Varianten bestimmt. Keine der Varianten zeigte hinsichtlich ihrer Stabilität in unterschiedlichen pH-Werten Unterschiede zur Wildtyp-BSLA. Alle Varianten wiesen wie erwartet maximale Stabilität im stark alkalischen Bereich (pH 11-12) auf (ohne Abbildung).

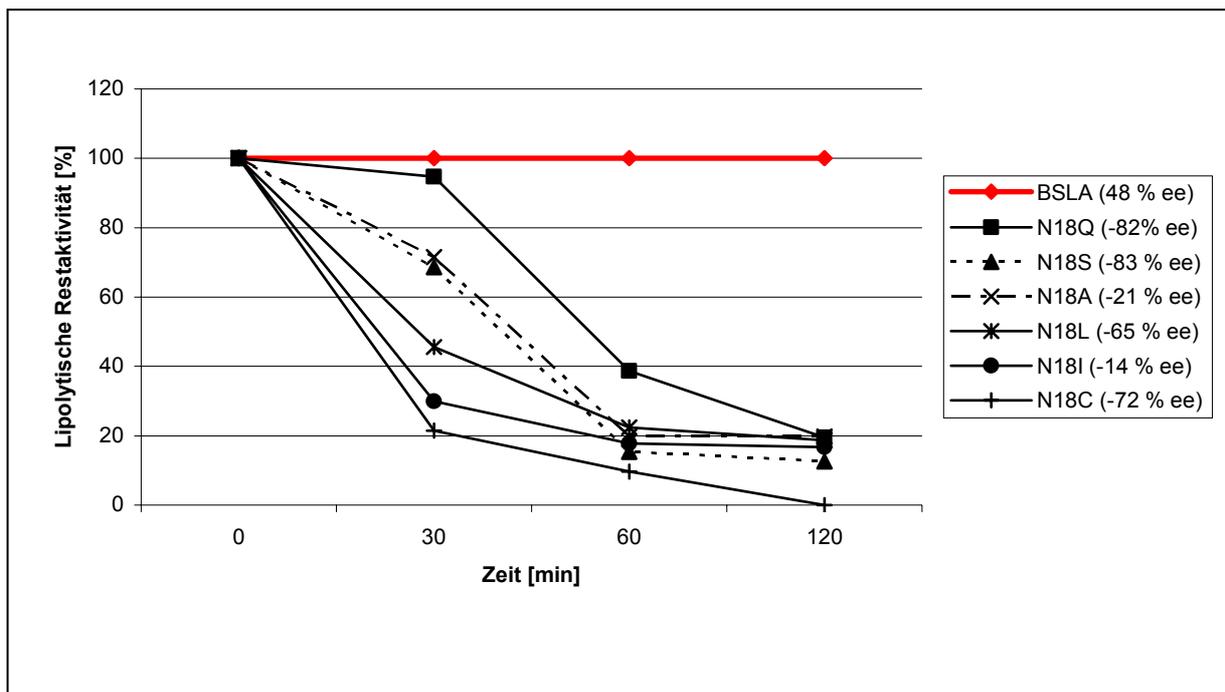


Abb. 18: Thermostabilitäten der BSLA und der Enzymvarianten mit veränderter Enantioselektivität. Die dargestellten lipolytischen Restaktivitäten wurden in drei unabhängigen Messreihen ermittelt. Dafür wurden die enzymhaltigen Kulturüberstände bei 45 °C inkubiert und die lipolytische Restaktivität gegenüber *p*-Nitrophenyl-Palmitat wurde nach unterschiedlichen Zeitabständen bestimmt. Die durchschnittliche Standardabweichung liegt unter 10 %. Die Aktivität der einzelnen Enzymvarianten bei dem Zeitpunkt Null (ohne Inkubation bei 45 °C) wurde jeweils als 100 % definiert.

In einem Screening einer vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank der BSLA auf veränderte Enantioselektivität bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten konnten mehrere Enzymvarianten identifiziert werden, die einen Aminosäureaustausch an der Position 18 aufwiesen und die eine Umkehrung der Enantioselektivität im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Es konnte somit eine wichtige Determinante der Enantioselektivität des Enzyms hinsichtlich des Modellsubstrats identifiziert werden. Diese Enzymvarianten wiesen im Vergleich zum Wildtyp geringere lipolytische Aktivitäten und geringere Thermostabilitäten auf.

3.2.4 Alle BSLA-Varianten mit einem Aminosäureaustausch an der Position 18 zeigen umgekehrte Enantioselektivität gegenüber *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten

Die Aminosäureposition 18 hatte sich, wie schon von VAN POUDEROYEN *et al.* (2001) prognostiziert, als hochinteressant herausgestellt. Um alle möglichen Varianten mit einem Aminosäureaustausch an dieser Position auf ihre Enantioselektivität zu überprüfen, wurden diese durch ortsspezifische Mutagenese hergestellt. Bei der Auswahl der Mutagenese-Oligonukleotide wurden an den auszutauschenden Positionen für *E. coli* optimierte Codons gewählt (vgl. Tab. 11). Für die Klonierung der PCR-Produkte wurde wie unter 3.1.1

beschrieben der Vektor pET19b ausgewählt (zur Konstruktion siehe Abb. 34 im Anhang). Das sollte i) die Reinigung einzelner Varianten über ein N-terminal fusioniertes Histidin-Decamer ermöglichen ii) die Möglichkeit bieten, bereits exprimierte Enzyme in den nicht aufgeschlossenen Zellen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu lagern, ohne dass die einzelnen Enzyme an Aktivität verlieren. Die unter 3.2.2 verwendeten Kulturüberstände hatten sich als nicht lagerbar erwiesen, da sich die lipolytische Aktivität der einzelnen Varianten beständig verringerte. Mit den in den Vektor pET19b ligierten PCR-Produkten wurde *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Anschließend wurden sämtliche Klone auf eine Tributyrin-Agar-Platte überimpft, um die Klone auf das Vorhandensein von lipolytischer Aktivität zu überprüfen (Abb. 19). Trotz intrazellulärer Expression zeigten alle Klone lipolytische Aktivität, dabei deuteten sich durch die Größe der Klärhöfe um die einzelnen Kolonien Unterschiede entweder in der lipolytischen Aktivität oder in der Menge des exprimierten Proteins an.



Abb. 19: Tributyrin-Agar-Platte mit *E. coli* BL21(DE3)-Klonen. Diese exprimieren verschiedene BSLA-Varianten. Neben den entsprechenden Kolonien sind die an der Position 18 als Austausch eingefügten Aminosäuren angegeben. (-) steht für den Stamm *E. coli* BL21(DE3)pET19b (Leerkontrolle).

Nach erfolgter Expression aller 20 Variantengene für 3 Stunden wurden die Lipase-haltigen Bakterienzellen geerntet und entweder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder es wurden direkt die Zellrohextrakte gewonnen. Wurden die Zellrohextrakte aus bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischengelagerten Zellen gewonnen, blieb die enzymatische Aktivität erhalten (Ergebnisse nicht dargestellt). Zur Quantifizierung der Proteinmengen in den Zellrohextrakten wurden gleiche Volumina mit SDS-PAGE-Analyse überprüft. Trotz der Auswahl der für *E. coli* optimierten Codons für die in den ortsspezifischen Mutagenesen genutzten Oligonukleotide waren die Enzymvarianten in unterschiedlicher Menge nachzuweisen. Die lipolytischen Aktivitäten der Enzymvarianten in den Zellrohextrakten konnten somit nicht direkt miteinander verglichen werden. Mit den Zellrohextrakten konnte aber die Enantioselektivität der Enzymvarianten gegenüber verschiedenen Substraten ermittelt werden. Als Substrate wurden neben *meso*-1,4-Diacetoxy-

2-cyclopenten auch die Ester primärer Alkohole Isopropylidenglyceryl-(IPG)-Butyrat und Citronellyl-Butyrat ausgewählt. Des Weiteren wurden die Ester sekundärer Alkohole *rac*-1-Phenylethylacetat (PEA) und *rac*-1-(2-Naphthyl)ethylacetat (NEA) sowie die Substrate *cis*-1,2-Cyclohexandiol-bis-acetat und *rac* -*trans*-1,2-Cyclohexandiol-bis-acetat getestet.

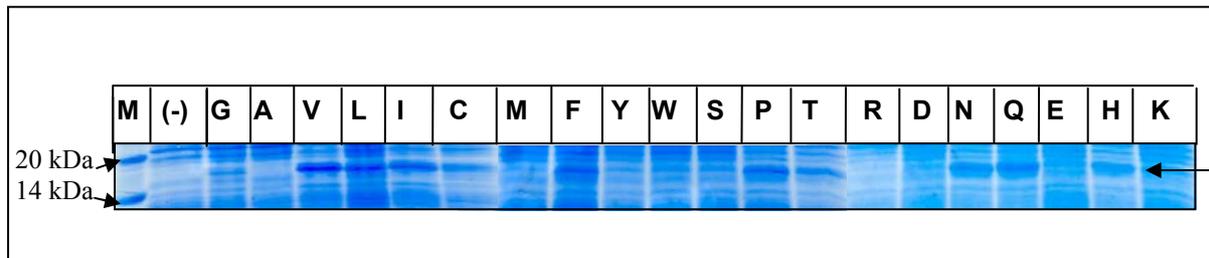


Abb. 20: SDS-PAGE-Analysen der Zellrohextrakte von *E. coli* BL21(DE3) mit den jeweiligen Plasmiden pET19lipA-N18X (X = alle Aminosäureaustausche) nach 3 Stunden Expression. Es sind die an der Position 18 der BSLA ausgetauschten Aminosäuren angegeben. M: Marker, (-): Negativkontrolle *E. coli* BL21(DE3) mit dem Leervektor pET19b. Es wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Proteinbanden der BSLA-Varianten sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Alle diese Substrate sind von kommerziellem Interesse. Die Strukturformeln der einzelnen Substrate sind in Tab. 27 im Anhang dargestellt. Zur Bestimmung der Enantioselektivitäten wurden die enzymhaltigen Zellrohextrakte mit den Substraten inkubiert und die Testansätze wurden mittels chiraler GC analysiert.

Bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten zeigten fast alle Enzymvarianten im Vergleich zum Wildtyp eine Umkehrung der Enantioselektivität, die von 1,9 % bis zu 88 % gegenüber dem (1*R*,4*S*)-Enantiomer (Abb. 21) reichte. Die mit den Zellrohextrakten ermittelten *ee*-Werte differierten leicht von den mit Kulturüberständen ermittelten Werten (siehe 3.2.2).

Die Ester primärer Alkohole Citronellyl-Butyrat und IPG-Butyrat wurden vom BSLA-Wildtyp nur mit geringer Enantioselektivität hydrolysiert.

Der *E*-Wert (Formel zur Berechnung des *E*-Wertes siehe Anhang) der BSLA für das (*R*)-Enantiomer von Citronellyl-Butyrat lag bei nur 1,2. Gegenüber diesem Substrat zeigten sich bei den einzelnen Varianten nur geringfügige Veränderungen der *E*-Werte, die Enantiopräferenzen änderten sich nicht.

Gegenüber IPG-Butyrat zeigten sich Unterschiede (Tab. 17), da die Enzymvarianten N18A, N18C, N18I, N18L, N18W, N18E und N18K ihre Enantiopräferenzen im Vergleich zum Wildtyp vom (*R*)- auf das (*S*)-Enantiomer umkehrten.

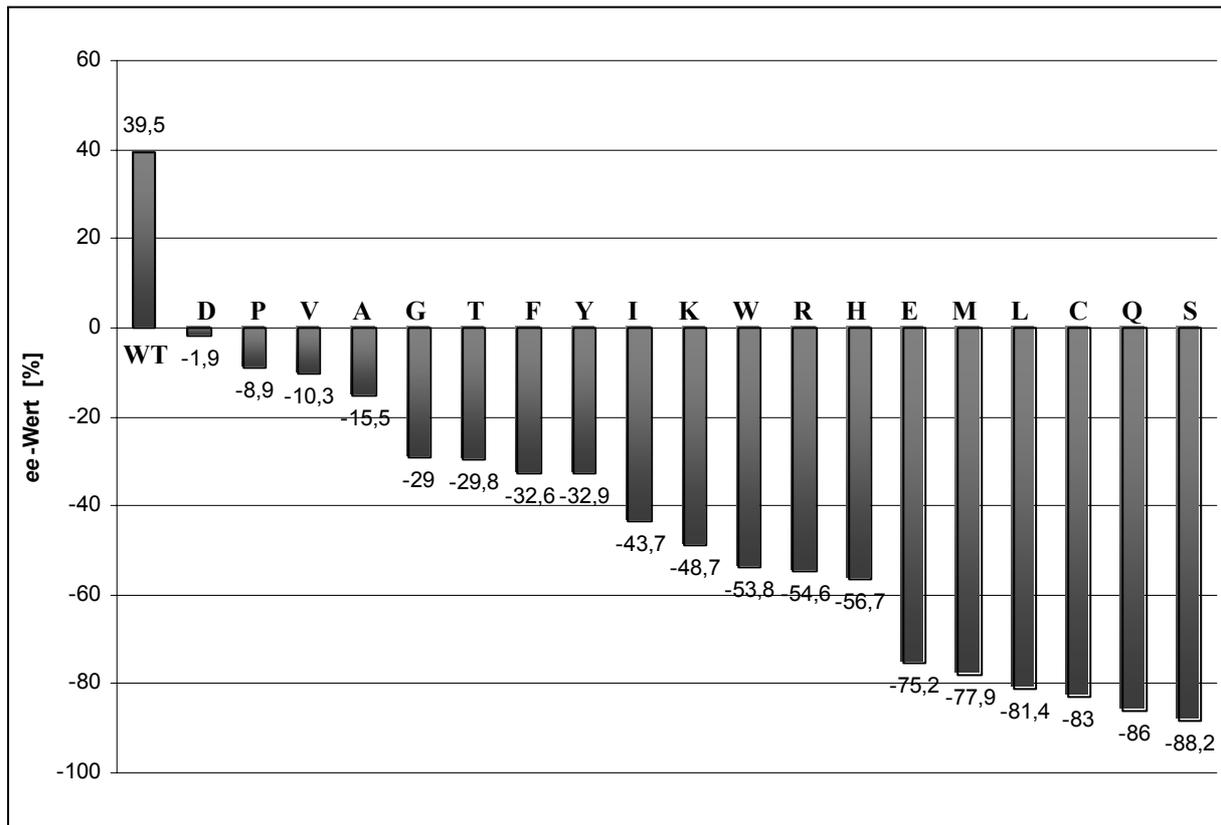


Abb. 21: Enantioselektivität der BSLA und deren Varianten mit Aminosäureaustauschen an der Position 18 bei dem Umsatz von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten. Die gegen Asn an der Aminosäureposition 18 ausgetauschten Aminosäuren sind angegeben. WT: BSLA-Wildtyp. Die Werte stammen aus zwei unabhängigen Messreihen. Die durchschnittlichen Standardabweichungen liegen unter 2 %.

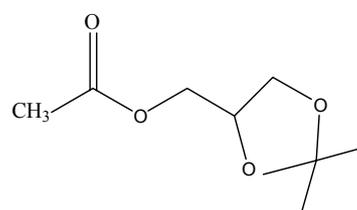
Die Variante N18Q zeigte eine verbesserte Enantiopräferenz für das (*R*)-Enantiomer. Insgesamt waren die Enantiopräferenzen für dieses Substrat jedoch als niedrig zu bezeichnen.

Der BSLA-Wildtyp hydrolysierte unter den angelegten Versuchsbedingungen nur die (*R*)-Enantiomere der Substrate PEA und NEA (EIPPER, 2002). Von dem Substrat *rac*-*trans*-1,2-Cyclohexandiol-bis-acetat wurde nur das (*R,R*)-Enantiomer umgesetzt, während das Substrat *cis*-1,2-Cyclohexandiol-bis-acetat nicht umgesetzt wurde. Keine der Enzymvarianten mit einem Aminosäureaustausch an der Position 18 zeigte eine Veränderung der Enantiopräferenz im Vergleich zu dem BSLA-Wildtyp.

| Variante | <i>E</i> -Wert |
|----------|------------------------------|
| BSLA | 1,3 (<i>R</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18G | 1,2 (<i>R</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18A | 1,9 (<i>S</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18V | 1,4 (<i>R</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18L | 1,4 (<i>S</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18I | 1,4 (<i>S</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18C | 1,1 (<i>S</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18M | 1,1 (<i>R</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18F | 1,1 (<i>R</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18Y | 1,3 (<i>R</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18W | 1,9 (<i>S</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18S | (--) |
| 19-N18P | 1,5 (<i>R</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18T | 1,2 (<i>R</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18R | (--) |
| 19-N18Q | 2,8 (<i>R</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18D | 1,8 (<i>R</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18E | 1,5 (<i>S</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18H | 1,1 (<i>R</i>)-IPG-Butyrat |
| 19-N18K | 1,6 (<i>S</i>)-IPG-Butyrat |

Tab. 17: Stereoselektivität der einzelnen BSLA-Varianten mit einem Aminosäureaustausch an der Position 18 gegenüber IPG-Butyrat. Bei den ermittelten Werten handelt es sich um Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Messungen mit Standardabweichungen unter 5 % für die einzelnen Werte. Diese wurden nach der Umsetzung des Substrats mit chiraler GC ermittelt. (–): Die Variante zeigte während der Umsetzung keine lipolytische Aktivität für IPG-Butyrat.

Strukturformel IPG-Butyrat:



Die Bestimmung der Enantioselektivitäten aller durch ortsspezifische Mutagenese hergestellten BSLA-Enzymvarianten mit einem Aminosäureaustausch an der Position 18 ergab eine Umkehrung der Enantioselektivität im Vergleich zum Wildtyp bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten. Gegenüber weiteren getesteten Substraten zeigten die hergestellten Varianten keine oder lediglich geringe Veränderungen ihrer Enantioselektivität.

3.2.5 Screening auf BSLA-Varianten mit veränderter Enantioselektivität gegenüber 1-(2-Naphthyl)ethylacetat (NEA)

Die Wildtyp-BSLA hydrolysiert unter den bisher getesteten Versuchsbedingungen ausschließlich das (*R*)-Enantiomer von NEA. Wie unter 3.2.5 erwähnt, zeigen Enzymvarianten, bei denen die Aminosäure 18 ausgetauscht wurde, keine Veränderung ihrer Enantiopräferenz gegenüber diesem Substrat. In einem weiteren Ansatz sollte nun in einem Screening der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank (3.2.1) herausgefunden werden, ob ein Austausch an bestimmten Aminosäurepositionen der BSLA die Enantioselektivität von > 99.9 % *ee* zugunsten des (*R*)-Enantiomeres verändern kann. Da die BSLA ausschließlich das (*R*)-Enantiomer hydrolysiert, erfolgte das Screening mit einem einfachen und schnellen Agar-Plattentest. Dazu wurde eine Methode entwickelt, enantiomerenreines NEA in blau angefärbten LB-Agarplatten zu emulgieren. Die in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)

auf dem Vektor pET22lipA eingebrachte BSLA zeigte ausschließlich auf den (*R*)-Enantiomer-haltigen Platten lipolytische Aktivität. Diese äußerte sich durch die Bildung eines Klärhofes um die Bakterienkolonie. Die unter 3.2.1 erstellten, in den Vektor pET22b(+) ligierten PCR-Produkte wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und die Transformanden wurden auf den (*S*)-NEA-Substratplatten ausgespatelt. Um eine dreifache Überabtastung des Sequenzraumes zu erreichen, wurden insgesamt etwa 11.000 Klone auf den Platten getestet. Daneben wurden zur Kontrolle mehrere (*R*)-Enantiomer-haltige Platten mit den Transformationsansätzen bestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

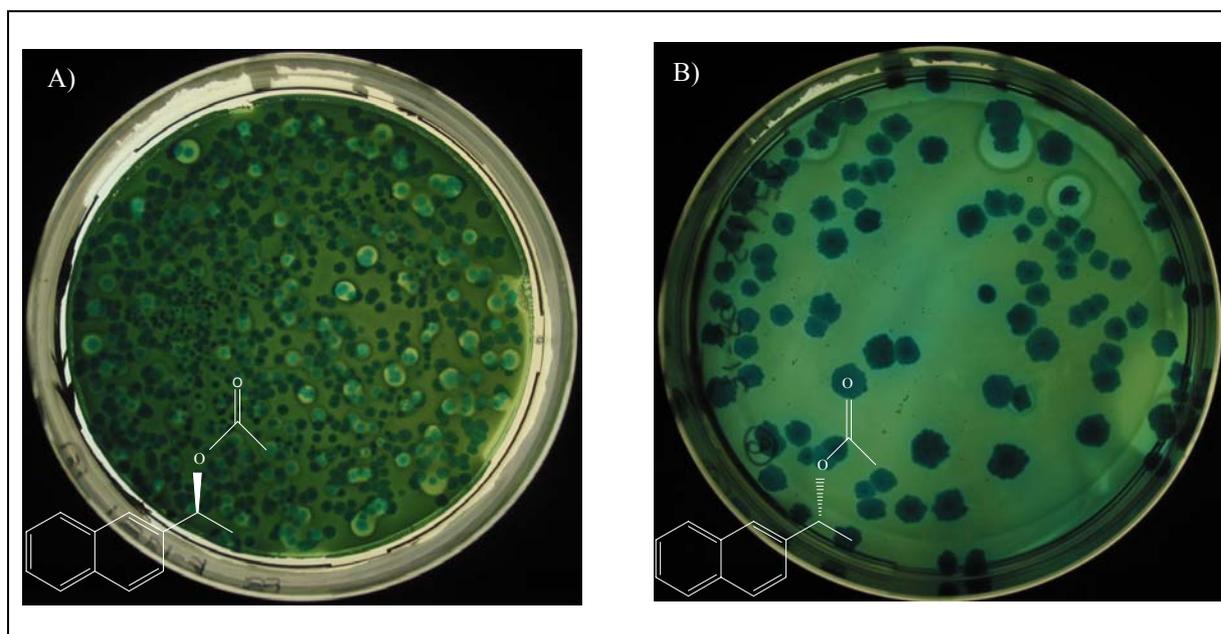


Abb. 22: Beispiele für A) eine (*R*)-NEA-haltige und B) für eine (*S*)-NEA-haltige Agar-Platte. Auf beiden Platten wurden *E. coli* BL21(DE3)-Klone ausgestrichen, die mit den unter 3.2.1 hergestellten, in den Vektor pET22(+) ligierten PCR-Produkten der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank transformiert worden waren. Lipolytische Aktivität gegenüber dem jeweiligen Enantiomer von NEA zeigt sich durch Klärhofbildung. Die chemischen Strukturformeln der NEA-Enantiomere sind gezeigt.

Auf den (*R*)-NEA-Agar-Platten zeigten 2/3 der Klone lipolytische Aktivität. Die Klärhöfe bildeten sich zum Teil schon nach der Inkubation bei 37 °C über Nacht. Im Gegensatz dazu zeigte auf den (*S*)-NEA-Agar-Platten zunächst keine der Varianten einen Klärhof. Erst nach 4 Tagen konnten bei 5 Klonen Klärhöfe ausgemacht werden (Abb. 22). Die Sequenz der Plasmid-DNA dieser Varianten wurde bestimmt. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA der Klone 1 und 5 konnte nicht ausgewertet werden, da in beiden Fällen „Mischsequenzen“ vorlagen. Die Aminosäure- und Basenaustausche der NEA-Varianten 2, 3 und 4 sind in Tab. 18 angegeben. Um die genauen Enantioselektivitäten der Varianten bestimmen zu können, wurde die jeweils gewonnene Plasmid-DNA wieder in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

Anschließend erfolgte die Expression der Gene. Als Kontrolle dienten der den BSLA-Wildtyp exprimierende Stamm und der Stamm mit dem Leerplasmid pET22b(+). Zur Abschätzung der Proteinmengen in den Kulturüberständen wurden gleiche Volumina dieser mit SDS-PAGE-Analyse überprüft. Dabei konnte in den Kulturüberständen der BSLA-Varianten das erwartete Protein nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten die Kulturüberstände keinerlei lipolytische Aktivität. Da durch die Fusion der Variantengene mit einer Signalsequenz auch eine Lokalisation des korrespondierenden Proteins im Periplasma der *E. coli*-Zellen denkbar war, wurden die Zellen nach der Expression in die periplasmatische Fraktion und die cytoplasmatische Fraktion aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Dabei konnten die Proteinvarianten NEA2 und NEA4 nicht identifiziert werden. Die Variante NEA3 zeigte sich als deutliche Proteinbande auf der erwarteten Höhe in der Cytoplasmafraktion (Abb. 23).

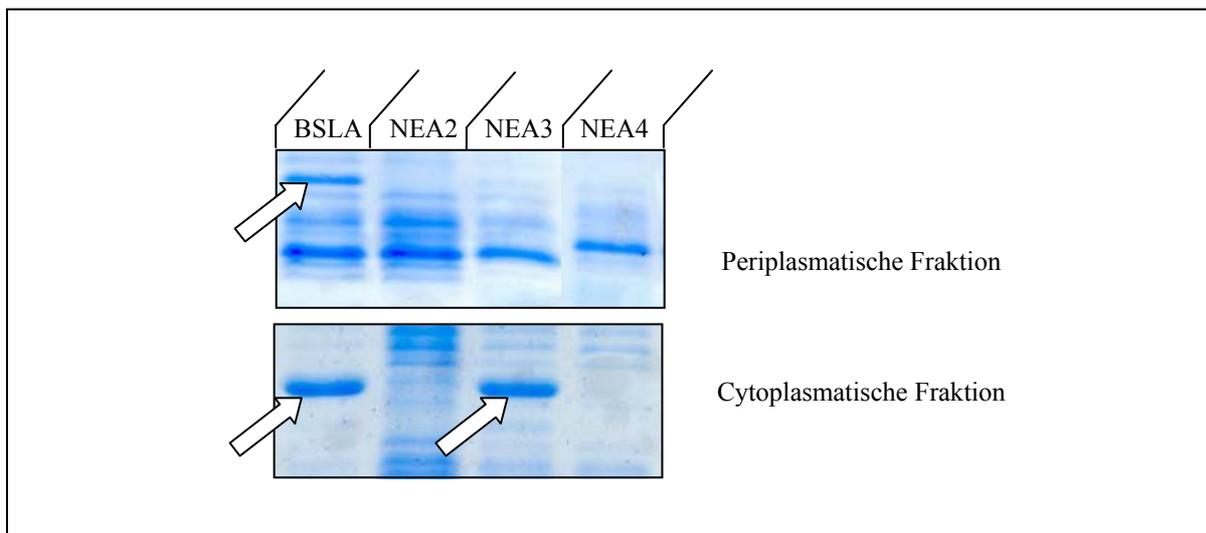


Abb. 23: SDS-PAGE-Analysen nach Fraktionierung von 3 h exprimierten *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen mit den Plasmiden pET22lipA, pET22lipA-NEA2, -NEA3 und-NEA4 in periplasmatische- und cytoplasmatische Fraktion. Es wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Proteinbanden der Lipase-Varianten wurden durch Pfeile gekennzeichnet.

Für die Bestimmung der Selektivitäten wurden die mit den jeweiligen Plasmiden transformierten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen nach der Expression aufgeschlossen und 200 µl der enzymhaltigen Zellrohextrakte wurden mit dem jeweiligen Substrat für 48 h bei Raumtemperatur inkubiert. Neben der Enantioselektivität gegenüber NEA wurden auch die Enantioselektivitäten gegenüber zwei weiteren Estern sekundärer Alkohole, *rac*-1-Phenylethylacetat (PEA) und *rac*-Menthylacetat (MA) ermittelt (Strukturformeln in Tab. 27 im Anhang). Der BSLA-Wildtyp setzte alle drei Substrate hochselektiv um. Von den Substraten NEA und PEA wurde unter den Testbedingungen das (*R*)-Enantiomer vollständig hydrolysiert, der Umsatz des (*R*)-Enantiomers von MA lag nur bei etwa 10 % (Tab. 18).

Tab. 18: Aminosäure-, Basenaustausche und Stereoselektivität der BSLA und dreier Varianten gegenüber verschiedenen Substraten. Die Stereoselektivität wurde in drei unabhängigen Messreihen durch chirale GC-Analyse bestimmt. Die Standardabweichungen liegen für jeden einzelnen Wert unter 3 %. Ausgetauschte Basen sind in rot hervorgehoben.

| Variante | Aminosäure-austausch | Basen-austausch | Enantioselektivität gegenüber | | |
|----------|----------------------|-----------------|---------------------------------------|--|--------------------------------------|
| | | | NEA | PEA | MA |
| BSLA | - | - | $E > 100$ (<i>R</i>) $ee > 99,9$ | $E > 100$ (<i>R</i>) $ee > 99,9$ | $E = 22$ (<i>R</i>) $ee > 99,9$ |
| NEA2 | H76L | CAC → CTG | $E = 7,5$ (<i>R</i>) $ee = 77,6$ | $E = 3,8$ (<i>R</i>) $ee = 45,22$ | - |
| NEA3 | H76A | CAC → GCC | $E = 2,2$ (<i>S</i>) $ee = 44,2$ | $E = 16,0$ (<i>S</i>) $ee = 73$ | - |
| NEA4 | H76A | CAC → GCG | - | - | - |

MA wurde unter den Testbedingungen von keiner der drei Varianten umgesetzt. Die Enzymvariante NEA2 setzte bevorzugt die (*R*)-Enantiomere der Substrate NEA und PEA um, es wurde aber auch ein kleiner Teil des (*S*)-Enantiomeres hydrolysiert. Bei der Variante NEA3 wurde die Enantioselektivität umgekehrt, diese Variante spaltete bevorzugt die (*S*)-Enantiomere von NEA und PEA. Die Variante NEA 4 zeigte in keinem der Tests lipolytische Aktivität. Diese Variante hatte den gleichen Aminosäureaustausch, aber andere Basenaustausche als die Variante NEA3.

In einem weiteren Screening der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank mit Hilfe eines einfachen und schnellen Agar-Plattentests wurden Enzymvarianten gefunden, deren Enantioselektivität gegenüber zwei Estern sekundärer Alkohole, die von BSLA-Wildtyp zu mehr als 99,9 % enantioselektiv umgesetzt werden, verändert war.

3.3 Gerichtete Evolution verbesserter BSLA-Varianten durch *in vitro* Rekombination

Bei der gerichteten Evolution der Enantioselektivität der BSLA bei der Hydrolyse des Modellsubstrats *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten dienten die unter 3.2.1 erstellten Sättigungsmutagenese-Banken und das unter 3.2.2 beschriebende Screening als Startpunkte. Von den unter 3.2.2 beschriebenen Varianten mit einzelnen Aminosäureaustauschen ausgehend, sollte durch Rekombination der Varianten untereinander die Enantioselektivität gegenüber dem Modellsubstrat noch weiter verbessert werden. Dabei sollten auch Aminosäureaustausche mit einbezogen werden, die in vorangehenden Ansätzen zur gerichteten Evolution als „hot-spot“-Positionen der Enantioselektivität der BSLA bei der Umsetzung des Modellsubstrats gefunden wurden (EGGERT, 2001).

Wie unter 3.2.3 beschrieben zeigten die BSLA-Varianten mit umgekehrter Enantioselektivität im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Thermostabilität. Um die Stabilität dieser Varianten zu verbessern, sollte auch eine Rekombination der enantioselektiveren BSLA-Varianten mit einer von RAO und Mitarbeitern evolvierten thermostabilen BSLA-Variante erfolgen (ACHARYA *et al.*, 2004). Zu diesem Zweck sollte eine neue *in vitro* Mutagenese-Methode entwickelt werden, die eine einfache und effektive Rekombination von Punktmutationen ermöglichte. Bei der Durchführung dieser Methode sollten keine zusätzlichen Punktmutationen in die zu rekombinierenen Gene eingeführt werden.

3.3.1 Biochemische Charakterisierung der thermostabilen Variante von LipA

Zu Beginn dieser Arbeiten wurden von RAO und Mitarbeitern freundlicherweise die drei Aminosäureaustausche einer thermostabilen BSLA-Variante übermittelt (L114P; A132D, N166Y), welche nach Inkubation bei 55 °C im Vergleich zum BSLA-Wildtyp eine 300-fach verbesserte Thermostabilität besitzt. Um festzustellen, ob die thermostabile Variante auch unter den im Rahmen dieser Arbeit gewählten Bedingungen (Expression im heterologen *E. coli*-System und Sekretion in den Kulturüberstand) eine verbesserte Thermostabilität zeigt, wurde diese durch ortsspezifische Mutagenese hergestellt. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Einfach-Variante hergestellt (L114P). Das gewonnene PCR-Produkt wurde wie unter 3.2.1 beschrieben mittels eingefügter Schnittstellen in den Vektor pET22b(+) ligiert. Das so gewonnene Konstrukt diente als Matrizen-DNA für die Doppelvariante (L114P, A132D), die wieder durch ortsspezifische Mutagenese erstellt wurde. Das in den Vektor pET22b(+) ligierte PCR-Produkt diente dann als Matrizen-DNA für die Herstellung der Dreifach-Variante. Zusätzlich wurden alle drei Austausch einzeln in die BSLA eingeführt. Durch einen späteren

Vergleich der Thermostabilitäten sollte festgestellt werden, ob auch schon die singulären Austausche zu einer verbesserten Thermostabilität der BSLA führen.

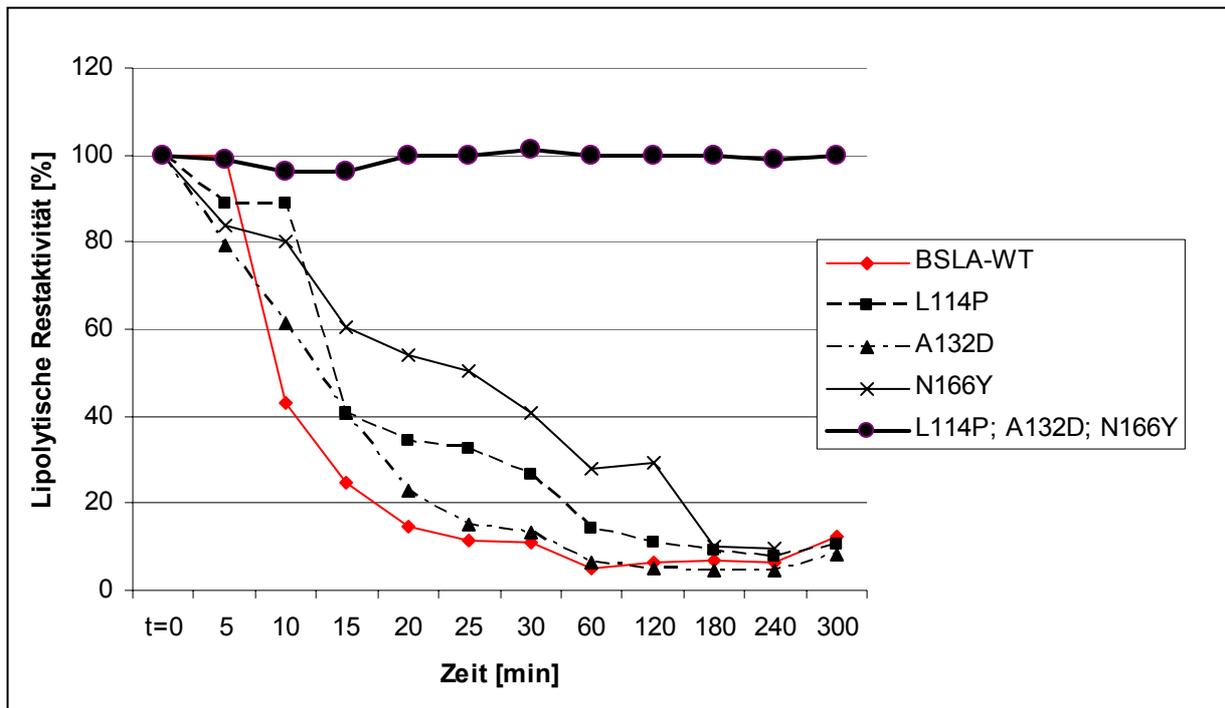


Abb. 24: Temperaturstabilität der BSLA und einiger Enzymvarianten bei 55 °C. Angegeben sind die lipolytischen Restaktivitäten der einzelnen Enzymvarianten nach unterschiedlich langer Inkubation der enzymhaltigen Kulturüberstände bei 55 °C. Die Messwerte wurden in vier unabhängigen Testreihen ermittelt. Die durchschnittliche Standardabweichung liegt unter 10 %. Die Aktivität der einzelnen Varianten vor der Inkubation bei 55 °C ($t = 0$) wurde jeweils als 100 % definiert und die lipolytische Aktivität nach unterschiedlich langer Hitzeinkubation darauf bezogen.

Bei der Betrachtung der temperaturabhängigen Inaktivierung bei 55 °C, die analog zu der unter 3.2.3 bei 45°C durchgeführten Bestimmung ermittelt wurde (Ergebnisse in Abb. 24), blieb die Dreifach-Variante bis zu 300 min in ihrer lipolytischen Aktivität unbeeinträchtigt, während der BSLA-Wildtyp bereits nach 10 min Hitzeinkubation beträchtliche Verluste der lipolytischen Aktivität aufwies. Die Variante N166Y zeigte nach 30 min Hitzeinkubation noch etwa 40 % ihrer Aktivität und damit eine signifikante Verbesserung der Thermostabilität im Vergleich zum Wildtyp, dessen lipolytische Restaktivität nach 30 min Hitzeinkubation nur noch etwa 11 % betrug. Die Variante L114P zeigte nach 30 min eine lipolytische Restaktivität von etwa 27 %, die Variante A132D zeigte eine lipolytische Restaktivität von etwa 13 %.

Zur weiteren Charakterisierung der Temperaturstabilität wurden zeitabhängige Inaktivierungskinetiken der einzelnen Varianten bei Temperaturen zwischen 21 °C und 90 °C aufgenommen (Abb. 25). Hierfür wurden die enzymhaltigen Kulturüberstände für 1 h bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert und anschließend wurde die lipolytische Restaktivität mittels *p*-Nitrophenyl-Palmitat-Test ermittelt. Die BSLA und die Varianten L114P und

A132D zeigten bei einer Inaktivierungstemperatur von 50°C nach einer Stunde um über die Hälfte reduzierte Restaktivitäten. Bei Inkubationen mit höheren Temperaturen hatten diese Varianten nach einer Stunde fast sämtliche Aktivität verloren. Für den Wildtyp wurde dieses Temperaturverhalten bereits durch EGGERT (2001) beschrieben. Die Dreifach-Variante zeigte bei einer Inkubierungstemperatur von 60 °C nach einer Stunde keine lipolytische Aktivität mehr.

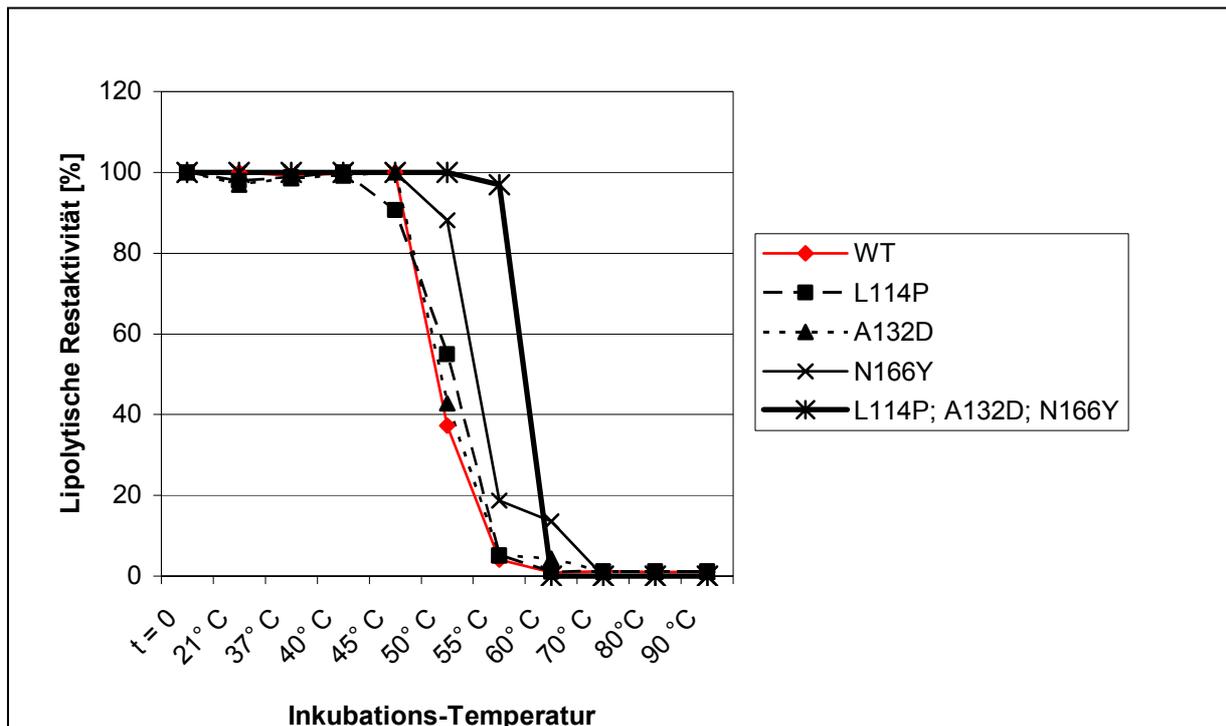


Abb. 25: Temperaturstabilität der BSLA und verschiedener Varianten. Angegeben sind die enzymatischen Restaktivitäten nach einstündiger Inkubation der enzymhaltigen Kulturüberstände bei den verschiedenen Temperaturen, die spektrophotometrisch mit *p*-Nitrophenyl-Palmitat als Substrat bestimmt wurden. Als 100 % wurde die lipolytische Aktivität der Kulturüberstände vor der Inkubation zum Zeitpunkt $t=0$ bestimmt. Die Messwerte wurden in vier unabhängigen Testreihen ermittelt. Die durchschnittliche Standardabweichung liegt unter 10 %.

Die einzelnen Varianten wurden ebenfalls in der Desymmetrisierung von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 19 dargestellt. Alle Enzymvarianten zeigten einen mit dem Wildtyp-Enzym vergleichbaren vollen Umsatz und ähnliche Enantioselektivitäten gegenüber dem Modells substrat.

Tab. 19: Ergebnisse der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten durch die BSLA und verschiedene Varianten. Die Enantioselektivität und der Umsatz wurden aus ESI-Massenspektrogrammen abgeleitet.

| Variante | Umsatz [%] | <i>ee</i> -Wert [%] |
|---------------------|------------|---------------------|
| BSLA | 100 | 48 |
| L114P | 100 | 48 |
| A132D | 100 | 52 |
| N166Y | 100 | 52 |
| L114P; A132D, N166Y | 100 | 52 |

3.3.2 Etablierung einer Methode zur *in vitro* Rekombination von Punktmutationen

Um die DNA verschiedener Enzymvarianten miteinander zu rekombinieren, wird oft eine der vielen Formen des DNA-Shufflings angewendet. Diese Art der Rekombination weist aber mehrere Nachteile auf: Durch das Einfügen von zusätzlichen, neuen Punktmutationen wird die Zahl der zu screenenden Enzymvarianten drastisch erhöht. Während des zeitlich aufwendigen Vorgangs des DNA-Shufflings werden durchschnittlich 7 neue Mutationen pro kb DNA eingeführt (STEMMER, 1994a und b). Des Weiteren werden, abhängig von der Ziel-DNA, Rekombinationen an bestimmten Stellen bevorzugt ausgeführt. Direkt benachbarte Mutationen werden nur mit einer geringen Frequenz rekombiniert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine neue Methode zur *in vitro* Rekombination entwickelt werden, bei der diese Nachteile ausgeschlossen werden konnten. Die Methode sollte schnell durchführbar sein und eine hohe Rekombinationsfrequenz aufweisen.

In einem ersten Ansatz (Protokoll 1) sollten 4 Varianten mit Punktmutationen miteinander rekombiniert werden. Dazu wurden die Varianten Y49C, N50S, Q60N und L124S ausgewählt, die 2001 von EGGERT in einem Screening auf veränderte Enantioselektivität bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten entdeckt wurden und die alle im Vergleich zum Wildtyp eine leicht erhöhte Enantioselektivität für das (1*R*, 4*S*)-Enantiomer besaßen. Eine Rekombination dieser Varianten sollte zu Varianten mit weiteren Verbesserungen des *ee*-Wertes führen. Die Rekombination wurde wie in Abb. 26 schematisch dargestellt durchgeführt. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden in den Vektor pET22b(+) kloniert und der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wurde mit dem Produkt der Ligation transformiert. Anschließend wurde ein Screening auf verbesserte Enantioselektivität bei der Hydrolyse des Substrats *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten durchgeführt, welches aber nicht zu der Identifizierung von Varianten mit verbesserter Selektivität führte. Um den Erfolg der Rekombination zu überprüfen, wurden 15 zufällig ausgewählte, auf Tributyrin-Agar-Platten lipolytisch-aktive Varianten angezogen und nach der Isolierung die Plasmid-DNA sequenziert. Die sich aus den Sequenzierung ergebenden Effizienzen sind in Tab. 20 geteigt.

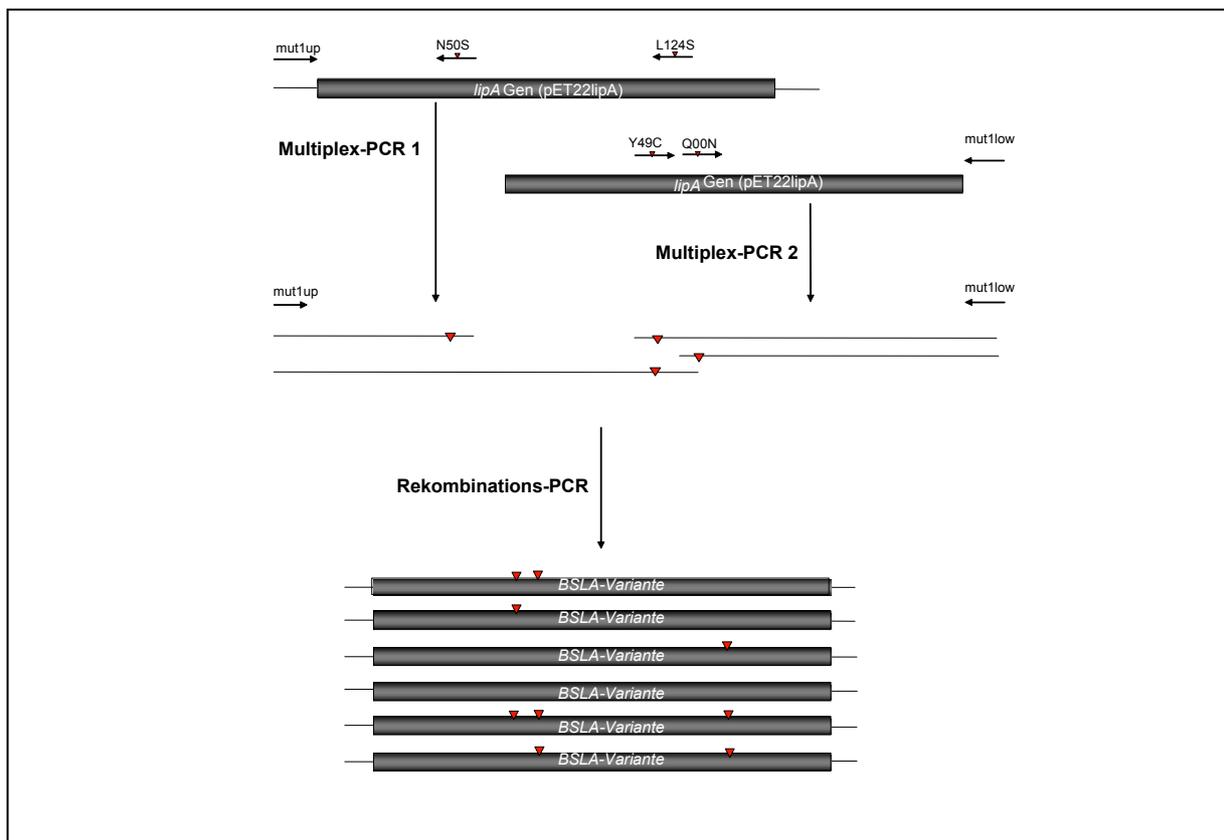


Abb. 26: Schematische Darstellung der *in vitro* Rekombination mit Protokoll 1. Es wurden zunächst zwei verschiedene Multiplex-PCR durchgeführt. In der ersten wurden das universelle Oligonukleotid mut1 up und die Mutagenese-Oligonukleotide N50S und L124S eingesetzt, für die zweite wurden die Mutagenese-Oligonukleotide Y49C und Q00N und das universelle Oligonukleotid mut1low gebraucht. Für beide PCR diente das Konstrukt pET22*lipA* als Matrizen-DNA. Um die vollständigen Gene zu erhalten, wurden die in dieser PCR gewonnenen Fragmente in eine dritte PCR eingesetzt, zusammen mit den universellen, flankierenden Oligonukleotiden mut1up und mut1low. Rekombination ergab sich durch das Überlappen der in hoher Konzentration vorliegenden Gen-Fragmente. Rote Dreiecke stellen mutierte DNA-Bereiche dar.

Protokoll 1 (Abb.25) führte zu einer Rate zusätzlich eingeführter Punktmutationen von 0,47 pro kb. Unter den 15 sequenzierten Varianten befand sich einmal die DNA des BSLA-Wildtyps.

Mit dem Ziel, die Reamplifikation der BSLA-Wildtyp-DNA zu unterbinden und eine größere Anzahl Punktmutation bei gleichbleibend guter Rekombinationsfrequenz kombinieren zu können, wurde das Protokoll 1 weiter verbessert.

Um nach der ersten PCR viele und kleinere Genfragmente zu erhalten, wurden die gewählten Mutagenese-Oligonukleotide in beiden Orientierungen („up“ und „low“) eingesetzt. Kleinere Fragmente können zu einer verbesserten Rekombinationsfrequenz führen. Wie bereits unter 3.2.1 beschrieben, sollte ein Austausch der Matrizen-DNA und sorgsam gewählte Oligonukleotide die Amplifikation der Wildtyp-DNA verhindern. Es wurden 11 verschiedene Punktmutationen mit dem in Abb. 27 veranschaulichten Protokoll 2 rekombiniert. Die korrekte Bildung der Genfragmente während der Multiplex-PCR-Reaktion wurde durch Agarose-Gel-Elektrophorese kontrolliert (Abb. 28).

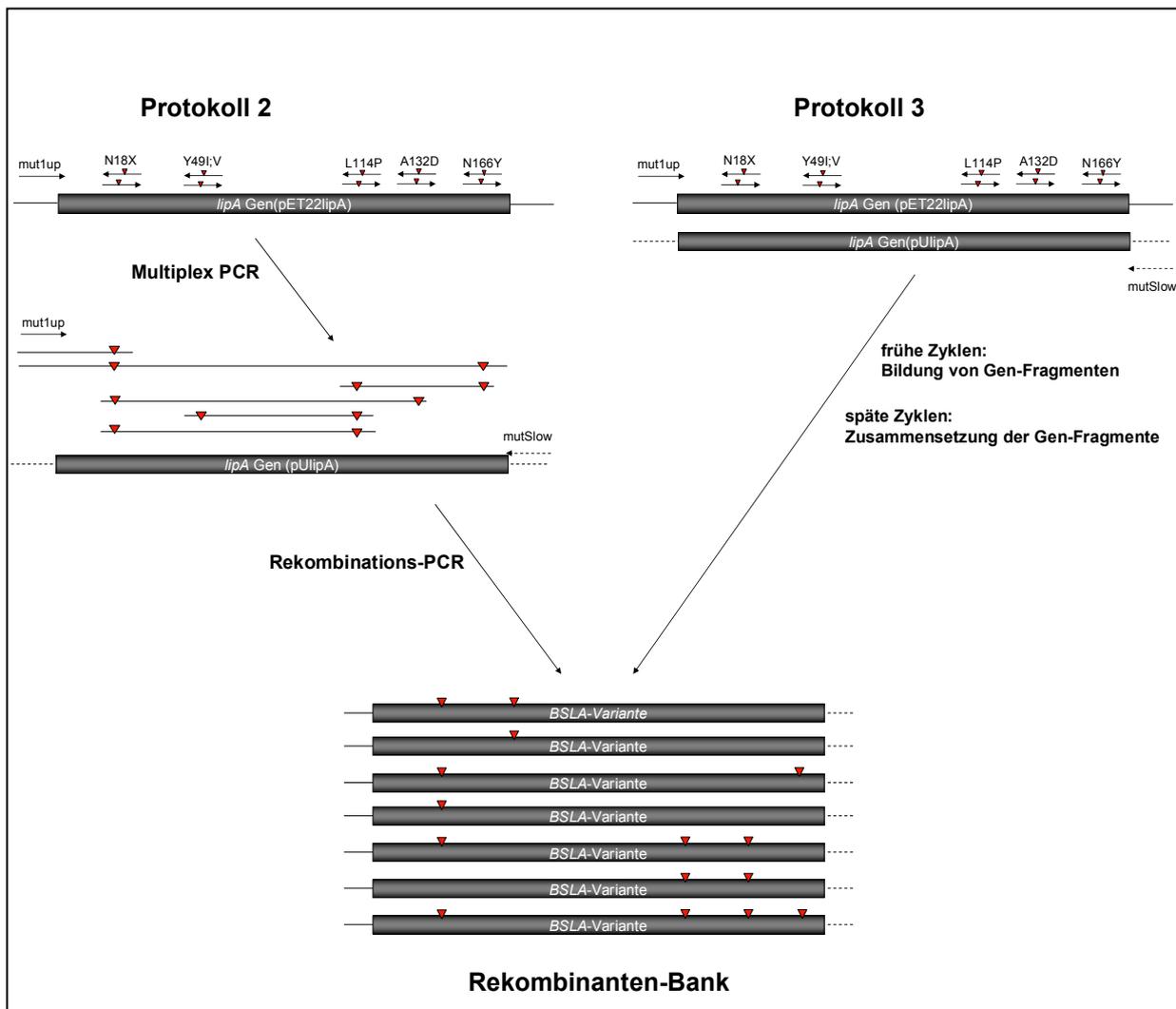


Abb. 27: Schematische Darstellung der neu entwickelten *in vitro* Rekombinations-Methode nach Protokoll 2 und Protokoll 3. Protokoll 2: Zuerst wurden das universelle Oligonukleotid mut1up und die in beiden Richtungen orientierten Mutagenese-Oligonukleotide (25-50 pmol) mit der Matrizen-DNA pETlipA in eine Multiplex-PCR eingesetzt. In der darauf folgenden Rekombinations-PCR wurden die in der Multiplex-PCR entstandenen Gen-Fragmente, das Oligonukleotid mut1up, das Oligonukleotid mutSlow und das Konstrukt pUlipA als Matrizen-DNA eingesetzt. Protokoll 3: Beide PCR aus Protokoll 2 wurden in einem Ansatz durchgeführt. Alle PCR-Ansätze wurden nach unter 2.11.1 beschriebenen Standardbedingungen durchgeführt. Rote Dreiecke stellen mutierte DNA-Bereiche dar.

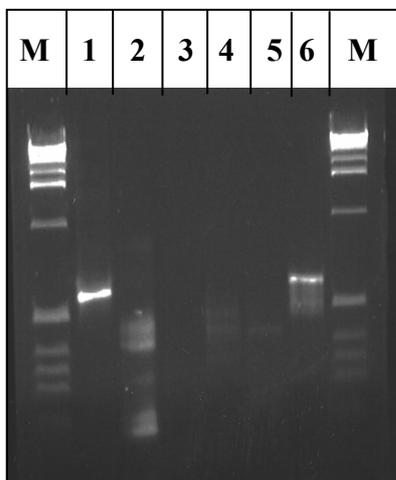


Abb. 28: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Kontrolle der einzelnen Schritte bei der *in vitro* Rekombination nach Protokoll 2. M= DNA-Marker, 1 kb-DNA-ladder (INVITROGEN). Auf Spur 1 wurde als Positiv-Kontrolle mit dem Standard-Protokoll amplifiziertes *lipA*-Gen aufgetragen. Spur 2 zeigt die nach der Multiplex-PCR entstandenen Fragmente unterschiedlicher Größe. Spur 3 zeigt eine Negativ-Kontrolle der Rekombinations-PCR, bei der die Oligonukleotide mut1up und mutS low zusammen mit dem Plasmid pUlipA eingesetzt wurden. Spur 4 zeigt eine Negativ-Kontrolle der Rekombinations-PCR bei der die Fragment-Mischung aus Spur 2 und das Plasmid pUlipA eingesetzt wurden, aber die universellen Oligonukleotide mut1up und mutSlow fehlten. Spur 5 zeigt eine Negativ-Kontrolle der Rekombinations-PCR, in die die Fragment-Mischung aus Spur 2 und die universellen Oligonukleotide, aber keine Matrizen-DNA eingesetzt wurden. Spur 6 zeigt das Vollängen-PCR-Produkt nach der vollständigen Rekombination.

Die in Tab. 20 dargestellten Effizienzen zeigten, dass Protokoll 2 generell gut für die Rekombination mehrerer Punktmutationen geeignet war. Die Rate der zusätzlich eingeführten Punktmutationen konnte im Vergleich zu Protokoll 1 verringert werden und es wurde in den Sequenzen keine DNA des BSLA-Wildtyps identifiziert.

Tab. 20: Effizienzen der durchgeführten Protokolle zur *in vitro* Rekombination. Es wurden die Aminosäureaustausche auf Tributyrin-Agarplatten aktiver, zufällig ausgewählter Rekombinanten bestimmt. Zusätzlich eingeführte Aminosäureaustausche sind fett und kursiv gedruckt.

| Protokoll | Rekombinierte Aminosäureaustausche | Aminosäureaustausche der untersuchten Varianten | Rate zusätzlicher Punkt-Mutationen | Wildtyp in den Sequenzen |
|-----------|---|--|------------------------------------|--------------------------|
| 1 | Y49C N50S Q60N L124S | 1: N50S, Q60N, <i>N51T</i> 2: Y49C, Q60N, L124S 3: Y49C 4: N50S 5: N50S, Q60N, <i>G80S</i> 6: N50S, Q60N 7: Y49C, Q60N, <i>G46D</i> 8: Y49C 9: Y49C, N50S, <i>G155E</i> 10: N50S 11: N50S, L124S 12: N50S 13: N50S, L124S 14: - 15: Y49C | 0,47 pro kb | ja |
| 2 | I22T Y49C N50S F58L Q60N Q60L L114P C124S A232D I157N N166Y | 1: I22T, Y49C, N50S, I114P, C124S 2: I22T, N50S, L114P, C124S, <i>S24I</i> 3: I22T, N50S 4: N50S, F58L, L114P 5: I22T, N50S, Q60N, L114P, C124S, I157N 6: I22T, Y49C, F58L, L114P 7: Y49C, L114P | 0,19 pro kb | nein |
| 2 | N18X Y49I Y49V L114P A132D N166Y | 1: N18A, Y49I 2: Y49I 3: N18L, N166Y 4: N18I 5: N18S, L114P, A132D 6: L114P, A132D, N166Y 7: N18S, L114P, A132D, <i>SI30R</i> | 0,1 pro kb* | nein |
| 3 | N18X Y49I Y49V L114P A132D N166Y | 1: N18Q, L114P 2: L114P, <i>G116V</i> 3: N18A, L114P, N166Y 4: L114P, N166Y 5: N18I, L114P, N166Y | 0,3 pro kb | nein |

*Diese Rate der zusätzlichen Punktmutationen wurde aus den in dieser Tabelle angegebenen Sequenzen und aus den in der Tab. 21 angegebenen Sequenzen berechnet.

Nach Protokoll 2 wurde eine weitere Rekombination von 6 Varianten durchgeführt. Hier ergab sich die hervorragende Rate zusätzlich eingeführter Punkt-Mutationen von nur 0,1 pro kb (Tab. 20). Aus dieser Rekombination hervorgegangene Varianten wurden in einem Screening eingesetzt. Dieses ist unter 3.3.4 beschrieben.

Um eine weitere Zeitersparnis bei der *in vitro* Rekombination zu bewirken, wurden die beiden für das Protokoll 2 durchzuführenden PCR in Protokoll 3 zu einer PCR zusammengefasst (Abb. 27). Wie die nach der Rekombination erfolgten Sequenzierungen zeigten (Tab. 20), war auch diese Strategie erfolgreich. Da unter fünf Varianten eine einen zusätzlichen Aminosäureaustausch hatte, ergab sich eine Rate zusätzlich eingeführter Punktmutationen von 0,3 pro kb.

Es konnte eine neue Methode zur *in vitro* Rekombination entwickelt werden, mit der Gene mit Punktmutationen einfach und schnell miteinander rekombiniert werden können. Dabei werden im Gegensatz zu bereits etablierten Methoden kaum neue, zusätzliche Punktmutationen in die zu rekombinierenden Gene eingeführt (Rate 0,1-0,3 pro kb). Die durch eine hohe Rekombinations-Frequenz ausgezeichnete Methode lässt auch die Rekombination von direkt benachbarten Aminosäureaustauschen der Enzyme zu.

Die Methode wurde als *Multiplex-PCR-based Recombination* (MUPREC) bezeichnet.

3.3.3 Anwendung der unter 3.3.2 entwickelten Methode MUPREC für die Optimierung enantioselektiver BSLA-Varianten

In den vorangehenden Kapiteln dieser Arbeit wurden BSLA-Varianten beschrieben, die im Vergleich zum Wildtyp eine umgekehrte Enantioselektivität bei der Hydrolyse des Substrats *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten zeigten. Wie unter 3.2.3 und 3.3.1 beschrieben, hatten diese Varianten im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Thermostabilität. Es stellte sich jetzt die Frage, ob diese Varianten mit der unter 3.3.1 beschriebenen thermostabilen Variante rekombiniert, eine verbesserte Thermostabilität erhalten würden. Dabei sollte die umgekehrte Enantioselektivität erhalten bleiben. Für die Verfolgung dieses Zieles sollten die in der Tab. 21 aufgeführten Varianten mit der unter 3.3.2 entwickelten Methode miteinander rekombiniert werden. Die Variante N18Q; Y49V wurde in einer in dieser Arbeit nicht näher beschreibenden doppelten Sättigungsmutagenese der Aminosäurepositionen 18 und 49 mit anschließendem Screening identifiziert. Dieses wurde durchgeführt, um eventuell eine weitere Verbesserung der Enantioselektivität der BSLA zu erreichen. Die Doppelvariante schien im Vergleich zu der Variante N18Q bei gleichbleibender Enantioselektivität eine höhere lipolytische Aktivität aufzuweisen. Für die Rekombination wurde, wie bereits in 3.3.2

beschrieben, das Protokoll 2 benutzt. Dem eigentlichen Screening der Varianten ging ein Vorscreening auf Tributyrin-Agar-Platten voraus. Auf diesen Platten zeigten nur etwa 10 % der Klone lipolytische Aktivität. Um gleichzeitig auf verbesserte Enantioselektivität und auf Thermostabilität screenen zu können, wurden die Kulturüberstände der Varianten vor dem Screening zweigeteilt und unterschiedlich vorbehandelt. Ein Teil der Kulturüberstände wurde für 30 min bei 45 °C inkubiert, der andere Teil wurde für 30 min bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden beide Teile der Kulturüberstände im ESI-MS-Screening eingesetzt. Die Screening-Ergebnisse wurden dann direkt miteinander verglichen. Abb. 29 zeigt die Screening-Ergebnisse verschiedener Kontrollen.

Tab. 21: Die bei der *in vitro* Rekombination eingesetzten Varianten. Die *ee*-Werte und die Umsätze wurden aus ESI-Massenspektrogrammen abgeleitet und beziehen sich auf die Hydrolyse des Substrats *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten. Die Restaktivität nach Hitzeinkubation wurde analog zu 3.2.3 ermittelt, indem enzymhaltige Kulturüberstände für 30 min bei 45 °C inkubiert wurden. Vor und nach der Inkubation wurde die lipolytische Aktivität gegenüber *p*-Nitrophenyl-Palmitat bestimmt. Der sich vor der Inkubation ergebende Wert für jede Variante wurde als 100 % definiert und der Wert nach der Inkubation wurde in Relation gesetzt. n.b.: nicht bestimmt.

| Variante | <i>ee</i> -Wert [%] | Umsatz [%] | Restaktivität [%] |
|---------------------|---------------------|------------|-------------------|
| L114P; A132D; N166Y | 52 | 100 | 100 |
| N18S | -83 | 50 | 68,5 |
| N18Q | -82 | 75 | 94,7 |
| N18Q; Y49V | -82 | 85 | 21,6 |
| N18C | -72 | 85 | 21,5 |
| N18L | -65 | 75 | 45,6 |
| N18I | -14 | 90 | 29,9 |
| Y49I | -15 | 5 | n.b. |

Als Kontrollen für das ausgewählte Screeningsystem wurden der BSLA-Wildtyp, die thermostabile Dreifach-Variante L114P; A132D; N166Y und einige der Varianten mit umgekehrten *ee*-Wert eingesetzt (Tab. 21). In den voneinander unabhängigen Messungen zeigte sich, dass sich die *ee*-Werte der hitzeinkubierten und der nicht-hitzeinkubierten enzymhaltigen Kulturüberstände nur unwesentlich voneinander unterschieden. Die Umsätze der BSLA und der hitzestabilen Variante waren nach der Hitzeinkubation nicht verändert, während die Umsätze der Varianten mit umgekehrter Enantioselektivität und einem Aminosäureaustausch signifikant niedriger waren. Somit erschien das ausgewählte System zum gleichzeitigen Screening von Enantioselektivität und Thermostabilität zunächst als sinnvoll.

Im Screening der Rekombinanten-Bank zeigten die meisten Varianten mit umgekehrter Enantioselektivität eine deutliche Verringerung des Umsatzes nach der Hitzeinkubation.

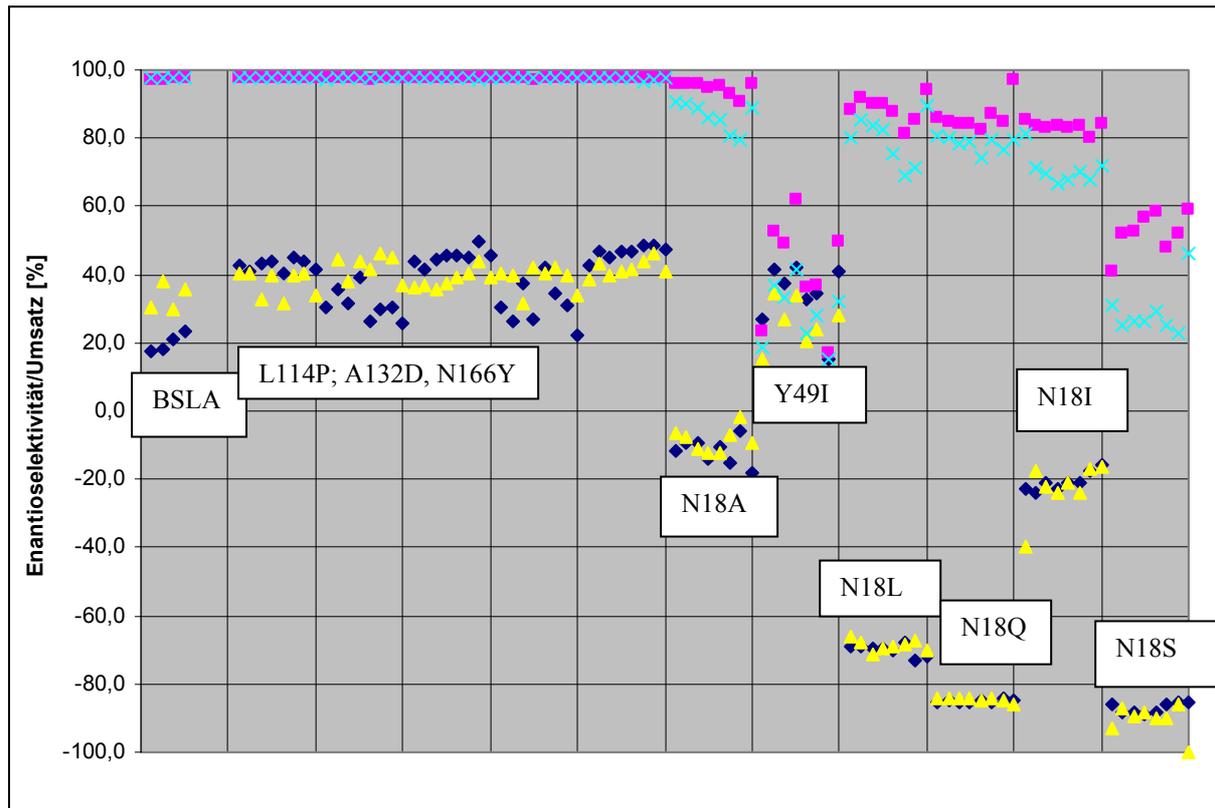


Abb. 29: Screening-Ergebnisse 192 durchgeführter Kontrollversuche. Die enzymhaltigen Kulturüberstände wurden zweigeteilt. Von einem Teil wurden die *ee*-Werte und die Umsätze gegenüber dem Substrat *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (ohne Hitzeinkubation) bestimmt. Der andere Teil wurde für 30 min bei 45 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ebenfalls die Bestimmung von *ee*-Wert und Umsatz.

- ◆ *ee*-Wert ohne Hitzeinkubation, ■ Umsatz ohne Hitzeinkubation,
- ▲ *ee*-Wert mit Hitzeinkubation, × Umsatz mit Hitzeinkubation

Einige Varianten mit umgekehrter Enantioselectivität zeigten gleichbleibende Umsetzungen der hitzeinkubierten und der nicht-hitzeinkubierten Kulturüberstände.

Nach der Reproduktion dieser Befunde wurden die Plasmide der entsprechenden Varianten isoliert und die BSLA-Variantengene sequenziert. Anschließend wurden die enzymhaltigen Kulturüberstände für die Bestimmung der Thermostabilität im *p*-Nitrophenyl-Palmitat-Test eingesetzt. Die Ergebnisse der Sequenzierungen und der Bestimmung der Thermostabilität sind in Tab. 22 aufgeführt. Varianten, die den Aminosäureaustausch N18Q haben, zeigten alle einen negativen *ee*-Wert von über 80 %. Leider hatten alle Varianten in dem nur 15 min dauernden *p*-Nitrophenyl-Palmitat-Test nach der Hitzeinkubation nur geringe Restaktivitäten.

Der Kulturüberstand mit der Variante N18Q; Y49V zeigte in dem mit ESI-MS durchgeführten Screening nach der Hitzinkubation den gleichen Umsatz (etwa 100 %) wie ohne Hitzeinkubation. Diese Variante wurde in dem Screening mehrfach identifiziert. Das

sprach dafür, dass eine eventuelle hohe Aktivität dieser Variante bei Umsetzungen über 24 h eine gewisse Thermolabilität ausglich. Bei der nur 15 min dauernden Umsetzung von *p*-Nitrophenyl-Palmitat durch die bei 45 °C hitzeinkubierte Doppelvariante zeigte sich die Empfindlichkeit der Variante gegenüber der Temperatur.

Tab. 22: Bestimmung der Restaktivität der im ESI-MS identifizierten Varianten mit umgekehrten *ee*-Wert und vor und nach der Hitzeinkubation gleichbleibenden Umsätzen. Die *ee*-Werte wurden aus ESI-Massenspektrogrammen abgeleitet und beziehen sich auf die Hydrolyse des Substrats *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten. Die Restaktivität wurde analog zu 3.2.3 ermittelt, indem enzymhaltige Kulturüberstände für 30 min bei 45 °C inkubiert wurden. Vor und nach der Inkubation wurde die lipolytische Aktivität gegenüber *p*-Nitrophenyl-Palmitat bestimmt. Der sich vor der Inkubation ergebende Wert für jede Variante wurde als 100 % definiert und der Wert nach der Inkubation wurde in Relation gesetzt.

| Variante | Aminosäureaustausche | <i>ee</i> -Wert [%] | Restaktivität [%] |
|-----------|------------------------------|---------------------|-------------------|
| 16-02-D1 | N18L; N166Y | -68 | 20,0 |
| 16-02-B1 | N18S; 114P; N166Y | -23 | 21,2 |
| 37-02-F2 | N18H; N166Y | -61 | 28,1 |
| 37-02-B12 | N18Q; Y49V | -82 | 21,6 |
| 16-02-F1 | N18Q; L114P | -85 | 22,6 |
| 16-02-G1 | N18Q; L114P; A132D; N166Y | -85 | 23,1 |
| 37-03-A3 | N18S; Y49I; L114P | -30 | 40,4 |
| 37-01-G5 | N18Q; Y49V | -82 | 21,6 |

Bei der *in vitro* Rekombination der thermostabilen BSLA-Dreifach-Variante und der Varianten mit umgekehrter Enantioselektivität konnte keine Variante mit umgekehrtem *ee*-Wert bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten und gleichzeitig verbesserter Thermostabilität gefunden werden.

3.3.4 Die Doppelvariante N18Q; Y49V hat einen *ee*-Wert von 82 % bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten und eine höhere lipolytische Aktivität als die Variante N18Q

Um die Frage zu beantworten, ob die unter 3.3.3 wieder identifizierte Doppelvariante mit einem umgekehrten *ee*-Wert von 82 % eine höhere Aktivität aufwies als die N18Q-Einfachvariante, wurden beide Varianten biochemisch charakterisiert und die Messergebnisse wurden miteinander verglichen. Im Vergleich zu der Variante N18Q zeigte die Doppelvariante gleichbleibende Selektivität, aber einen erhöhten Umsatz des Substrats (Tab. 23). Auf Tributyrin-Agar-Platten zeigte die Doppelvariante eine wesentlich schnellere und

deutlichere Klärhofbildung als die Variante N18Q, deren Klärhof erst nach dreitägiger Inkubation deutlich wurde (Abb. 30).

Tab. 23: Die Doppelvariante N18Q; Y49V zeigt bei gleichbleibendem *ee*-Wert einen höheren Umsatz als die Variante N18Q gegenüber *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten. Die Umsätze und die *ee*-Werte wurden aus ESI-Massenspektrogrammen ermittelt. Die ausgetauschten Basen sind in rot hervorgehoben.

| Variante | Basenaustausch | Umsatz* [%] | <i>ee</i> -Wert [%] |
|------------|--------------------------------------|-------------|---------------------|
| N18Q | aat → cag | 75 | -82 |
| N18Q, Y49V | aat → cag tat → atc | 85-100 | -82 |

* Zur Bestimmung des Umsatzes wurden mehrere Werte gemittelt. Der Umsatz zeigte sich bei unterschiedlichen Messungen stark variabel (Abweichungen bis zu 20 %), die Relationen der Werte untereinander blieben aber gleich.

Um festzustellen, ob diese verbesserte lipolytische Aktivität auf erhöhter enzymatischer Aktivität oder auf erhöhter Expression des korrespondierenden Genes beruht, wurden zur Quantifizierung der Proteinmengen in den Kulturüberständen gleiche Volumina mit SDS-PAGE-Analyse überprüft. Die Variante N18Q; Y49V konnte im Gegensatz zur Variante N18Q nicht mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Zur weiteren Untersuchung sollten beiden Proteinvarianten wie unter 3.1.1 für den BSLA-Wildtyp beschrieben aufgereinigt werden. Das für die Variante N18Q codierende Gen lag bereits in dem Vektor pET19b vor (3.2.4). Dieses Konstrukt wurde als Matrizen-DNA für die ortsspezifische Mutagenese zur Erstellung der Doppelvariante genutzt.

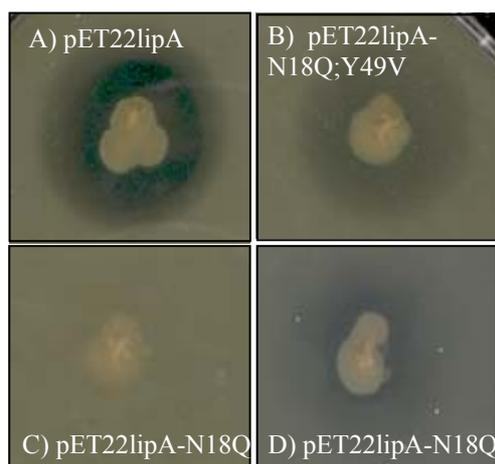


Abb. 30: *E. coli* BL21(DE3) mit verschiedenen Plasmiden auf Tributyrin-Agar.

Alle Bakterien-Kolonien wurden mit einem Zahnstocher auf den Tributyrin-Agar geimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die unter D) gezeigte Kolonie wurde für drei Tage bei 37 °C inkubiert. Die in den Klonen vorliegenden Plasmide sind in den einzelnen Abbildungen wiedergegeben.

Das resultierende PCR-Produkt wurde in den Vektor pET19b ligiert. Mit den entstandenen Vektoren wurden *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Anschließend erfolgte die Expression der Gene über drei Stunden. Mittels SDS-PAGE-Analyse konnten beide Proteine im Rohextrakt

nachgewiesen werden. Beide Proteine wurden anschließend gereinigt (Ergebnisse nicht dargestellt) und es wurden im Vergleich zum BSLA-Wildtyp die spezifischen Aktivitäten, die Michaelis-Menten-Konstanten k_M und die Wechselzahlen k_{cat} gegenüber dem Substrat *p*-Nitrophenyl-Palmitat bestimmt. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Abb. 31 und Tab. 24 wiedergegeben.

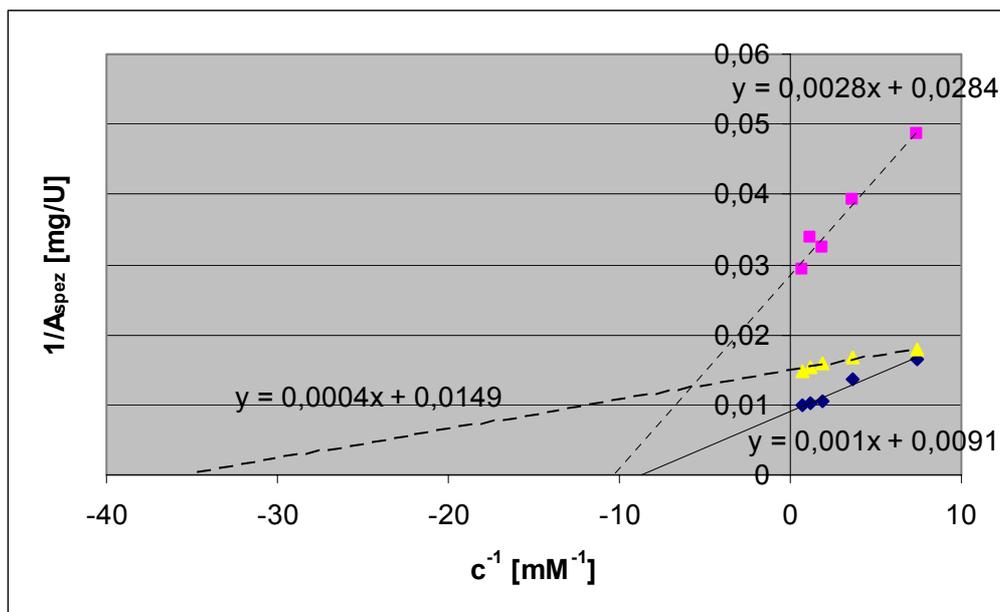


Abb. 31: Darstellung der Enzymkinetiken der BSLA (◆) und der Varianten N18Q (■) und N18Q, Y49V (▲) nach LINEWEAVER-BURK. Zur Bestimmung der Werte wurden *p*-Nitrophenyl-Palmitat-Substratemulsionen unterschiedlicher Konzentration mit verdünnten Lipase-Lösungen vermischt. Anschließend wurde die zeitliche Zunahme der Extinktion bei 410 nm Lichtwellenlänge gemessen und daraus die Reaktionsgeschwindigkeit errechnet. Um die Aktivitäten vergleichen zu können, wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten auf die einzelnen Lipasemengen bezogen und als spezifische Aktivitäten ausgedrückt. Die Werte stammen aus zwei voneinander unabhängigen Messungen. Die durchschnittliche Standardabweichung liegt unter 6 %. Der Schnittpunkt der Ausgleichsgraden mit der Ordinate entspricht dem reziproken Wert der maximalen spezifischen Aktivität, der Schnittpunkt mit der Abszisse dem negativ reziproken k_M -Wert.

Aus einem Liter Kultur konnten 34 mg des Proteins N18Q und 23,5 mg des Proteins N18Q; Y49V gewonnen werden. Für den Wildtyp und die Variante N18Q ergaben sich nur gering unterschiedliche Michaelis-Menten-Konstanten. Die für die Variante N18Q; Y49V ermittelte Michaelis-Menten-Konstante war deutlich geringer. Die spezifische Aktivität und die Wechselzahl der Doppelvariante waren im Vergleich zu der von N18Q verdoppelt, im Vergleich zum Wildtyp aber um etwa die Hälfte verringert.

Tab. 24: Die Enzym-Charakteristika der BSLA und der Varianten N18Q und N18Q; Y49V gegenüber dem Substrat *p*-Nitrophenyl-Palmitat. A_{spez} = spezifische Lipaseaktivität; k_M = Michaelis-Menten-Konstante; k_{cat} = Wechselzahl

| Variante | A_{spez} [U/mg] | k_M [mM] | k_{cat} [s^{-1}] |
|------------|--------------------------|------------|-------------------------------|
| BSLA | 110 | 0,12 | 42 |
| N18Q | 35 | 0,09 | 12 |
| N18Q; Y49V | 67 | 0,027 | 24 |

Die Doppelvariante N18Q; Y49V zeigte im Vergleich zu der Variante N18Q gleich bleibende Selektivität, aber einen erhöhten Umsatz gegenüber dem Modells substrat. Beide Proteinvarianten wurden chromatographisch gereinigt und im Vergleich zum Wildtyp biochemisch charakterisiert. Die Variante N18Q; Y49V zeigte eine deutlich erniedrigte Michaelis-Menten-Konstante, verdoppelte spezifische Aktivität und eine verdoppelte Wechselzahl im Vergleich zu der Variante N18Q.

4 DISKUSSION

Lipasen sind die meistgenutzten Enzyme in der chemischen Synthese und katalysieren die chemo-, regio- oder enantioselektive Hydrolyse von vielen Esterverbindungen. Durch ihre zahlreichen Vorteile wie den breiten Substratspektren, der Arbeitsweise ohne Kofaktoren und der Stabilität in organischen Lösungsmitteln sind diese Enzyme für die Biotechnologie besonders interessant (JAEGER & REETZ, 1998; BORNSCHEUER & KAZLAUSKAS, 1999; JAEGER & EGGERT, 2002; REETZ, 2002). Die extrazelluläre Lipase A aus *Bacillus subtilis* (BSLA) wurde 1992 von DARTOIS *et al.* zum ersten Mal beschrieben und später von LESUISSE *et al.* (1993) und EGGERT (2001) näher charakterisiert. Die Kristallstruktur des Proteins wurde 2001 erstmalig von VAN POUDEROYEN *et al.* gelöst. Mehrere Eigenschaften machen die BSLA zu einem Enzym mit besonders hohem biotechnologischem Potential: Die aus nur 181 Aminosäuren bestehende BSLA gilt als die kleinste α/β -Hydrolase („ α/β -minimal fold“) (VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001). Das Enzym weist sehr hohe Enantioselektivitäten ($ee > 99,99\%$) in den Hydrolysereaktionen von verschiedenen sekundären Alkoholen auf (EIPPER, 2002), hat einen ungewöhnlich hohen pI-Wert von 9,9 und zeigt maximale lipolytische Aktivität bei einem pH-Wert von 10. Die Aktivität der BSLA kann durch die Zugabe von Detergenzien gesteigert werden (LESUISSE *et al.*, 1993; EGGERT, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, eingebunden in das EU-Projekt „EvoCatal“, 1) das Enzym im Vergleich zur Lipase B aus *B. subtilis* (BSLB) auf weitere biotechnologisch interessante Eigenschaften überprüft, 2) durch die Anwendung von Methoden zur gerichteten Evolution das biotechnologische Potential des Enzyms weiter verbessert. Zu diesem Zwecke wurde 3) eine neue Methode zur *in vitro* Rekombination entwickelt.

4.1 Biochemische Charakterisierung der BSLA und BSLB

Wie in der Einleitung (vgl. 1.1.3) beschrieben ist die BSLA vom biotechnologischen Standpunkt aus betrachtet hochinteressant. Um weiteres biotechnologisches Potential zu ergründen, sollte die BSLA im Vergleich zur BSLB biochemisch näher charakterisiert werden. Die BSLB ist auf Aminosäure-Ebene zu 74 % identisch mit der BSLA. Sie zeigt vergleichbare Temperatur- und pH-Wert-Stabilitäten, aber unterschiedliche Substratspezifitäten sowie ein unterschiedliches Verhalten bei der Inkubation mit Detergenzien (EGGERT *et al.*, 2000; 2001; 2002). Eine strukturelle Begründung liegt darin, dass 45 der 47 Aminosäuren, die sich bei den beiden Enzymen unterscheiden, an der Enzymoberfläche lokalisiert sind. Dadurch wird das α/β -Faltungsprinzip strikt beibehalten und die beiden Enzyme haben vergleichbare Stabilitätsprofile. Die meisten voneinander abweichenden Aminosäuren sind um den Bereich

der Substratbindetasche lokalisiert. Durch die veränderten Substratbindetaschen können die unterschiedlichen Substratspezifitäten erklärt werden (VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001; EGGERT *et al.*, 2002).

Die BSLB zeigt keinerlei Aktivität gegenüber dem Modellsubstrat *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten und wurde deshalb nicht für die in diesem Projekt durchgeführten Studien zur gerichteten Evolution ausgewählt.

Grundlage für eine weiterführende biochemische Charakterisierung der Lipasen war die chromatographische Reinigung beider Enzyme mit hohen Ausbeuten.

4.1.1 BSLA und BSLB können mittels immobilisierter Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) effektiv gereinigt werden

Für die Expression der BSLA und der BSLB wurden die Konstrukte pET19lipA und pET19lipB genutzt. Diese wurden in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die korrespondierenden Proteine wurden so mit einem N-terminalen Histidin-Decamer fusioniert und die chromatographische Reinigung konnte mittels IMAC erfolgen. Durch dieses Verfahren sollte eine effizientere und zuverlässigere Reinigung der Proteine als mit der bisher durchgeführten Reinigungsmethode (EGGERT *et al.*, 2000) gewährleistet sein.

Die Reinigung der extrazellulären BSLA nach der Expression des *lipA*-Gens im homologen Wirt wurde 1993 erstmals von LESUISSE *et al.* beschrieben und 2001 von EGGERT modifiziert. Wie bei EGGERT *et al.* (2000) erläutert, wurden die BSLA und die BSLB, aufgrund des hohen Anteils hydrophober Aminosäuren und des hohen pI-Wertes der Enzyme, mittels hydrophober Interaktions- und Kationen- Austausch-Chromatographie isoliert. Zwischen den einzelnen chromatographischen Schritten mussten die proteinhaltigen Eluate dialysiert werden, um eine Präzipitation des Proteins zu vermeiden. Die Methode war somit zeitaufwendig und aufgrund der geringen Ausbeuten an gereinigtem Protein (Ausbeuten zwischen 1-12 %) ineffizient. Zusätzlich band die Lipase nicht immer zuverlässig an der Kationen-Austausch-Säule, was häufig zum vollständigen Verlust der Enzyme führte. Eine Erklärung dieses Problems ist möglicherweise in der starken Tendenz der beiden Lipasen zur Aggregation zu suchen. Wird die BSLA in Puffer bei Raumtemperatur gelagert, ist eine fortschreitende Aggregation der Proteine bis hin zur vollständigen Präzipitation zu beobachten. ACHARYA und RAO zeigten (2003), dass die hydrophobe Oberfläche des Enzyms zu dieser verstärkten Aggregation beiträgt. Im Gegensatz zu solchen Lipasen, die eine „Deckel“-Struktur aufweisen, liegt das stark hydrophobe, katalytische Zentrum der BSLA ständig frei (VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001).

Nach der drei Stunden dauernden Expression der Lipase-Strukturgene im heterologen Wirt *E. coli* konnte mittels SDS-PAGE-Analyse eine größere Proteinmenge an BSLA als an BSLB in den Zellrohextrakten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in den Reinigungsausbeuten wieder. Enthielten beide Rohextrakte die gleiche Menge an Gesamtproteinen, war die Ausbeute für die Reinigung der BSLB wesentlich geringer (vgl. Tab. 13). Bei weiterführenden Arbeiten im Rahmen einer Diplomarbeit konnte die Expression des *lipB*-Gens durch eine Hochzell-dichte-Fermentation deutlich gesteigert (ROSENBAUM, 2003) und die Ausbeute bei der Reinigung des korrespondierenden BSLB-Proteins mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode auf über 30 % gesteigert werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Nach der erfolgten IMAC wurden die Imidazol-haltigen Eluate durch eine Gelfiltration entsalzt. Eine Entsalzung durch Dialyse, die analog zu der Dialyse nach der nativen Reinigung der Lipasen durchgeführt wurde, resultierte in der Aggregation mit anschließender Präzipitation der Proteine.

Die Proteine wurden nach der Reinigung in einem Puffer mit einem pH-Wert von 11 gelagert. Die Lipase hatte sich in diesem hohen pH-Bereich als am stabilsten erwiesen (EGGERT *et al.*, 2000). Vermutlich führen Änderungen des pH-Wertes des umgebenden Mediums zu einer starken Veränderung der Proteinladung, was die Tendenz zur Aggregation erhöhen könnte (LESUISSE *et al.*, 1993).

Die mittels Histidin-Decamer gereinigten Lipasen zeigten bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften wie ihrer spezifischen Aktivitäten, der Michaelis-Menten-Konstanten, ihrer Substratspezifitäten und ihrer Enantioselektivitäten keine nennenswerten Unterschiede zu den nativ gereinigten Enzymen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Da durch die in dieser Arbeit beschriebene Methode nun eine effektive, sichere und schnelle Möglichkeit zur Reinigung der Lipasen mittels IMAC zur Verfügung stand, konnten 15 mg der BSLB nach der Reinigung dem „LABORATORY OF BIOPHYSICAL CHEMISTRY“ von B. DIJKSTRA der RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN, Niederlande zur Verfügung gestellt werden. Hier soll nach der enzymatischen Abspaltung des Histidin-Decamers die Kristallisierung mit anschließender Strukturauflösung des BSLB erfolgen.

4.1.2 BSLA und BSLB weisen Depolymerase-Aktivität und Protease-Aktivität auf

Plastikwerkstoffe werden aufgrund ihrer exzellenten Stoffeigenschaften bei geringen Produktionskosten für vielerlei Anwendungen eingesetzt. Wegen ihrer nahezu unbegrenzten Haltbarkeit verursachen sie jedoch verschiedene umwelttechnische Probleme. Aus diesem Grunde haben biologisch abbaubare Kunststoffe, die durch Mikroorganismen in Wasser und CO₂ um-

gewandelt werden können, ein hohes Interesse seitens der Industrie und verschiedener Forschergruppen hervorgerufen. Im Bereich der biologisch abbaubaren Kunststoffe stellen die Polyester, neben Stärke und Cellulose, die mengenmäßig wichtigste Stoffklasse dar (WITT *et al.*, 1995 und 1997). Typische Beispiele sind Poly-(D,L-Lactid) (PLA) und Poly-(butylen-succinat)/Poly-(butylen-succinat-*co*-adipat) (PBS/PBSA, Handelsname Bionolle). PLA wird seit über 10 Jahren in vielen biomedizinischen Bereichen angewendet, wie zum Beispiel in Materialien zur Knochenfixierung oder bei der Verpackung von in Kapseln dargereichten Medikamenten (LEENSLAG *et al.*, 1987; VERT, 1998). Die Stoffe PBS/PBSA haben viele potentielle Anwendungsmöglichkeiten, zum Beispiel als Nahrungsmittelbehälter oder als Faserstoff in Textilien (TEERAPHATPORNCHAI *et al.*, 2003). PLA gilt gegenüber mikrobieller Degradation als wenig zugänglich (PRANAMUDA *et al.*, 1997). Bisher konnten nur wenige PLA-degradierende Enzyme beschrieben werden (PRANAMUDA & TOKIWA, 1999; JARERAT & TOKIWA, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2001; PRANAMUDA *et al.*, 2001; HOSHINO & ISONO, 2002). Darunter befindet sich nur eine einzige Lipase (SAKAI *et al.*, 2001). 2003 wurde von AKUTSU-SHIGENO *et al.* die Klonierung und die Sequenzanalyse einer PLA-Depolymerase aus *Paenibacillus amylolyticus* beschrieben. Dieses Enzym zeigt große Ähnlichkeiten zu den Lipasen der Familien I-4 und I-5 (Klassifizierung nach ARPIGNY & JAEGER, 1999; JAEGER & EGGERT, 2002) [Tab. 25].

Neben der sequentiellen Ähnlichkeit zu BSLA und BSLB zeigte das Enzym PlaA auch vergleichbare biochemische Charakteristika (pH-, Temperaturoptima). Aufgrund des Substratspektrums von PhaA wurde das Enzym als „Lipase-Typ“ charakterisiert: Es kann neben den Polyestern auch Tributyrin und Triolein hydrolysieren. Von verschiedenen *p*-Nitrophenyl-Estern werden bevorzugt solche mit C4 und C8-Acyllketten umgesetzt.

Analog zu der von AKUTSU-SHIGENO beschriebenen Methode wurde die lipolytische Aktivität der BSLA und der BSLB gegenüber den Polyestern PLA, Bionolle 1001 (PBS) Bionolle 3001 (PBSA) und gegenüber Poly-(Hydroxybutyrat-*co*-Valerat) (PHB*co*Va) bestimmt (vgl. Abb. 10). Anschließend erfolgte der Vergleich mit der lipolytischen Aktivität des Enzyms PlaA. Es ergaben sich in den Relationen durchaus vergleichbare Ergebnisse. Da die Messwerte mit verschiedenen Enzymmengen ermittelt wurden (30 µg Enzym auf 1,65 ml Substratsuspension bei AKUTSU-SHIGENO im Vergleich zu 100 µg BSLA/BSLB in 1 ml Substratsuspension in dieser Studie), ist kein direkter Vergleich der Enzymaktivitäten möglich. In allen drei Fällen wurde PLA am schnellsten hydrolysiert. Das Enzym PlaA zeigte leichte lipolytische Aktivität gegenüber Bionolle 1001 und eine gute lipolytische Aktivität gegenüber Bionolle 3001.

Tab. 25: Vergleich der konservierten Sequenzen der PLA-Depolymerase PlaA aus *Paenibacillus amylolyticus* und der Lipasen aus den Familien I-4 und I-5 nach AKUTSO-SHIGENO *et al.*, 2003. Das Konsensus-Pentapeptid wird in fettgedruckten Buchstaben angezeigt.

| Enzym | Aminosäuresequenz | Identität [%] | Referenz |
|---|-----------------------|------------------|---|
| PlaA | HI V AHSMGGANS | | AKUTSO-SHIGENO <i>et al.</i> , 2003 |
| <u>Lipasen der Familie I-4</u> | | | |
| <i>B. pumilus</i> | DIV AHSMGG ANT | 50,3 | MÖLLER <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>B. licheniformis</i> | DIV AHSMGG ANT | 51,4 | NTHANGENI <i>et al.</i> , 2001 |
| BSLA | DIV AHSMGG ANT | 49,0 | DARTOIS <i>et al.</i> , 1992 |
| BSLB | DIV AHSMGG ANT | 44,9 | EGGERT <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Geotrichum candidum</i> | DIV AHSMGG ANT | 46,2 | VANDAMME <i>et al.</i> , 1987 |
| Konsensus-Sequenz der I-4-Lipasen | DIV AHSMGG ANT | | |
| <u>Lipasen der Familie I-5</u> | | | |
| <i>Geobacillus thermoleovorans</i> | HI I AHSQGGQTA | 20,0 | CHO <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>G. thermocatenulatus</i> | HI I AHSQGGQTA | 21,6 | SCHMIDT-DANNERT <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>G. stearothermophilus</i> L1 | HI I AHSQGGQTA | 20,5 | KIM <i>et al.</i> , 1998 |
| Konsensus-Sequenz aller hier dargestellter Enzyme | -I- AHSQGG --- | | |

Die BSLA und die BSLB zeigten gegenüber diesen beiden Substraten allenfalls eine leichte lipolytische Aktivität. Keines der Enzyme konnte das Substrat PHBcoVa hydrolysieren. Das Verhalten der Lipasen gegenüber PLA und PHBcoVa konnte in dieser Studie durch einen pH-Indikator-Test bestätigt werden (vgl. Abb. 11). Bei der Spaltung von Esterbindungen durch die Enzyme wurden Säuren freigesetzt, die den pH-Wert des umgebenden Puffers änderten und somit zu einem Umschlag des dem Puffer zugefügten pH-Indikators führten.

Ob die Substrate PLA und Bionolle durch die Enzyme BSLA und BSLB zu wasserlöslichen Monomeren oder zu wasserlöslichen Oligomeren umgesetzt werden, kann an dieser Stelle nicht festgelegt werden. Von AKUTSO-SHIGENO wird vorgeschlagen, dass nach der Umsetzung beider Substrate durch das Enzym PlaA wasserlösliche Oligomere als Produkte entstehen, da nach der Hydrolyse von PLA nur 40 % der Gesamtkonzentration an Kohlenstoff im Testansatz auf Lactat entfällt und nach dem Umsatz von Bionolle kein Succinat nachgewiesen werden kann. Die Umsetzung von PBS und PBSA durch eine Lipase aus *Chromobacterium* sp. resultierte ebenfalls in der Bildung von wasserlöslichen Oligomeren (KITAKUNI *et al.*,

2000). Auch die enzymatische Hydrolyse von PLA durch eine Cutinase führte zu einer zufälligen Fragmentierung des Substrats zu wasserlöslichen Oligomeren (IVANOVA *et al.*, 1997).

Bereits 1995 wurde die BSLA von JAEGER *et al.* auf ihre Aktivität gegenüber verschiedenen Polyestern getestet. Hier zeigte sich, dass die BSLA Poly-(4-hydroxybuttersäure) und Polycaprolacton umsetzen kann. Des Weiteren wurde ein Test auf Aktivität gegenüber PLA durchgeführt. In diesem Test, in dem das Substrat in Agar-Platten emulgiert worden war, zeigte die BSLA keine PLA-Depolymeraseaktivität. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Studien. Es ist möglich, dass in der 1995 durchgeführten Studie die eingesetzte Enzymmenge zu gering war oder das PLA in den Agar-Platten in einer dem Enzym unzugänglichen Form vorlag.

PLA wird von zwei käuflich zu erwerbenden Proteasen hydrolysiert. Daher wird Protease-Aktivität von einigen Autoren als Voraussetzung für die Umsetzung von PLA angesehen (WILLIAMS, 1981; LI *et al.*, 2002). Ein Test der BSLA und BSLB auf Protease-Aktivität durch einen einfachen Agar-Plattentest ergab, dass beide Enzyme Protease-Aktivität aufweisen (vgl. Abb. 12). Somit scheint der Zusammenhang zwischen Protease- und Depolymerase-Aktivität in Bezug auf PLA bestätigt. Zurzeit ist die Frage nach der natürlichen physiologischen Funktion der sekretierten Lipasen A und B für den Organismus *B. subtilis* noch nicht abschließend geklärt (EGGERT *et al.*, 2003). Dass beide Enzyme sowohl Depolymerase- als auch Protease-Aktivitäten aufweisen, eröffnet neue Spekulationsmöglichkeiten.

Die BSLA und die BSLB werden durch die in dieser Arbeit erzielten Versuchsergebnisse biotechnologisch noch interessanter, da beide zu den wenigen Lipasen gehören, die PLA spalten können. Die Fragen, warum das Homopolymer PLA besser gespalten wird als die Copolymere Bionolle 1001 und 3001 und welche Abbauprodukte bei der enzymatischen Umsetzung der Substrate entstehen, müssen zurzeit noch unbeantwortet bleiben. Weiterführende Studien zur Umsetzung verschiedener Polymere durch die BSLA und die BSLB mit anschließender Analyse der Reaktionsprodukte, zum Beispiel durch GC-MS, sind denkbar und vielversprechend.

4.1.3 BSLA und BSLB zeigen nach der Inkubation in ionischen Flüssigkeiten Steigerungen ihrer lipolytischen Aktivität

Verschiedene biokatalytische Prozesse müssen aufgrund der Löslichkeit von Edukten oder Produkten in polaren Umgebungen stattfinden. Es werden aber viele Enzyme durch organische Lösungsmittel inaktiviert (CHIN *et al.*, 1994; PARK & KAZLAUSKAS, 2001). Zusätzlich

sind viele organische Lösungsmittel umweltschädlich. Deshalb wird der Einsatz von ionischen Flüssigkeiten als Ersatzstoff für organische Lösungsmittel in biokatalytischen Prozessen untersucht (PARK & KAZLAUSKAS, 2003). Diese bei Raumtemperatur flüssigen Salze (WELTON, 1999) sind polar, besitzen keinen Dampfdruck und sind sehr thermostabil. In den letzten Jahren wurden viele biokatalytische Umsetzungen (Umesterungen und Estersynthesen) durch Lipasen in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten untersucht (KRAGL *et al.*, 2002). Viele der getesteten Lipasen bleiben in ionischen Flüssigkeiten enzymatisch aktiv. Häufig werden sie im Vergleich zu Umsetzungen mit organischen Lösungsmitteln in ihrer Aktivität oder in ihrer Stabilität gesteigert (LOZANO *et al.*, 2001; PERSSON & BORNSCHEUER, 2003) oder zeigen bei den jeweiligen Umsetzungen erhöhte Enantioselektivitäten (KIM *et al.*, 2001; SCHÖFER *et al.*, 2001; PARK & KAZLAUSKAS, 2001; ZHAO & MALHOTRA, 2002). Um zu überprüfen, ob die BSLA und BSLB nach der Inkubation in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten lipolytische Aktivität zeigten, wurden verdünnte Lösungen der gereinigten Enzyme für 24 h in den jeweiligen Flüssigkeiten inkubiert. In Vorversuchen war bereits sichergestellt worden, dass beide Enzyme nach der Inkubation bei Raumtempertur über 24 h in Lipase-Puffer nicht an enzymatischer Aktivität verlieren. Die Aktivität der BSLA konnte durch die Inkubation des Enzyms in den beiden ionischen Flüssigkeiten Nr. 3 und Nr. 4 extrem gesteigert werden (vgl. Tab. 14). Die BSLB zeigte nach Inkubation in der ionischen Flüssigkeit Nr. 4 gesteigerte lipolytische Aktivität, nach der Inkubation in der ionischen Flüssigkeit Nr. 3 verringerte Aktivität. Beide Enzyme verloren jedoch nach Inkubation in den gleichen ionischen Flüssigkeiten Nr. 2 und Nr. 5 ihre Aktivität vollständig. Eine strukturebiologische Erklärungsmöglichkeit liegt in der oben im Text bereits erwähnten Verteilung der zwischen der BSLA und der BSLB unterschiedlichen Aminosäuren. Diese liegen vornehmlich an der Enzymoberfläche. Es bestehen somit verschiedene Interaktionsmöglichkeiten der oberflächennahen Aminosäuren mit der umgebenden ionischen Flüssigkeit. Die gleichen ionischen Flüssigkeiten können sich auf beide Enzyme unterschiedlich auswirken. Da die Grundgerüste der Enzyme gleich sind, führen vermutlich die gleichen ionischen Flüssigkeiten zur vollständigen Denaturierung der Enzyme.

Gründe für die in Tab. 14 gezeigte Aktivierung der Lipasen nach der Inkubation in bestimmten ionischen Flüssigkeiten können zurzeit nicht angegeben werden. Möglicherweise interagieren die ionischen Flüssigkeiten mit den geladenen Gruppen der Enzyme, was zu leichten Veränderungen der Enzymstruktur führen kann oder die ionischen Flüssigkeiten führen zu der Bildung oder Zerstörung von Wasserstoff-Brückenbindungen mit aktivitätssteigernder Wirkung (KRAGL *et al.*, 2002). Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in der starken Tendenz der

Lipasen zur Aggregation (LESUISSE *et al.*, 1993; ACHARYA & RAO, 2003). Die Aktivitätssteigernde Wirkung einiger Detergenzien auf die Enzyme wurden von LESUISSE *et al.* (1993) mit der Auflösung von bestehenden Enzym-Aggregaten durch die Detergenzien erklärt. Möglicherweise zeigen die ionischen Flüssigkeiten eine ähnliche Wirkung.

Frühere Studien mit einer Lipase aus *Pseudomonas* sp. zeigten, dass der Wassergehalt im Testansatz großen Einfluss auf die lipolytische Aktivität des Enzyms in einer ionischen Flüssigkeit hatte (GODERIS *et al.*, 1986). Der Wassergehalt bei den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen lag bei ca. 20 %. Möglicherweise würden Versuche mit unterschiedlichen Wassergehalten zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen führen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die BSLA und die BSLB nach der Inkubation in bestimmten ionischen Flüssigkeiten nicht nur ihre Aktivität behalten, sondern sogar in ihrer Aktivität gesteigert werden. Ausblickend wäre eine Prüfung der Enantioselektivität der BSLA und der BSLB bei Esterhydrolysen oder Umesterungen in den aktivitätsverstärkenden ionischen Flüssigkeiten sicher hochinteressant, da solche Umsetzungen weiteres biotechnologisches Potential der Enzyme versprechen.

4.2 Evolution der BSLA

Mit Hilfe von Biokatalysatoren wie Enzymen oder Ganz-Zell-Systemen können enantiomerenreine Verbindungen für den Pharma-, Agro- und Lebensmittelsektor gewonnen werden (SYLDATK *et al.*, 2001). Der Bedarf der chemischen und pharmazeutischen Industrie an enantiomerenreinen Stoffen wächst beständig und Prognosen zufolge soll der Weltumsatz an enantiomerenrein verkauften Wirkstoffen von 7 Mrd. Dollar im Jahre 2002 auf 14,94 Mrd. Dollar im Jahre 2009 steigen (ROUHI, 2004). Trotz der in vielen wissenschaftlichen Veröffentlichungen beschriebenen, vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von umweltfreundlichen Biokatalysatoren liegt der Anteil der durch Biokatalyse hergestellten Produkte 2004 bei nur 22 %. Die Gründe für den Vorzug der traditionellen, chemischen Methoden sind vielfältig (STINSON, 2001; ROUHI, 2002; ROUHI, 2004). Enzyme sind in der Regel durch die natürliche Evolution an die Gegebenheiten des Organismus, nicht aber an die zum Teil extremen Bedingungen während der Biokatalyse angepasst. Durch den heutigen Wissensstand können die Eigenschaften bestimmter Enzyme durch die Methode der gerichteten Evolution an die gewünschten Bedingungen eines biotechnologischen Prozesses angepasst werden. Dabei folgt man dem Beispiel der natürlichen Evolution: Der Herstellung einer großen Anzahl von Genvarianten durch das Einfügen von Punktmutationen oder der Rekombination verschiedener Genvarianten mit dem anschließenden Screening des jeweiligen Genproduktes auf die zu dem

jeweiligen Lebensraum passende Eignung. Die in der Natur Jahrmillionen dauernde Evolution, der „Kampf ums Dasein“ (DARWIN, 1859) kann durch moderne molekularbiologische Methoden im Labor in kurzer Zeit durchgeführt werden (ARNOLD, 2001; HULT & BERGLUND, 2003; DALBY, 2003). In der Literatur gibt es heute viele Beispiele für die erfolgreiche Optimierung der Enantioselektivität von Enzymen (JAEGER & EGGERT, 2004; REETZ, 2004; vgl. Kap.1). Trotz der verbesserten Kenntnis von Struktur- und Funktionsbeziehungen im Zusammenhang mit der Enantioselektivität, die zum Teil auch zu der Optimierung von enantioselektiven Enzymen durch rationale Ansätze führte (CHEN-GOODSPEED *et al.*, 2001; ROTTICCI *et al.*, 2001; MUGFORD *et al.*, 2004), gibt es bisher keine allgemeingültigen Regeln für die erfolgreiche gerichtete Evolution enantioselektiver Enzyme. Die Kombination der zurzeit zur Verfügung stehenden Methoden zur *in vitro* Mutagenese erfolgt mehr zufällig und beginnt häufig mit der fehlerhaften PCR (LIEBETON *et al.*, 2000; MIYAZAKI *et al.*, 2000; BULTER *et al.*, 2003; FUNKE *et al.*, 2003; VAN LOO *et al.*, 2004). In einem vorangegangenen Projekt wurde gezeigt, dass die Methoden der gerichteten Evolution prinzipiell für die Optimierung der Enantioselektivität der BSLA geeignet sind. In der von EGGERT 2001 durchgeführten Arbeit wurde die Enantioselektivität des Enzyms bei der Hydrolyse des Substrats *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten durch epPCR über zwei Generationen von 48 % *ee* für das (1*R*,4*S*)-Enantiomer auf 70 % *ee* für das (1*R*,4*S*)-Enantiomer und auf 39 % *ee* für das (1*S*,4*R*)-Enantiomer verbessert. Es stellten sich jedoch auch Besonderheiten des Enzyms heraus, die bei dem in dieser Dissertation beschriebenen Projekt beachtet werden sollten: Die geringe Größe des Enzyms wurde zu Projektbeginn als positiv angesehen, da aufgrund des ebenfalls kompakten Sequenzraums der Umfang der durch Zufallsmutagenesen angelegten Proteinbanken überschaubar bleiben sollte. Leider zeigte das Enzym nur eine geringe Toleranz gegenüber eingebrachten Mutationen. Mit der Anzahl der Mutationen nahm auch die Zahl der inaktiven Varianten pro Generation zu. In der dritten Generation der mittels epPCR angelegten Proteinbanken zeigten sich nur wenige lipolytisch aktive BSLA-Varianten. Des Weiteren ging bei vielen Klonen die Steigerung der Enantioselektivität mit verminderter lipolytischer Aktivität und stark verringerter Temperaturstabilität einher. Insgesamt erschien nach Ende des Projektes eine weitere Verbesserung der Enantioselektivität des Enzyms durch verschiedene Generationen sukzessiver Zufallsmutagenesen als unwahrscheinlich (EGGERT, 2001; FUNKE *et al.*, 2003).

4.2.1 Erstellung einer vollständigen BSLA-Sättigungsmutagenese-Bank

Bei der gerichteten Evolution ist die Auswahl einer günstigen Start-Methode zur Erlangung genetischer Diversität von großer Bedeutung, will man mit möglichst minimalem Screening-Aufwand maximale Ergebnisse erzielen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine vollständige Sättigungsmutagenese-Bank der BSLA erstellt werden. Durch PCR-vermittelte Zufallsmutagenesen sollten an jeder Position der BSLA einzeln alle möglichen natürlichen Aminosäuren eingeführt werden. Diese Vorgehensweise versprach folgende Vorteile: 1) Eine überschaubare Anzahl der zu screenenden Varianten. Da die BSLA aus 181 Aminosäuren besteht, ergeben sich bei vollständiger Sättigungsmutagenese 3439 theoretisch mögliche Varianten mit je einem Aminosäureaustausch. Diese Zahl erhöht sich aber durch die notwendige Überabtastung. Werden pro Bank ca. 300 Varianten gescreent, sollten alle Aminosäureaustausche getestet worden sein und es ergibt sich eine theoretische Bankgröße von 54300 Varianten. 2) Einblick in Struktur-/Funktionsbeziehungen der Lipase. Verbindet man die während der Evolution durch Sättigungsmutagenese gewonnenen Erkenntnisse mit den strukturellen Grundlagen der BSLA (VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001), kann dies zur Aufklärung von Struktur-/Funktionsbeziehungen des Enzyms beitragen. Durch das Screening der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank sollte es möglich werden, Aminosäurepositionen oder Enzymdomänen, die die Enantioselektivität des Enzymes beeinflussen, mitsamt dem optimalen Austausch zu erkennen. 3) Es wurde pro Variante nur ein Aminosäureaustausch eingeführt. Dies gab Hoffnung auf eine große Menge lipolytisch aktiv bleibender BSLA-Varianten. Es wird generell angenommen, dass die meisten Mutationen den Enzymen schaden und nur wenige Mutationen die gewünschte Eigenschaft beeinflussen (ARNOLD & MOORE, 1997). Bei dem Einfügen von nur einem Aminosäureaustausch in die BSLA sollten solche Mutationen, die einen nützlichen Effekt haben nicht durch solche, die keinen oder sogar einen schädlichen Effekt haben, „verdeckt“ werden. 4) Im Gegensatz zu mittels epPCR hergestellten Proteinbanken wurden wirklich alle Aminosäuren an die entsprechenden Positionen eingeführt. Bei der fehlerhaften PCR können, aufgrund der Degeneration des genetischen Codes, nicht für alle Aminosäuren codierende Triplets an eine entsprechende Position eingeführt werden, da zur Erlangung vieler Aminosäuren zwei oder sogar drei direkt benachbarte Basen zeitgleich ausgetauscht werden müssten. Tatsächlich reduziert sich der Anteil der ausgetauschten Aminosäuren weiter, weil bei der epPCR mehr Transitionen als Transversionen, bedingt durch die Verwendung einer *Taq*-Polymerase, auftreten. Diese Mängel der epPCR können schlecht durch Erhöhung der Fehlerrate ausgeglichen werden. Eine solche Erhöhung würde sich negativ auf die Menge der zu screenenden Varianten auswirken, die schnell unüberschaubar würde

(MIYAZAKI & ARNOLD, 1999; LIEBETON, 1999; EGGERT *et al.*, 2004) 5) Eine vollständige Sättigungsmutagenese-Bank kann als Ausgangspunkt für eine Reihe von Screening-Anwendungen unabhängig von Substrat- oder Enzymeigenschaft genutzt werden. In dieser Arbeit lag der Screening-Schwerpunkt auf dem Substrat *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten, die Sättigungsmutagenese-Bank wurde jedoch auch auf verbesserte Enantioselektivität gegenüber einem weiteren Substrat mit Erfolg getestet und zeigt damit universelle Anwendbarkeit.

Für die Erstellung sämtlicher Sättigungsmutagenese-Banken wurde die „Megaprimer“-Methode nach BARETTINO *et al.* (1994) erfolgreich abgewandelt (vgl. Abb. 13). Durch die bei BARETTINO *et al.* in der PCR eingesetzten Oligonukleotide ist es nötig, die in der ersten PCR gewonnenen Megaprimer durch Agarose-Gel-Elektrophorese zu isolieren und zu reinigen. Dieser Vorgang wäre bei Sättigungsmutagenesen für 181 Aminosäuren sehr zeitaufwendig und wurde durch die geschickte Auswahl der universellen Oligonukleotide unnötig. Für die Mutagenesebanken der Aminosäuren 1-5 und 178-181 konnte das Prinzip der Megaprimer-PCR nicht eingehalten werden, da der Abstand zwischen den universellen Oligonukleotiden und der zu mutagenisierenden Position sehr gering war. Das Problem wurde durch die Verlängerung eines der universellen Oligonukleotide bis hin zu der zu mutagenisierenden Position gelöst. Für alle Sättigungsmutagenese-Banken wurden Mutagenese-Oligonukleotide eingesetzt, die an der zu mutagenisierenden Stelle das Zufallscodon NNS enthielten (N = alle Basen sind möglich, S = Guanosin (G) oder Cytosin (C)). Diese entstehen durch die zufällige Kombination der während der Synthese in äquimolaren Konzentrationen vorliegenden Phosphoramidit-Nucleoside. Ein Nachteil dieser Methode ist möglicherweise eine gewisse Präferenz für die originalen Nukleotide des untersuchten Triplets. Die Oligonukleotide, deren Basen keine Watson-Crick Basenpaarungen mit dem ursprünglichen Codon ausbilden, weisen eine geringere Hybridisierungseffizienz auf (AIRAKSINEN & HOVI, 1998). Bei ausreichender Überabtastung sollten dennoch alle vorkommenden Aminosäureaustausche überprüft werden können. Da für die ersten beiden Basenpositionen alle Basen, für die dritte Position nur der Gebrauch der Basen Cytosin und Guanosin (G) zugelassen wurde, halbierte sich die Zahl der theoretisch möglichen Codons von 64 auf 32. Somit mussten weniger Klone überprüft werden, um alle 20 Aminosäuren pro Position zu testen (Tab. 26). Betrachtet man Tab. 26, wird die Wichtigkeit einer gründlichen Überabtastung deutlich. Manche Aminosäuren, zum Beispiel Leu, wird von mehr als einem Basentriplett codiert, während andere (Ile) nur durch ein Basentriplett codiert werden. Eine gründliche Überabtastung erhöht die Chancen, alle Aminosäuren mindestens einmal zu testen.

Tab. 26: Der universelle genetische Code. Gelb unterlegte Codons können durch das Zufallscodon NNS (N = T, A, G, C; S = G oder C) gebildet werden. Somit halbiert sich die Menge der nach der Expression zu screenenden Proteinvarianten.

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|
| UUU | Phe | UCU | Ser | UAU | Tyr | UGU | Cys |
| UUC | Phe | UCC | Ser | UAC | Tyr | UGC | Cys |
| UUA | Leu | UCA | Ser | UAA | Stop | UGA | Stop |
| UUG | Leu | UCG | Ser | UAG | Stop | UGG | Trp |
| CUU | Leu | CCU | Pro | CAU | His | CGU | Arg |
| CUC | Leu | CCC | Pro | CAC | His | CGC | Arg |
| CUA | Leu | CCA | Pro | CAA | Gln | CGA | Arg |
| CUG | Leu | CCG | Pro | CAG | Gln | CGG | Arg |
| AUU | Ile | ACU | Thr | AAU | Asn | AGU | Ser |
| AUC | Ile | ACC | Thr | AAC | Asn | AGC | Ser |
| AUA | Ile | ACA | Thr | AAA | Lys | AGA | Arg |
| AUG | Met | ACG | Thr | AAG | Lys | AGG | Arg |
| GUU | Val | GCU | Ala | GAU | Asp | GGU | Gly |
| GUC | Val | GCC | Ala | GAC | Asp | GGC | Gly |
| GUA | Val | GCA | Ala | GAA | Glu | GGA | Gly |
| GUG | Val | GCG | Ala | GAG | Glu | GGG | Gly |

Zur Klonierung der gewonnenen PCR-Produkte konnte auf ein bereits etabliertes Expressionssystem (EGGERT, 2001; FUNKE *et al.*, 2003) zurückgegriffen werden. Die *lipA*-Variantengene wurden als Fusionen mit der für *E. coli* optimierten PelB-Signalsequenz in dem Expressionstamm *E. coli* BL21(DE3) unter der Kontrolle eines T7-Promoters exprimiert. Wie in Experimenten gezeigt, waren die korrespondierenden Proteine nach erfolgter Expression im Kulturüberstand lokalisiert. Theoretisch sollten die Proteine im Periplasma nachgewiesen werden können, da *E. coli* keinen funktionellen Transportapparat für die Sekretion von Proteinen in das umgebende Medium, wie zum Beispiel für *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (TOMASSEN *et al.*, 1992; PUGSLEY, 1993), besitzt. Ein Grund für die „Sekretion“ der Lipase in den Kulturüberstand kann derzeit nicht angegeben werden. Für die gerichtete Evolution der BSLA war dieses Phänomen aber von großem Vorteil, da nach einem einfachen Zentrifugationsschritt die in dem Kulturüberstand vorhandenen Enzyme für das Screening eingesetzt werden konnten. Dadurch war eine Verfälschung der Versuchsergebnisse durch intrazelluläre Esterasen von *E. coli* ausgeschlossen. Die vollständige Sättigungsmutagenese-Bank der BSLA wurde als Sammlung von Ligationsansätzen bei – 20 °C gelagert und steht nun dauerhaft für neue Versuche zur gerichteten Evolution zur Verfügung. Dazu muss nur die Transformation der Ligationsansätze in den Stamm *E. coli* BL21(DE3) erfolgen. Von der dauerhaften Lagerung Plasmid-haltiger Klone in Gefrierkulturen wurde abgesehen, da die

Expressionsleistung von aus Gefrierkulturen angezogenen Klonen mit der Zeit abnahm. Dazu bestand die Gefahr der Kreuzkontamination bei wiederholtem Öffnen und Schließen der zur Lagerung der Gefrierkulturen vorgesehenen Mikrotiterplatten.

Um die generelle lipolytische Aktivität aller in den Sättigungsmutagenese-Banken vorkommenden Klone zu überprüfen, wurde von jedem Ligationsansatz ein kleiner Teil in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und die Klone jeweils auf einer Tributyrin-Agar-Platte ausgestrichen. Anschließend wurde die Menge der lipolytisch aktiven Klone in Relation zu der Gesamtanzahl der auf der Platte vorkommenden Klone errechnet. Auf den Platten waren zwischen 10 % und 80 % der Klone lipolytisch aktiv (Ergebnisse nicht dargestellt). Nichtaktive Klone entstehen nicht nur durch die Inaktivierung der BSLA-Variante aufgrund eines unvorteilhaften Aminosäureaustauschs, sondern auch durch die Religation nur einfach restringierter Vektor-DNA. Sättigungsmutagenesen an den Aminosäurepositionen, die die katalytische Triade bilden, führten zu höchstens 10 % aktiven Klonen. Dies belegt die Empfindlichkeit der Enzymbereiche, die die katalytische Triade bilden. An solchen Positionen führten die meisten Aminosäureaustausche zwangsläufig zu einer Inaktivierung des Enzyms.

Eine vollständige Sättigungsmutagenese-Bank ist eine neue Methode zur Erzeugung genetischer Diversität in der gerichteten Evolution von enantioselektiven Lipasen. Der generelle Erfolg der Sättigungsmutagenese an bestimmten Aminosäurepositionen eines jeweiligen Enzyms wurde bereits in mehreren Anwendungen beschrieben (MIYAZAKI & ARNOLD, 1999; LIEBETON *et al.*, 2000; MAY *et al.*, 2000; WHITTLE & SHANKLIN, 2001). 2001 nutzten GRAY *et al.* eine vollständige Sättigungsmutagenese-Bank zur gerichteten Evolution einer thermostabilen Haloalkan-Dehalogenase. Nachdem mehrere Enzymvarianten mit verbesserten Eigenschaften identifiziert werden konnten, wurde das Enzym durch die Rekombination der identifizierten „hot-spot“-Positionen weiter verbessert. 2003 wurde von DESANTIS *et al.* ebenfalls mit der Methodik einer vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank die gerichtete Evolution einer enantioselektiven Nitrilase beschrieben. In diesem, mit *gene site saturation mutagenesis* (SHORT, 2001) durchgeführten Projekt, konnte die Enantioselektivität der Nitrilase gegenüber dem Substrat (*R*)-Cyano-3-hydroxybuttersäure mit nur einem Aminosäureaustausch von 88 % *ee* auf 99 % *ee* angehoben werden.

4.2.2 Gerichtete Evolution der BSLA zur Verbesserung der Enantioselektivität bei der Hydrolyse des Modellsubstrats *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten

Die gerichtete Evolution einer enantioselektiven BSLA wurde mit dem bereits etabliertem ESI-MS-Hochdurchsatz-Screening System am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR

KOHLFORSCHUNG (Mülheim an der Ruhr) in der Arbeitsgruppe REETZ untersucht. Das prochirale Substrat *meso* 1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten kann in dem Screening mittels ESI-MS durch die deuterierte Form (Abb. 14) ausgetauscht werden. Das Modellsubstrat *meso* 1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten wird nach der Hydrolyse durch die BSLA-Varianten in chirale Alkohole überführt. Diese sind Ausgangsstoffe für die Synthese von Prostaglandinen, wodurch die biokatalytische Gewinnung der reinen Enantiomere von wirtschaftlichem Interesse ist (THEIL *et al.*, 1991). Das Wildtypenzym zeigte eine Enantiopräferenz von 48 % *ee* für das (1*S*,4*R*)-Enantiomer.

Nachfolgend wurden alle 181 Sättigungsmutagenese-Proteinbanken auf ihre Enantioselektivität gegenüber dem Substrat geprüft. Insgesamt konnten sechs Aminosäurepositionen identifiziert werden, die die Enantioselektivität gegenüber dem Modellsubstrat beeinflussten (vgl. Abb. 15). Die Selektivität des Enzyms scheint besonders von Aminosäuren im ersten Drittel des Enzyms determiniert zu werden (Aminosäuren 18, 30, 49, 50, 60, vgl. Abb. 15). Einzige Ausnahme bildete hier die Aminosäure 124. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen von EGGERT (2001), fällt auf, dass die Aminosäurepositionen 49, 50, 60 und 124 in den durch epPCR generierten Variantenbanken ebenfalls als „hot-spot“-Positionen identifiziert werden konnten. Zusätzlich wurden weitere Positionen gefunden, die in Kombination verbesserte Proteinvarianten ergaben und die über die ganze Sequenzlänge des Enzyms verteilt waren. Die beste in diesem Screening gefundene Variante zeigte die drei Aminosäureaustausche I22T; F58L und L114P (*ee*-Wert 69 % für das (1*R*,4*S*)-Enantiomer) und hatte somit keine Austausche an den in dieser Arbeit identifizierten „hot-spot“-Positionen. Mehrere Aminosäureaustausche in Kombination können das Enzym vollständig anders beeinflussen als einzelne Mutationen. Die Variante Q60N (65 % *ee* für das (1*R*,4*S*)-Enantiomer) wurde durch Sättigungsmutagenese generiert, nachdem die Position 60 als „hot-spot“ identifiziert worden war. Die Aminosäure 18 wurde in 3 Generationen epPCR und einem Screening von insgesamt etwa 40.000 Proteinvarianten nicht als „hot-spot“ identifiziert. So wird deutlich, dass nach der Herstellung von Variantenbanken durch epPCR ein sehr großer Screening-Aufwand betrieben werden muss, sollen alle „hot-spot“-Positionen identifiziert werden (vgl. auch 1.3.1). Wahrscheinlich wäre die Position 18 bei dem Screening weiterer, mit epPCR generierter Varianten, als wichtige Determinante der Enantioselektivität gegenüber dem Modellsubstrat gefunden worden. Das belegt den Erfolg der in dieser Arbeit erstellten vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank, durch die in einem Screening einer überschaubaren Anzahl von 55.000 Varianten sicher alle wichtigen Aminosäurepositionen gefunden werden können. Die vollständige Sättigungsmutagenese-Bank sollte zunächst einen Startpunkt für die gerichtete Evolution des En-

zyms bilden. Somit kann eine weitere Evolution, in der Enzymvarianten mit mehr als einem Aminosäureaustausch gefunden werden könnten, noch erfolgen.

Nachdem die „hot-spot“-Positionen der BSLA gegenüber dem Modells substrat identifiziert worden waren, sollte eine Sequenzierung der den Klonen zugrundeliegenden Plasmid-DNA erfolgen. Dabei stellte sich heraus, dass die vor dem Screening der Varianten angelegten Gefrierkulturen, aus denen die DNA isoliert werden musste, durch häufiges Antauen der Kulturen mit mehrfachem Öffnen und Schließen der Deckelmatten, miteinander vermischt worden waren. Eine Sequenzierung der bereits als enantioselektiv identifizierten Klone wurde somit unmöglich. Daher wurden die Sättigungsmutagenese-Banken an den Aminosäurepositionen, die als „hot-spot“-Positionen identifiziert worden waren, neu angelegt und auch neu vermessen. Dem Screening der einzelnen Varianten ging ein Vorscreening auf Tributyrin-Agar-Platten voraus, durch welches lipolytisch nicht aktive Varianten aussortiert wurden. Die in Abb. 16 gezeigten Screening-Ergebnisse belegen deutlich den Einfluss der Aminosäureposition 18 auf die Enantioselektivität des Enzyms bei der Hydrolyse des Substrats, da ein großer Teil der vermessenen Varianten eine umgekehrte Enantioselektivität zeigte. Ein weiterer großer Teil der Varianten zeigte die Enantioselektivität des Wildtyps. Die häufige Identifizierung des Wildtyps beruht vermutlich auf dem Vorscreening auf Tributyrin-Agar-Platten, das die Auswahl von Wildtyp-Klonen forciert. Wie sich in späteren Tests herausstellte, zeigten Klone, die den BSLA-Wildtyp auf einem Plasmid trugen, eine deutlich frühere Klärhofbildung als Klone, die BSLA-Variantenproteine auf einem Plasmid enthielten. Daher wurden in späteren Versuchen solche Kolonien von den Tributyrin-Agar-Platten für das Screening ausgewählt, die eine spätere und geringere Klärhofbildung aufwiesen.

Die Varianten mit Aminosäureaustauschen an den Positionen 30, 50, 60 und 124 zeigten nur moderate Veränderungen der Enantioselektivität bei der Hydrolyse des Modells substrats (maximaler *ee*-Wert: 65 % für das (1*R*,4*S*)-Enantiomer). Bei Varianten mit Austausch an den Positionen 18 und 49 ergeben sich Umkehrungen des *ee*-Wertes (vgl. Tab. 15). Dabei ist anzumerken, dass der Kulturüberstand mit der Variante Y49I nur einen denkbar geringen Umsatz des Modells substrats zeigte. Dass diese Proteinvariante nach der Expression nicht durch SDS-PAGE-Analyse nachgewiesen werden konnte, deutet auf mangelnde Expression des Proteins oder auf Degradation des eventuell fehlgefalteten Proteins durch Proteasen hin. Diese Variante wurde daher von weiteren biochemischen Charakterisierungen ausgenommen. Würde man diese Variante näher untersuchen wollen, würde sich ein Austausch des für die Aminosäure 49Ile codierenden Basentriplets empfehlen, da dies möglicherweise zu einer verbesserten Expression führen könnte.

Betrachtet man die ausgetauschten Basen der einzelnen Varianten näher (vgl. Tab. 15) stellt man den klaren Vorteil der Sättigungsmutagenese fest. Alle Aminosäureaustausche beruhen auf mehr als einem Basenaustausch. Die Chance, alle diese Varianten mit der epPCR entdecken zu können, wäre verschwindend gering gewesen.

Die Aminosäureposition 18 liegt an exponierter Position in einer Aminosäure-Schleife (vgl. Abb. 15). Interaktionen zwischen dieser Aminosäure und dem Substrat sind wahrscheinlich und wurden bereits von VAN POUDEROYEN *et al.* (2001) vorgeschlagen. Da zurzeit noch keine Struktur der BSLA mit dem gebundenen Modells substrat oder einem Phosphonsäure-Inhibitor existiert, kann an dieser Stelle noch keine strukturelle Erklärung erfolgen. Es sind mehrere theoretische Modelle des Enzym-Substrat-Komplexes möglich, so dass keine befriedigenden Erklärungen für die Versuchsergebnisse gegeben werden können. Da das Modells substrat nicht vollständig starr ist, sondern eine gewisse rotatorische Freiheit besitzt, würde ein theoretisches Modell sehr ungenau werden (VAN POUDEROYEN, persönl. Mitteilung). Aufgrund der bei den am höchsten selektiven Varianten (N18S, N18Q) gegen Asn18 ausgetauschten Aminosäuren lassen sich ebenfalls kaum Vermutungen über die Gründe der veränderten Enantioselektivität anstellen. Die polare, ungeladene Asn-Aminosäureseitenkette wurde in den Fällen mit der größten Enantioselektivität gegen die ebenfalls polaren und ungeladenen Aminosäuren Gln oder Ser ausgetauscht. Neben dem Austausch N18C wurde das Asn in den weiteren Varianten mit umgekehrter Enantioselektivität gegen Aminosäuren mit unpolaren, aliphatischen Seitenketten ausgetauscht.

Betrachtet man die Beispiele der gerichteten Evolution anderer enantioselektiver Lipasen, gibt es Unterschiede der strukturellen Erklärung der Enantioselektivität. Daher kann eine allgemeingültige Regel, mit deren Hilfe man die strukturelle Bedeutung der Aminosäure 18 der BSLA erklären könnte, nicht abgeleitet werden. Bei einer Lipase aus *Burkholderia cepecia* verhinderte der Austausch einer Aminosäure mit einer großen Seitenkette gegen eine Aminosäure mit einer kleinen Seitenkette sterische Behinderungen eines Enantiomeres von Ethyl-3-phenylbutyrat (KOGA *et al.*, 2003). Bei der gerichteten Evolution einer enantioselektiveren Esterase aus *P. fluorescens* gegenüber den Substraten Methyl-(S)-3-bromo-2-methylpropanoat oder Ethyl-(R)-phenylbutyrat wurden insgesamt sechs Aminosäuren identifiziert, die allesamt an der Enzymoberfläche lagen und deren Austausch die Enantioselektivität des Enzyms beeinflusste. Über die Gründe dieser Veränderungen konnte nur spekuliert werden. Vermutlich wurde die Substratbindestelle indirekt verändert. Das am besten untersuchte Beispiel ist die erfolgreiche gerichtete Evolution der Lipase A aus *P. aeruginosa* (REETZ *et al.*, 1997;

LIEBETON *et al.*, 2000; ZHA *et al.*, 2001). Die *in vitro* durchgeführten Studien wurden durch die Anwendung eines Molecular Modelling-Ansatzes rationalisiert (BOCOLA *et al.*, 2004). Die Umsetzung des bevorzugten Esters wurde durch eine neue Geometrie der Bindetasche und durch Stabilisierung des Oxyanions gefördert.

In vielen wissenschaftlichen Veröffentlichungen zur gerichteten Evolution wird beschrieben, dass vor allem Aminosäuren, die an der Oberfläche des Enzyms liegen, verschiedene Enzymeigenschaften, unter anderem auch die Enantioselektivität, beeinflussen („remote effects“) (LIEBETON *et al.*, REETZ *et al.*, 2001; ZHA *et al.*, 2001; MAY *et al.*, 2000; RAJAGOPALAN *et al.*, 2002; HORSMAN *et al.*, 2003). Die in dem Screening auf verbesserte Enantioselektivität bei der Hydrolyse des Modellsubstrats *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten identifizierten „hot-spot“-Positionen an den Aminosäurepositionen 30, 49, 50, 60 und 124 liegen alle auf der Oberfläche der BSLA. Für diese Positionen lassen sich keine Interaktionsmöglichkeiten mit dem weit entfernten katalytischen Zentrum oder der Substratbindetasche ableiten. So zeigt sich das Potential der gerichteten Evolution, da in einem rationalen Ansatz zur Optimierung der BSLA diese Positionen sicher unberücksichtigt bleiben würden. Das Zusammenspiel von Struktur-/Funktionsbeziehungen im Bezug auf Enantioselektivität ist noch weitestgehend unverstanden (HORSMAN *et al.*, 2003).

Bei der Charakterisierung der enantioselektiveren Lipasevarianten stellte sich heraus, dass die lipolytische Aktivität der Kulturüberstände mit den Variantenenzymen generell verringert war. Dabei bedeutete ein Absinken der Aktivität gegenüber einem Substrat nicht zwangsläufig das Absinken der Aktivität gegenüber einem anderen Substrat (vgl. Abb. 17 und Tab. 16). Jede Variante kann durch den Aminosäureaustausch eine veränderte Substratbindetasche oder veränderte Wechselwirkungen bei der Katalyse aufweisen. Die Aktivitäten der Varianten N18A, N18L, N18I und N18C in den Kulturüberständen sanken im *p*-Nitrophenyl-Palmitat-Test auf beinahe null. Dieser Test wurde im Vergleich zu den anderen Umsetzungen nur über 15 min inkubiert.

Der Aktivitätsverlust von in ihrer Enantioselektivität veränderten Enzymen konnte auch in anderen Studien beobachtet werden (ROTTICCI *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2003).

Des Weiteren wiesen alle BSLA-Varianten mit umgekehrter Enantioselektivität im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringerte Thermostabilitäten auf (vgl. Abb. 18). Ähnliche Charakteristika verschiedener enantioselektiver BSLA-Varianten sind auch schon in vorherigen Studien beschrieben worden (EGGERT, 2001; FUNKE *et al.*, 2003). Bei diesen Studien zeigte sich eine Korrelation zwischen der Enantioselektivität der jeweiligen Variante und der Thermo-

stabilität. Diese These kann nach den für diese Arbeit durchgeführten Messungen nicht beibehalten werden, da die Variante N18Q, die neben der Variante N18S die beste Enantioselektivität bei der Hydrolyse des Modellsubstrats aufweist, unter den angelegten Bedingungen von allen getesteten enantioselektiveren Varianten mit einem Aminosäureaustausch die thermostabilste war. Betrachtet man die vorangehenden Messergebnisse von EGGERT genau, fällt auf, dass vor allem Varianten mit mehr als einem Aminosäureaustausch und mit höherer Enantioselektivität in ihrer Stabilität abfallen. Die in dieser Studie erstellten Varianten mit mehr als einem Aminosäureaustausch und veränderter Enantioselektivität zeigten alle sehr geringe Thermostabilitäten (vgl. Tab. 22). Da die thermostabile Variante der BSLA L114P; A132D; N166Y aber drei Aminosäureaustausche aufweist, kann die verringerte Thermostabilität nicht nur mit der Zahl der ausgetauschten Aminosäuren zusammenhängen. Vielmehr scheint die Veränderung der Enantioselektivität mit größeren Änderungen der Enzymstruktur einherzugehen, die das Enzym insgesamt destabilisieren.

Nach der ersten Regel der gerichteten Evolution „*you get what you screen for*“ (ARNOLD, 1996) können neben der zu optimierenden Eigenschaft des jeweiligen Enzyms auch andere Enzymeigenschaften verändert werden, da auf diesen keinerlei Selektionsdruck lastet. Bei einem so kleinen Enzym wie der BSLA scheint diese Aussage in verstärktem Maße zu gelten. Vermutlich ist dieses Protein wenig tolerant bezüglich des Einbringens von Mutationen, die größere Umstrukturierungen hervorrufen. Da ein Enzym, welches hinsichtlich einer bestimmten Eigenschaft optimiert werden soll, aber wichtige Charakteristika wie Aktivität und Stabilität beibehalten sollte, müsste im weiteren Evolutionsweg verstärkt auf diese Charakteristika geachtet werden. Daher erfolgte bei dem Versuch der weiteren Evolvierung dieses Enzyms eine Rekombination mit einer thermostabilen BSLA-Variante.

4.2.3 Die Aminosäureposition 18 ist für die Enantioselektivität der BSLA gegenüber bestimmten Substraten von Bedeutung

Um die Auswirkungen aller Aminosäureaustausche an Position 18 der BSLA zu untersuchen, wurden alle Varianten durch ortsspezifische Mutagenese konstruiert. Anschließend sollten die Selektivitäten aller 20 Varianten gegenüber verschiedenen Substraten bestimmt werden. Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte in den Expressionsvektor pET19b. Somit sollte eine spätere Aufreinigung interessanter Varianten mittels IMAC für eine weiterführende biochemische Charakterisierung und Kristallisation mit nachfolgender Strukturbestimmung leicht möglich sein. Die Klonierung der Genvarianten in den Vektor pET19b erbrachte einen weiteren großen Vorteil. Im Gegensatz zu den Lipase-Varianten in den Kulturüberständen verloren

intrazellulär exprimierte BSLA-Varianten nach der Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht an lipolytischer Aktivität. Somit konnten die Proteine in Aliquots tiefgefrorener Zellen gelagert werden, was in einer wesentlichen Vereinfachung der Versuche resultierte. Alle Klone zeigten lipolytische Aktivität auf Tributyrin-Agar-Platten (vgl. Abb. 19), obwohl die BLSA-Varianten nach der Expression der entsprechenden Gene intrazellulär vorlagen. Dies ist durch die Lyse abgestorbener Zellen zu erklären. Nach der Expression der Variantengene in dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) zeigten sich bei der SDS-PAGE-Analyse der Zellrohextrakte unterschiedliche Mengen der einzelnen Lipase-Varianten (vgl. Abb. 20), obwohl bei der Wahl der Primer für den Aminosäure 18 codierenden Bereich für die Expression in *E. coli* optimierte Codons ausgewählt worden waren. Dafür können neben unterschiedlicher Expression der Gene auch Protein-Fehlfaltungen und/oder die Degradation von fehlgefaltenen Proteinen durch Proteasen verantwortlich sein.

Alle Lipasevarianten mit einem Aminosäureaustausch an der Position 18 zeigten lipolytische Aktivität gegenüber dem Substrat *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten (vgl. Abb. 21). Dies lässt darauf schließen, dass die Aminosäureposition 18 in keinem Falle sehr starke Auswirkungen auf das generelle Faltungsmuster der BSLA haben kann. Ansonsten wäre damit zu rechnen gewesen, dass einige Aminosäureaustausche das Enzym in seiner lipolytischen Aktivität vollständig zerstören würden. Bis auf den Wildtyp zeigten alle Austausch-Varianten eine Umkehrung ihrer Enantioselektivität. Dabei ist nicht festzustellen, dass eine bestimmte Gruppe von Aminosäureresten sich besonders auf die Enantioselektivität auswirkt.

Die Enantioselektivität der Varianten mit einem Aminosäureaustausch an Position 18 gegenüber den Estern primärer Alkohole Isopropylidenglycerol-(IPG)-Butyrat und Citronellyl-Butyrat wurden in Kooperation mit dem „LABORATORY OF PHARMACEUTICAL BIOLOGY“ unter der Leitung von PROF. DR. QUAX der RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN, Niederlande, bestimmt. IPG ist ein wichtiger chiraler Baustein für die pharmazeutische Industrie, zum Beispiel für die Synthese von β -Adrenoceptor-Antagonisten (SMEETS & KIEBOOM, 1992). Citronellol ist ein wichtiger Duftstoff von industrieller Bedeutung. Citronellyl-Ester wurden im Rahmen des EU-Projekts für die Firma SYMRISE, Holzminden untersucht, für die die biotechnologische Darstellung des enantiomerenreinen Alkohols äußerst interessant wäre.

Durch die Selektion von auf Phagen exponierter BSLA-Varianten mittels eines enantiomerenreinen IPG-Phosphonat-Inhibitors (DRÖGE *et al.*, 2003a) konnte durch DRÖGE (unveröffentlicht) die BSLA-Variante N18I identifiziert werden, die im Vergleich zum Wildtyp eine umgekehrte Enantiopräferenz (für das (*S*)-Enantiomer) aufwies. Diese Variante

zeigte bei der biochemischen Charakterisierung eine erniedrigte Wechselzahl für das (*R*)-Enantiomer und eine erniedrigte Michaelis-Menten-Konstante gegenüber dem (*S*)-Enantiomer des IPG-Esters. In den für diese Dissertation durchgeführten Bestimmung der Enantioselektivität der BSLA-Varianten wurden neben der Variante N18I auch weitere Varianten mit umgekehrter Enantiopräferenz für IPG-Butyrat gefunden (vgl. Tab. 17). Des Weiteren besitzt die Variante N18Q eine leicht erhöhte Enantioselektivität für das (*R*)-Enantiomer des Substrates. Insgesamt ist die Enantioselektivität der BSLA und der Varianten gegenüber IPG-Butyrat als sehr gering zu betrachten. Dies kann daran liegen, dass das chirale C-Atom des Substrates relativ weit außerhalb des katalytisch aktiven Zentrums liegt und die Enantiomeren stereochemisch nicht hochgradig unterschiedlich sind. Durch Studien von Kristallstrukturen der BSLA mit gebundenen (*R*)- und (*S*)-IPG-Phosphonat-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass beide Enantiomeren gleich gut in die Substratbindetasche des Enzyms passen und das Protein keine spezifischen Wechselwirkungen mit den Inhibitoren eingeht, welche die Enantioselektivität bei der Umsetzung beeinflussen könnten (DRÖGE *et al.*, unveröffentlicht). Die Varianten N18S und N18R zeigten keinerlei Aktivität gegenüber IPG-Butyrat. Eine Erklärung hierfür gibt es zurzeit nicht, da beide Varianten gegenüber anderen getesteten Substraten aktiv waren.

In einem fortlaufenden Kooperations-Projekt soll die vollständige Sättigungsmutagenese-Bank an der RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN auf Phagen exponiert und mittels des Selektionssystems auf veränderte Enantioselektivität gegenüber IPG-Estern selektiert werden.

Die BSLA-Varianten zeigten keine Veränderung ihrer Enantiopräferenz gegenüber dem Substrat Citronellyl-Butyrat. Die Enantioselektivität von Lipasen gegenüber primären Alkoholen gilt generell als gering (THEIL, 1997). Möglicherweise sind jedoch andere Aminosäuren als die an der Position 18 für die Enantioselektivität gegenüber Estern von Citronellol verantwortlich. Daher wurden in einer Kooperation mit dem „LABORATOIRE DE LIPOLYSE ENZYMATIQUE unter der Leitung von DR. VERGER vom CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS), Marseille, Frankreich, 1000 lipolytisch aktive Varianten der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank auf veränderte Enantioselektivität gegenüber mit α -Eleostearat verestertem Citronellol (siehe Abb. 32) überprüft. Da das Testverfahren (PENCREAC'H *et al.*, 2002) bisher noch nicht für das Hochdurchsatz-Verfahren optimiert worden war, können noch keine konkreten Angaben über die Enantioselektivität der einzelnen Varianten gemacht werden. Offensichtlich befand sich unter den getesteten Varianten keine mit auffälligen Änderungen der Enantiopräferenz.

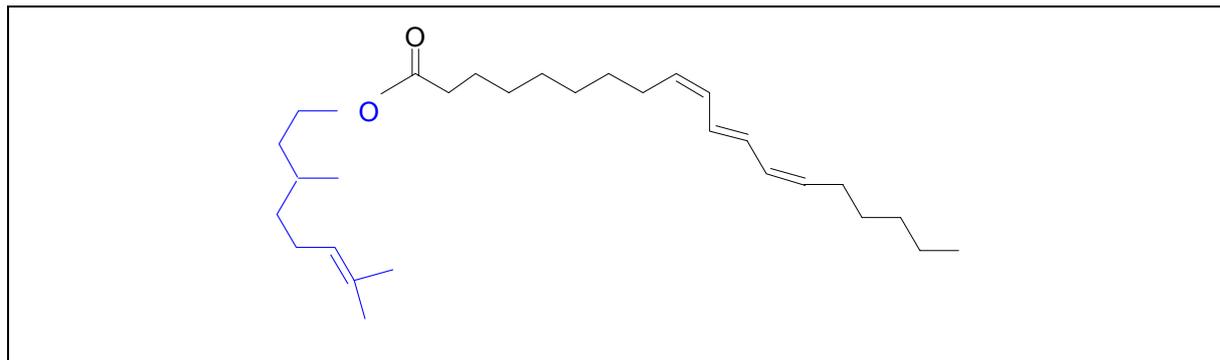


Abb. 32 Strukturformel des Esters von Citronellol (in blau dargestellt) und α -Eleostearat (in schwarz dargestellt).

Die Enantiopräferenzen der BSLA-Varianten mit einem Aminosäureaustausch an der Position 18 gegenüber den Estern zweier sekundärer Alkohole, *rac*-1-(2-Naphthyl)ethylacetat (NEA) und *rac*-1-Phenylethylacetat (PEA), und gegenüber einem Diol, *rac-trans*-1,2-Cyclohexandiol-bis-acetat, änderten sich nicht. Dies zeigte entweder, dass eine Änderung der Enantiopräferenz der BSLA gegenüber dem jeweiligen Substrat nicht möglich war, oder dass eine andere Aminosäure als die an der Position 18 für eine Änderung der Substratspezifität ausgetauscht werden müsste. Letzteres bestätigte sich in dem später durchgeführten Screening der vollständigen BSLA-Sättigungsmutagenese-Variantenbank auf veränderte Enantioselektivität gegenüber dem Substrat NEA. Die Enantioselektivität wird somit substratabhängig durch die Änderung unterschiedlicher Aminosäuren beeinflusst. Dies demonstriert die Schwierigkeiten bei der rationalen Vorhersage der Enantioselektivität auf der Basis der Enzymstruktur.

4.2.4 Screening der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank auf die veränderte Enantiopräferenz gegenüber dem Substrat 1-(2-Naphthyl)ethylacetat (NEA)

In einem neuen Ansatz sollten alle BSLA-Varianten der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank auf eine Veränderung der Enantiopräferenz gegenüber dem Substrat NEA getestet werden, einem Ester eines sekundären Alkohols. Sowohl der BSLA-Wildtyp als auch die Varianten mit den Aminosäureaustauschen an der Position 18 zeigten in allen für diese Arbeit untersuchten Umsetzungen ausschließlich lipolytische Aktivität gegenüber dem (*R*)-Enantiomer des Substrats. Aufgrund dieses Verhaltens sollte zunächst ein System zur *in vivo* Selektion etabliert werden. Da der Stamm *E. coli* BL21(DE3) in Minimal-Medium Acetat als einzige Kohlenstoff-Quelle nutzen kann (Ergebnisse nicht dargestellt), sollten *lipA*-Varianten exprimierende Klone in Minimal-Medium mit (*S*)-enantiomerenreinem NEA angezogen werden. Nur solche Klone, dessen BSLA-Varianten das Substrat hydrolysieren konnten, sollten das freiwerdende Acetat als C-Quelle nutzen können und Wachstum zeigen. Leider erwies sich das bei der Hydrolyse des Substrats freiwerdende Naphthylethanol als toxisch für die *E. coli*-Zellen. Daher wurden die *lipA*-Varianten exprimierenden Klone auf die lipolytische Aktivität gegenüber dem (*S*)-Enantiomer des Substrats durch die beschriebenen Agar-Platten-Tests überprüft. Klone mit dem BSLA-Wildtyp und den Varianten mit einem Aminosäureaustausch an der Position 18 zeigten auf den enantiomerenreinen (*S*)-NEA-Agar-Platten keinerlei Hofbildung. Insgesamt wurden ca. 21.000 Klone, welche die BSLA-Varianten auf einem Plasmid trugen, auf den (*S*)-NEA-Agar-Platten auf ihre lipolytische Aktivität überprüft. Dies entspricht ungefähr einer dreifachen Überabtastung des Sequenzraums. Zur Kontrolle wurden auch einige Klone auf (*R*)-NEA-Agar-Platten ausgestrichen. Hier zeigten ungefähr 2/3 der Klone lipolytische Aktivität. Auf den (*S*)-Enantiomer-haltigen Platten zeigten nur wenige Klone lipolytische Aktivität. Die Ergebnisse der Sequenzierung der zugrundeliegenden Plasmid-DNA sind in Tab. 18 gezeigt. Probleme ergaben sich bei der Expression dieser Varianten in dem etablierten *E. coli*-System. Die Variantenproteine sollten wie der BSLA-Wildtyp nach der Expression in den Kulturüberstand gelangen. Wie in den Ergebnissen gezeigt, erfolgten weder der Transport der Variantenproteine in den Kulturüberstand, noch erfolgte die Sekretion in das Periplasma. Die Variante NEA3 konnte im Cytoplasma der Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 23). Es ist zu vermuten, dass die Variante NEA2 ebenfalls in einer geringeren Menge im Cytoplasma vorkommt, da in dieser Fraktion lipolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Da die Zellfraktionen mit der Variante NEA 4 keinerlei Aktivität in den Umsetzungen aufwiesen, ist zu vermuten, dass eine Expression des Proteins in dem gewählten *E. coli*-System nicht möglich ist. Möglicherweise kommt es bei der starken

Expression des zugrundeliegenden Gens durch das T7-Expressionssystem unter induzierten Bedingungen zu Fehlfaltungen und anschließend zur Degradation des Proteins durch in *E. coli* vorkommende Proteasen. Das T7-Expressionssystem ist dafür bekannt, dass es unter nicht-induzierten Bedingungen nur unvollständig reprimiert ist (TABOR, 1997). Daher ist zu erklären, warum der entsprechende Klon NEA4 unter nicht-induzierten Bedingungen auf der (S)-NEA-Agar-Platte lipolytische Aktivität zeigte, unter induzierenden Expressionsbedingungen aber keine Expression des Gens und keine Aktivität des Proteins in der Zellfraktion nachgewiesen werden konnte. Da die Varianten NEA3 und NEA4 den gleichen Aminosäureaustausch beinhalten, dieser aber auf DNA-Ebene durch unterschiedliche Basen codiert wird, stellt sich die Frage, ob es wirklich ein Vorteil ist, bei dem Anlegen einer Sättigungsmutagenese-Bank nur eine verringerte Anzahl von möglichen Codons zuzulassen (vgl. 3.2.2 und DESANTIS *et al.*, 2003; HUGHES *et al.*, 2003). In dem für diese Arbeit gewählten Ansatz zur Erstellung der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank wurden auf DNA-Ebene nur 32 der 64 möglichen Codons für das spätere Einbringen sämtlicher Aminosäuren in das Protein zugelassen. DESANTIS *et al.* (2003) verfolgten eine ähnliche Strategie, während in der von HUGHES *et al.* (2003) veröffentlichten Methode sogar nur 20 optimierte Codons vorgesehen sind. Durch das Auslassen bestimmter Codons wird zwar der Aufwand im Screening der Enzymvarianten verringert, es kann aber nicht immer sichergestellt werden, dass die zugelassenen Codons eine reibungslose Expression des Proteins mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch gewährleisten.

Für die Umsetzungen zur Bestimmung der Enantioselektivität der einzelnen Varianten gegenüber dem racemischen Substrat NEA durch chirale GC wurden Zellrohextrakte eingesetzt, da sich in den Kulturüberständen keinerlei lipolytische Aktivität abzeichnete. Die Variante NEA 2 setzte neben dem (*R*)-Enantiomer von NEA auch das (*S*)-Enantiomer um, während die Variante NEA 3 das (*S*)-Enantiomer des Substrats bevorzugte. Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich auch bei der Umsetzung von PEA. Gegenüber dem Substrat Menthylacetat (MA) zeigte das Wildtyp-Enzym nur eine geringe lipolytische Aktivität. Das Substrat wurde von keiner der Varianten umgesetzt. Diese zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine sehr geringe Aktivität. Die Umsätze in den Tests lagen bei nur 10-15 %, was auch die generell geringen *E*-Werte und die nicht vorhandene Aktivität gegenüber MA erklären kann.

Zeitgleich zu den für diese Dissertation durchgeführten Versuche wurde von N. OTTE vom Arbeitskreis THEORETISCHE CHEMIE von PROF. DR. THIEL am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR KOHLENFORSCHUNG, Mülheim a.d. Ruhr, der erste Schritt der Alkylierungs-Reaktion der BSLA mit dem Substrat NEA durch eine QM/MM-Kalkulation berechnet. Bei diesem

ersten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff des Sauerstoff-Atoms der Seitenkette des katalytisch aktiven Serins auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Substrats und es entsteht das tetraedrische Intermediat. Es wurde eine Übergangs-Struktur errechnet, die den Michaelis-Menten-Komplex und das tetraedrische Intermediat verbindet (Abb. 33). Nach der Spezifizierung der Energie-Barriere für diese Reaktion konnte der Einfluss von in das Enzym eingebrachten Mutationen auf die Reaktions-Barriere errechnet werden. Somit konnte *in silico* ein „Alanin-Scan“ (MORRISON & WEISS, 2001) durchgeführt werden, da davon ausgegangen wurde, dass die Reaktions-Barriere durch die Elektrostatik der Umgebung bestimmt wird. Bei einem *in vitro* Alanin-Scan wird jede Aminosäure eines Enzyms einzeln gegen ein Alanin ausgetauscht. Somit kann die Auswirkung jeder Aminosäure-Seitenkette auf eine bestimmte Eigenschaft eines Enzyms ermittelt werden. Bei dem „*in silico* Alanin-Scan“ wurde ermittelt, dass die Aminosäure His76 als „hot-spot“ für die Aktivität und Enantioselektivität des Enzyms gegenüber NEA anzusehen ist.

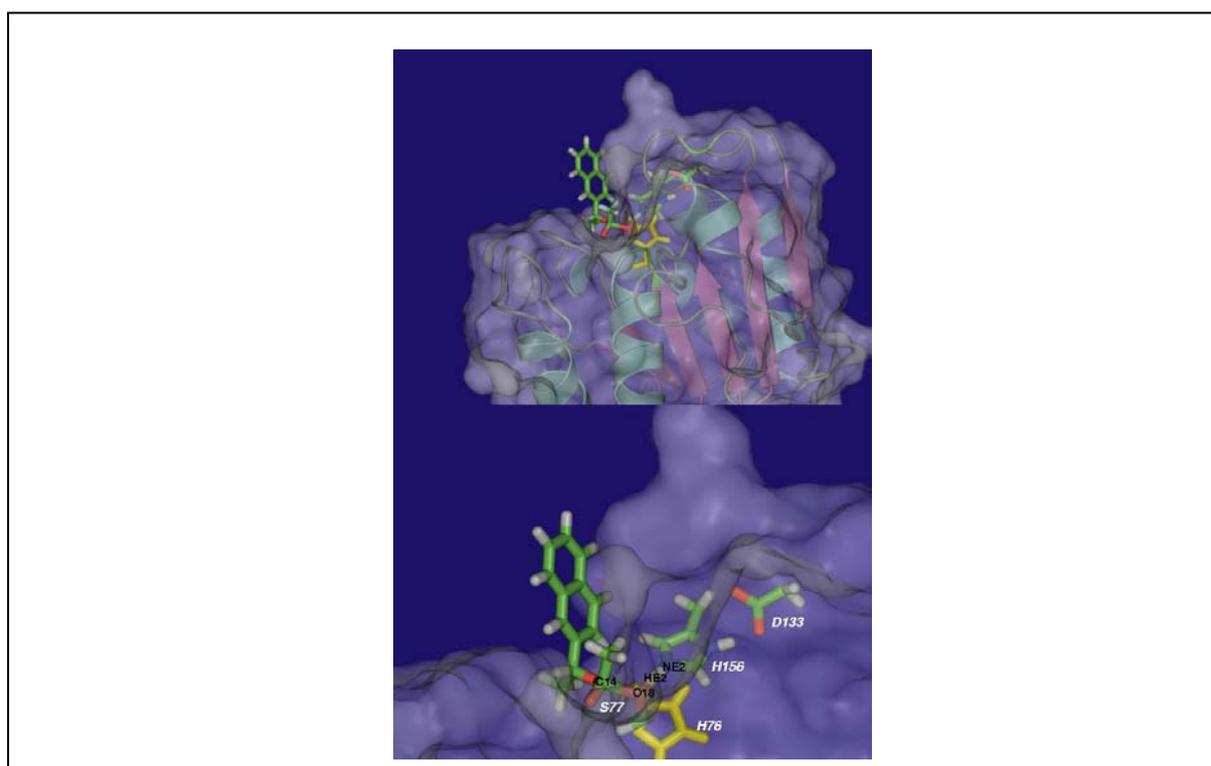


Abb. 33: Mit dem Programm „Pymol“ modelliertes Enzymmodell der BSLA mit dem (*R*)-Enantiomer von 1-(2-Naphthyl)ethylacetat. Es sind die katalytisch aktiven Aminosäuren Ser77, Asp133 und His156 und das His76 hervorgehoben. Das Ser77 und das Substrat formen das tetraedrische Intermediat.

Dafür gibt es drei mögliche Erklärungsansätze: Das His an der Position 76 kann eine Wasserstoff-Brücke zu dem katalytisch aktiven His 156 der katalytischen Triade bilden. Diese fällt bei einem Austausch des His76 weg. Aufgrund von Modelling-Studien mit dem (*S*)-Enantiomer von NEA konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Wasserstoffbrücke nicht die

Enantioselektivität des Enzyms bestimmt. Das Wegfallen der Wasserstoffbrücke in den His76-Austausch-Varianten kann jedoch möglicherweise sowohl die stark verringerte Aktivität der Varianten-Enzyme als auch die Probleme bei der Expression erklären, nach der es möglicherweise zu Fehlfaltungen des Enzyms kommt. Erklärungsgründe für die veränderte Enantiopräferenz der Enzyme liegen eventuell in der Art der ausgetauschten Aminosäure-Seitenketten. Das His ist größer als die eingefügten Aminosäuren Ala oder Leu. Des Weiteren ist das His im Gegensatz zu den beiden anderen Aminosäuren polar. Der Austausch zu kleineren, unpolaren Aminosäuren kann zu einer Veränderung der Substratbindetasche führen, die nun die Bindung des (*S*)-Enantiomers ermöglicht (FUNKE *et al.*, 2004).

Wie auch in der Einleitung kurz erläutert, kann das Zusammenspiel von *in silico* und *in vitro* Methoden nicht nur helfen, durch Studien zur gerichteten Evolution gewonnene Erkenntnisse zu erklären, sondern *in silico* Studien zur gerichteten Evolution können auch durch die Voraussage von „hot-spot“-Positionen, wie auch anhand der Position His 76 der BSLA gezeigt, verkürzt werden. Für diese Vorgehensweise, eine Mischung aus dem rationalen Protein-Design und der gerichteten Evolution, sind in der Literatur schon einige Beispiele gegeben (HORSMAN *et al.*, 2003; KOGA *et al.*, 2003; ACHARYA *et al.*, 2004; BOCOLA *et al.*, 2004).

Um endgültige Aussagen zu der veränderten Enantioselektivität der His76-Austausch-Varianten machen zu können, sollen in Zukunft beide chromatographisch aufgereinigt und zusammen mit dem Substrat kristallisiert und in der Struktur aufgelöst werden. Auch die Bestimmung der biochemischen Konstanten wie der Michaelis-Menten-Konstante und der spezifischen Aktivität gegenüber beiden Enantiomeren des Substrats könnten Einblicke in die Substratumsetzung durch die Varianten erlauben. Zur Reinigung der Varianten müssen aber zunächst die Schwierigkeiten bei der Expression der Varianten überwunden werden. Möglicherweise müsste nach einem passenden Expressionssystem in *E. coli* oder *B. subtilis* gesucht werden. Eventuell könnte es hilfreich sein, auf eine „low copy“-Expressionssystem zurückzugreifen oder die für die Aminosäureaustausche codierenden Basen zu verändern.

4.3 Entwicklung einer neuen Methode zur *in vitro* Rekombination

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Methoden zur *in vitro* Rekombination entwickelt (siehe auch 1.3.1). Diese haben häufig Nachteile. Dazu gehören die rekombinatorische Bevorzugung bestimmter DNA-Bereiche, Schwierigkeiten bei der Rekombination direkt benachbarter Mutationen und das Einführen von zusätzlicher Diversität durch die Einführung von Punktmutationen. Letzteres führt zu einer beträchtlichen Erhöhung des späteren Screening-

Aufwands, will man tatsächlich in einem Screening alle theoretisch möglichen, entstehenden Varianten abdecken. Bei dem ursprünglichen DNA-Shuffling-Protokoll (STEMMER, 1994a; STEMMER, 1994b) werden um die 7 neuen Punktmutationen pro kb DNA eingeführt. Diese Zahl wurde in dem Protokoll von ZHAO und ARNOLD (1997) auf 0,5 pro kb abgesenkt. Ein 1999 von KIKUCHI *et al.* eingeführtes Protokoll beschrieb den Einsatz von Restriktionsendonukleasen statt DNAsen bei der Gewinnung von DNA-Fragmenten. Dadurch wurde die Zahl der eingeführten Punktmutationen verringert, es wurden aber bestimmte DNA-Bereiche besonders häufig rekombiniert.

Bei der in dieser Arbeit entwickelten Methode zur *in vitro* Rekombination von Punktmutationen konnte mit dem zweiten Protokoll eine Fehlerrate zwischen 0,1 und 0,19 pro kb erreicht werden (vgl. Tab. 20). Somit entspricht diese neu entwickelte Methode den Ansprüchen, die von LUTZ & PATRICK, 2004 an Methoden zur *in vitro* Rekombination bestehen. Hiernach sollen die Proteinbanken nicht vor allem in der Quantität, sondern in der Qualität verbessert werden. Betrachtet man die Ergebnisse der Sequenzierung der Plasmid-DNA der unter 3.3.3 mit der neuen Methode rekombinierten Varianten, stellen sich hinsichtlich der Qualität der Banken keine Zweifel ein. Mit den Protokollen 2 und 3 erfolgte durchweg eine Rekombination mit hoher Frequenz (vgl. Tab. 20), auch von direkt benachbarten Mutationen. Allerdings traten bei der Rekombination von 11 Aminosäureaustauschen nach Protokoll 2 die Mutationen I22T und L114P gehäuft auf. In einem Test wurden daher alle 11 Mutagenese-Oligonukleotide einzeln, die für die zweite Rekombination nach Protokoll 2 synthetisiert worden waren, zusammen mit einem universellen, gegenläufigen Oligonukleotid in einer Standard-PCR eingesetzt. Bei der folgenden Analyse der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese zeigte sich die deutlichste DNA-Bande nach der PCR mit dem Oligonukleotid L114P (Ergebnisse nicht dargestellt). Somit scheint eine PCR mit diesem Oligonukleotid gegenüber den PCR mit den anderen Oligonukleotiden bevorzugt, was auch das häufige Vorkommen dieser Mutation in der Rekombination erklärt. Eine solche Bevorzugung kann in der Rekombination aber leicht durch eine verringerte Zugabe des entsprechenden Oligonukleotids ausgeglichen werden. Bei den Rekombinationen von 5 Aminosäureaustauschen nach den Protokollen 2 und 3 konnte keine Bevorzugung bestimmter Aminosäureaustausche festgestellt werden.

Ein besonderer Vorzug der neu entwickelten Methode ist die schnelle und leichte Durchführbarkeit. Erfordern andere Methoden, wie das DNA-Shuffling, einen großen Zeit- und Arbeitsaufwand, kann die neu entwickelte Methode in nur einer PCR durchgeführt werden. Die Fehlerrate der in dieser Arbeit durchgeführten Rekombination liegt bei 0,3 pro kb. Dabei ist

zu beachten, dass nur die Plasmid-DNA einer geringen Menge an Mutanten sequenziert wurde. Die neuentwickelte Methode zur *in vitro* Rekombination wurde als *Multiplex-PCR-based recombination* (MUPREC) bezeichnet.

4.3.1 Die weitere Rekombination der in ihrer Enantioselektivität optimierten BSLA-Varianten durch die Anwendung von MUPREC

Ausgehend von den bisher identifizierten BSLA-Varianten mit umgekehrter Enantioselektivität und einem Aminosäureaustausch sollte nun eine weitere Rekombination der Varianten zu 1) einem Enzym mit noch weiter verbesserter Enantioselektivität bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten und 2) zu einem Enzym mit verbesserter Enantioselektivität bei gleichzeitig beibehaltener Thermostabilität führen. Zum Erreichen des ersten Ziels wurde eine gleichzeitige Sättigung der Enzympositionen 18 und 49 durchgeführt. Bei einem Screening von ca. 500 Varianten konnte keine Variante identifiziert werden, die einen besseren *ee*-Wert als 83 % aufwies. In diesem Screening fiel jedoch die Doppelmutante N18Q; Y49V auf, die bei einem hohen *ee*-Wert von 82 % auch eine erhöhte lipolytische Aktivität im Kulturüberstand aufzuweisen schien.

Um eine Variante mit umgekehrten *ee*-Wert und verbesserter Stabilität zu gewinnen, wurden alle BSLA-Varianten mit umgekehrter Enantioselektivität mit einer von ACHARYA *et al.* (2004) generierten BSLA-Dreifachmutante rekombiniert, die im Vergleich zum Wildtyp eine 300-fach erhöhte Thermostabilität nach der Inkubation bei 55 °C aufwies. Zu dieser Rekombination wurde die bis dahin noch nicht charakterisierte Doppelvariante N18Q; Y49V hinzugenommen, da die Einkreuzung einer mutmaßlich aktiveren Variante weiteren Erfolg versprach.

Die thermostabile BSLA-Variante zeichnet sich durch drei Aminosäureaustausche aus. Durch die Kristallisation dieser Variante mit anschließender Strukturbestimmung konnten die Auswirkungen dieser Austausche auf die Thermostabilität der Variante erklärt werden. Die drei Austausche befinden sich in verschiedenen Teilen der BSLA und führen zu sehr kleinen Veränderungen in der Enzymstruktur, so dass der Enzymkern, die zugängliche Enzymoberfläche, Ionen- und hydrophobe Bindungen weitestgehend erhalten bleiben (ACHARYA *et al.*, 2004). Wahrscheinlich aus diesem Grunde zeigten die für diese Arbeit hergestellten Einzel- und Dreifach-Varianten weder eine Veränderung der Aktivität im Kulturüberstand noch eine Veränderung der Enantioselektivität gegenüber dem Substrat *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten (vgl. Tab. 21).

Die Mutation N166Y wurde von den Autoren durch fehlerhafte PCR mit anschließendem Screening auf verbesserte Thermostabilität identifiziert und erwirkt eine zehnfache Erhöhung der Thermostabilität des Enzyms. Sie führt durch eine kleine Änderung ihrer Umgebung zu der Ausbildung einer Wasserstoff-Brückenbindung zwischen dem Hauptketten-Stickstoff der Aminosäure Ser162 und dem Carbonyl-Sauerstoff der Aminosäure Gly5. Der Aminosäureaustausch A132D etabliert eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Hauptkettenaminogruppe der Aminosäure Gly153. Der Austausch L114P führt indirekt durch eine Salzbrückenbindung der Aminosäure Asn181 mit der Aminosäureseitenkette von Lys122 zu einer besseren Verankerung des C-Terminus der BSLA mit dem Rest des Proteins (ACHARYA *et al.*, 2004).

Unter den in dieser Arbeit angelegten Bedingungen zeigte die Variante N166Y bei der Inkubation bei 55 °C eine im Gegensatz zum Wildtyp deutlich verbesserte Thermostabilität (vgl. Abb. 24), während die Varianten L114P und A132D ebenfalls eine zumindestens leicht verbesserte Thermostabilität aufwiesen. Diese erhöhte die Hoffnung, dass eine „Addition“ der Proteineigenschaften von Einzelmutanten in einer Rekombination möglich sei. Bei höheren Inkubationstemperaturen als 55 °C (vgl. Abb. 25) verliert auch die thermostabile Dreifach-Mutante ihre lipolytische Aktivität.

Nach der unter 3.3.3 und 3.3.4 beschriebenen Rekombination wurden circa 500 Klone nach einem Vorscreening auf lipolytische Aktivität, wie unter 3.3.4 beschrieben, auf verbesserte Enantioselektivität bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten bei beibehaltener Thermostabilität nach Inkubation bei 45 °C getestet. Auf den Tributyrin-Agar-Platten zeigten nur 10 % der Klone lipolytische Aktivität. Das lässt vermuten, dass viele der Rekombinanten durch eine ungünstige Vermischung der Mutationen inaktiviert wurden. Nach dem zweigeteilten Screening durch ESI-MS (vgl. Abb. 29) wurden solche Mutanten, die in dem Screening mit und ohne Hitzeinkubation die gleichen Umsätze aufwiesen und eine umgekehrte Enantioselektivität hatten, auf ihre Thermostabilität mittels *p*-Nitrophenyl-Palmitat-Test getestet (vgl. Tab. 22). Dabei zeigten alle geprüften Varianten eine im Vergleich zu den Varianten mit nur einem Aminosäureaustausch verschlechterte Thermostabilität. Dies traf auch für eine Variante zu, die neben dem Aminosäureaustausch N18Q alle Aminosäureaustausche der thermostabilen BSLA-Variante besaß. Es ist zu vermuten, dass die Aminosäureaustausche, die zu einer veränderten Enantioselektivität des Enzyms führen, tiefgreifende Änderungen in der Enzymstruktur verursachen, die dann wiederum zu verschlechterter Aktivität oder Thermostabilität führen. Es schien nicht möglich, die zwei unterschiedlichen Eigenschaften Enantioselektivität und Thermostabilität der BSLA durch Rekombination zu vermischen. Eher sollten in einem neuen Ansatz zur gerichteten Evolution

der Selektionsdruck auf beide Eigenschaften gelegt werden. Das die zeitgleiche Entwicklung mehrerer Enzymeigenschaften prinzipiell durchführbar ist, wurde bereits von den Autoren NESS *et al.* (1999); MIYAZAKI *et al.* (2000) und GLIEDER *et al.* (2002) bewiesen.

In einem neuen Ansatz zur gleichzeitigen gerichteten Evolution der Enantioselektivität und der Thermostabilität der BSLA müsste ein sinnvolles Musterungssystem entwickelt werden, da sich das in dieser Arbeit entwickelte System für das Screening beider Eigenschaften als ungeeignet erwies. Es liegt die Vermutung nahe, dass bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Screening solche Varianten, die sich durch eine gute Aktivität auszeichneten und somit einen Umsatz des Substrates von etwa 100 % erreichten, als „thermostabil“ identifiziert wurden. Da die enzymatischen Umsetzungen über eine Dauer von 24 h durchgeführt wurden, kann ein teilweise denaturiertes, aber sehr aktives Enzym den vollen Substratumsatz erreichen, während ein teilweise denaturiertes, langsames Enzym als „thermoinstabil“ aussortiert würde. Dies würde auch erklären, warum die lipolytisch aktivere Doppelvariante N18Q, Y49V gleich zweimal in dem durchgeführten Screening identifiziert wurde. Diese zeigte nach der Reinigung eine höhere spezifische Aktivität und eine höhere Wechselzahl als die Variante N18Q. Die Michaelis-Menten-Konstante der Doppelvariante war im Vergleich zum Wildtyp deutlich erniedrigt. Die Daten lassen Rückschlüsse auf den katalytischen Mechanismus der einzelnen Varianten zu. Da der k_M -Wert der Doppelvariante geringer ist, scheint diese das Substrat verbessert zu binden. Da die Wechselzahl der Variante aber geringer als die des Wildtyps ist, muss die eigentliche katalytische Umsetzung verlangsamt sein. Auch die Variante N18Q zeigt eine verringerte Wechselzahl bei fast gleichbleibendem k_M -Wert im Vergleich zum Wildtyp. Auch hier scheint eine verlangsamte Umsetzung des bereits gebundenen Substrats wahrscheinlich. Es ist denkbar, dass durch den Austausch der Aminosäuren die räumliche Anordnung der katalytischen Triade verändert wurde.

Aufgrund der biochemischen Eigenschaften der Varianten N18Q und N18Q; Y49V wäre zu erwarten, dass das Substrat *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten durch den die Doppelvariante enthaltenden Kulturüberstand zu einem weitaus höheren Prozentsatz umgesetzt wird als durch den Kulturüberstand, der die Variante N18Q enthält. Durch SDS-PAGE-Analyse zeigte sich, dass die Variante N18Q; Y49V nur so schwach exprimiert wird, dass keine Proteinbande nachgewiesen werden konnte. Dies erklärt die nur 10 % höhere Umsetzung des Substrats durch den Kulturüberstand, der die Doppelvariante enthält (vgl. Tab. 23.).

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine vollständige Sättigungsmutagenese-Bank der BSLA angelegt. In zwei Screening-Anwendungen auf veränderte Enantioselektivität gegenüber verschiedenen Substraten konnte gezeigt werden, dass ein solcher Ansatz sehr gut als Ausgangspunkt für eine gerichtete Evolution geeignet ist. In beiden Ansätzen konnten Varianten identifiziert werden, die eine veränderte Enantioselektivität gegenüber den Substraten aufwiesen. Dabei wurde deutlich, dass die identifizierten „hot-spots“-Positionen bei verschiedenen Substraten unterschiedlich sein können. In beiden Projekten zur gerichteten Evolution wurden Aminosäureaustausche identifiziert, die durch den klassischen Ansatz der fehlerhaften PCR mit nur sehr geringer Wahrscheinlichkeit oder gar nicht identifiziert worden wären. Diese Ergebnisse rechtfertigen sicher den hohen Arbeitsaufwand, der für das Anlegen einer vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank notwendig ist. Mit einer einmal angelegten Bank können verschiedene Screening-Ansätze auf unterschiedliche Enzymeigenschaften erfolgen. Zurzeit werden die Sättigungsmutagenese-Banken in einem Nachfolge-Projekt auf verbesserte Protease-Aktivität untersucht. An der REIJKSUNIVERSITÄT GRONINGEN werden die Enzymvarianten der Bank in der Arbeitsgruppe von PROF. DR. QUAX auf Phagen exponiert und auf eine verbesserte Enantioselektivität gegenüber IPG-Estern untersucht. Ein weiteres Projekt zur Untersuchung von Depolymerase-Aktivität ist zusammen mit der Firma HENKEL, Düsseldorf, geplant.

Der Erfolg des für diese Dissertation durchgeführten Projekts empfiehlt die Strategie der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank als Startpunkt für eine gerichtete Evolution auch für andere Enzyme. Zurzeit wird die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* einer solchen Prozedur unterzogen und in einem Screening auf verbesserte Aktivität in organischen Lösungsmitteln untersucht. Ein sehr interessantes Projekt wäre auch die vollständige Sättigungsmutagenese der BSLB. Screeningergebnisse bezüglich dieses Enzyms könnten direkt mit denen der BSLA verglichen werden und eventuell weitere Einblicke in Struktur-/Funktionsbeziehungen der Enzyme ermöglichen. Dabei könnte die Frage geklärt werden, warum die BSLB keinerlei lipolytische Aktivität gegenüber dem Substrat *meso*-1,4-acetoxy-2-cyclopenten aufweist.

Bei dem Neuanlegen von Sättigungsmutagenese-Banken sollte davon abgesehen werden, in den Sättigungsmutagenese-Oligonukleotiden nur bestimmte Codons zuzulassen („NNS“). Wie in den Experimenten zur Isolierung einer (*S*)-NEA spaltenden NEA-Variante gezeigt, können bestimmte ausgetauschte Codons zu Problemen bei der Expression der Variantenproteine führen. So kann es zu einem unvollständigen Screening kommen, wenn eine bestimmte Aminosäurevariante mit einem bestimmten Basentriplett nicht exprimiert

werden kann. Sind alle Basentriplets zugelassen, steigt die Chance, die entsprechende Aminosäurevariante, die eventuell auch durch ein gängigeres Basentriplett codiert wird, in einem Screening finden zu können.

Ausgehend von optimierten Enzymvarianten einer ersten Generation kann die weitere gerichtete Evolution erfolgen. Dabei kann die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur *in vitro* Evolution angewendet werden. Durch Rekombination wurde in dieser Arbeit die in ihrer Enantioselektivität gegenüber dem Modellsubstrat Substrat *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten optimierte Variante N18Q in ihrer lipolytischen Aktivität verstärkt. Die Enantioselektivität konnte in dieser Rekombination nicht weiter verbessert werden. Möglicherweise ist eine weitere Steigerung der Enantioselektivität nicht durch die „Addition“ der bisher identifizierten Varianten möglich, sondern muss durch eine Zufallsmutagenese erfolgen, die von den bisher verbesserten Varianten ausgeht.

Von besonderer Bedeutung könnte die Kristallisierung der bisher identifizierten in ihrer Enantioselektivität veränderten BSLA-Varianten sein. Mit der Variante N18Q; Y49V, die im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich gereinigt werden konnte, sind solche Studien in der Arbeitsgruppe von PROF. DR. DIJKSTRA der RIJKSUNIVERSITÄT GRONINGEN, Niederlande, geplant. Möglicherweise gibt die 3D-Struktur dieser Variante weitere Hinweise auf Struktur-/Funktionsbeziehungen bezüglich der Enantioselektivität der BSLA.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die biokatalytische Produktion enantiomerenreiner Komponenten gewinnt sowohl für die chemische als auch für die pharmazeutische Industrie immer weiter an Bedeutung. Leider ist die Enantioselektivität von Enzymen gegenüber biotechnologisch interessanten Substraten häufig zu gering. Mit Hilfe der gerichteten Evolution, das heisst mit dem Einfügen von Mutationen in das entsprechende Gen und nachfolgendem Screening der entstandenen Proteinvarianten auf eine verbesserte Eigenschaft, kann ein Enzym an eine gewünschte Reaktion angepasst werden. Die Lipasen LipA (BSLA) und LipB (BSLB) aus *B. subtilis* sind aufgrund ihrer geringen Größe, des hohen pH-Optimums und des großen Substratspektrums biotechnologisch hochinteressante Enzyme. In dieser Arbeit wurden die Enzyme nach der chromatographischen Reinigung biochemisch näher charakterisiert. Durch die Anwendung von neuen Methoden zur gerichteten Evolution wurde die BSLA in ihrer Enantioselektivität optimiert. Dabei wurden Erkenntnisse über die Struktur-/Funktionsbeziehungen der BSLA im Hinblick auf die Enantioselektivität gewonnen.

1) Chromatographische Reinigung und biochemische Charakterisierung der BSLA und der BSLB

Im ersten Teil der Arbeit wurden die BSLA und die BSLB nach ihrer chromatographischen Reinigung hinsichtlich ihrer Hydrolaseaktivität gegenüber verschiedenen industriell bedeutsamen und biologisch abbaubaren Polyestern untersucht. Dabei zeigten beide Enzyme hydrolytische Aktivität gegenüber Poly-(D,L-Lactid), einem Substrat, das, soweit bekannt, nur von wenigen Enzymen hydrolysiert werden kann. Des Weiteren konnten beide Enzyme durch die Inkubation in bestimmten ionischen Flüssigkeiten in ihrer lipolytischen Aktivität gesteigert werden. Die Versuchsergebnisse belegen das hohe biotechnologische Potential der Enzyme.

2) Gerichtete Evolution der BSLA

Im zweiten Projekt wurde, als neuer Ansatz zur gerichteten Evolution enantioselektiver Lipasen, eine komplette Sättigungsmutagenese der BSLA durchgeführt, in der jede einzelne Aminosäure der BSLA gegen sämtliche 19 natürlichen Aminosäuren ausgetauscht wurde. Dabei entstand eine Bank von 3439 Enzymvarianten. 55.000 Klone (mehr als zehnfache Überabtastung) wurden auf veränderte Enantioselektivität bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten geprüft. Dabei konnten verschiedene BSLA-Varianten identifiziert werden, die im Vergleich zum Wildtyp eine hohe umgekehrte Enantioselektivität bei der Hydrolyse des Substrats zeigten. Die Aminosäureposition 18 wurde als „hot-spot“-Position

identifiziert. Alle Aminosäureaustausche an der Position Asn18 bewirkten eine Umkehrung der Enantioselektivität bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten. Bei der biochemischen Charakterisierung zeigten die Varianten mit einem Aminosäureaustausch an der Position 18 im Vergleich zum BSLA-Wildtyp verringerte Umsätze und verringerte Thermostabilitäten. Asn 18 ist an exponierter Position in einer Aminosäure-Schleife in der Nähe der katalytischen Triade der BSLA lokalisiert und interagiert vermutlich direkt mit dem Modellsubstrat.

In einem weiteren Screening der vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank wurden Varianten entdeckt, die das (*S*)-Enantiomer von 1-(2-Naphthyl)ethylacetat hydrolysieren können, während der BSLA-Wildtyp enantioselektiv nur (*R*)- 1-(2-Naphthyl)ethylacetat mit einem *E*-Wert von über 100 spaltet. Ausschlaggebend für diese Veränderung der Enantioselektivität ist ein Aminosäureaustausch an Position 76 in unmittelbarer Nähe des katalytisch aktiven Ser77, der vermutlich zu einer Veränderung der Substratbindetasche führt.

Mit zwei Screening-Ansätzen konnten wichtige Determinanten für die Enantioselektivität der BSLA gegenüber verschiedenen Substraten bestimmt werden. Dies bestätigte die Nützlichkeit und die universelle Anwendbarkeit einer vollständigen Sättigungsmutagenese-Bank.

3) Entwicklung einer neuen Methode zur *in vitro* Rekombination (*Multiplex-PCR-based Recombination* (MUPREC))

Im dritten Teil der Arbeit wurden in ihrer Enantioselektivität verbesserte BSLA-Varianten untereinander sowie mit einer thermostabilen BSLA-Variante rekombiniert. Dazu wurde eine neue, einfache und effektive Methode zur *in vitro* Rekombination entwickelt. Mit dieser können Punktmutationen miteinander kombiniert werden, fast ohne dass zufällige Neumutationen in die entsprechenden Gene eingeführt wurden. Im Screening auf verbesserte Enantioselektivität bei der Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten konnte eine Variante mit zwei Aminosäureaustauschen (N18Q; Y49V) identifiziert werden, die den gleichen umgekehrten *ee*-Wert von 82 %, aber auch eine höhere spezifische Aktivität zeigte als die beste BSLA-Variante mit einem einzelnen Aminosäureaustausch N18Q. Die Michaelis-Menten-Konstante der Doppelmutante ist im Vergleich zu der des Wildtyps und von N18Q erniedrigt.

6 SUMMARY

The biocatalytic production of enantiomerically pure compounds is gaining more and more importance for the pharmaceutical- and chemical industry. Unfortunately the enantioselectivity of enzymes towards biotechnologically interesting substrates is often low. Using the method of directed evolution, the introduction of mutations in the target gene followed by high-throughput screening of the corresponding protein-variants, an enzyme can be optimized to the desired biocatalytic reaction. The *Bacillus subtilis* lipases LipA (BSLA) and LipB (BSLB) are of high biotechnological interest because of their small size, the highly alkaline pH-optimum and the wide range of substrate specificity. In this thesis the enzymes BSLA and BSLB were purified and biochemically characterized with special emphasis on side-activities (depolymerase- and protease-activity) and catalytic activity in ionic liquids. Furthermore, using the methods of directed evolution, the enantioselectivity of BSLA was optimized.

1) Purification and biochemical characterization of BSLA and BSLB

After purification using metal chelate affinity chromatography BSLA and BSLB were tested with respect to their hydrolytic activities towards different biologically degradable polyesters of industrial importance. Both enzymes were able to hydrolyze Poly-(D,L-lactide), a substrate which is known to be highly resistant against microbial degradation. Furthermore, the incubation in some ionic liquids increased the lipolytic activity of both enzymes. These results show the high biotechnological potential of both lipases.

2) Directed evolution of BSLA

As a novel approach for the directed evolution of enantioselective enzymes complete saturation mutagenesis of the BSLA was done. Every single amino acid was exchanged independently against all other amino acids, thereby creating a library of 3439 individual enzyme variants. 55000 clones (10-fold oversampling) were screened for enantioselective hydrolysis of the model compound *meso*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene. Different variants showing inverted enantioselectivity in comparison to the wildtype-enzyme were identified. Amino acid-position 18 has been identified to be a hot spot. All amino acid exchanges at position 18 resulted in an inversion of enantioselectivity towards the model-compound. The BSLA-variants with an amino acid exchange at position 18 showed lower lipolytic activities and lower thermostabilities in comparison to the wildtype.

Asn 18 is located in a loop-region close to the catalytic triad of the enzyme and is supposed to be in direct contact with the substrate.

In a second screening of the complete saturation mutagenesis library variants having lipolytic activity towards the (*S*)-enantiomer of 1-(2-naphthyl)ethylacetate were identified. The wildtype is hydrolyzing exclusively the (*R*)-enantiomer of the substrate showing an *E*-value of >100 %. Responsible for the inversion of the enantioselectivity is an amino acid-exchange at position 76, directly next to the Ser77 of the catalytic triad. This exchange is supposed to change the geometry of the substrate-binding-site.

In summary, in two screening approaches using a complete saturation mutagenesis library of BSLA two important determinants for the enantioselectivity of the enzyme towards different substrates could be identified. This confirmed the usefulness of a complete saturation mutagenesis library, which is generally applicable for different screening approaches.

3) Development of a novel method for *in vitro* recombination

In the next part of this thesis BSLA-variants showing better enantioselectivity in comparison to the wildtype were recombined among one another and with a BSLA-variant showing to be more thermostable than the BSLA-wildtype. For this purpose, a new, easy and efficient method for *in vitro* recombination was developed. Using the method *Multiplex-PCR-based recombination* (MUPREC) several point-mutations could be recombined without introducing new point-mutations. In a screening for improved enantioselective hydrolysis of *meso*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene a variant with two amino acid-exchanges (N18Q, Y49V) showing the same enantioselectivity (-82 % *ee*) as the best variants with one amino acid-exchange (N18Q) but also showing better lipolytic activity was identified. The biochemical characterization of this variant indicated a significantly lower k_M -value in comparison to the wildtype and to N18Q.

7 LITERATUR

- Abato, P., Seto, C.T. (2001)** EMDee: An enzymatic method for determining enantiomeric excess. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 9206-9207
- Acharya, P. & Rao, N.M. (2003)** Stability studies on a lipase from *Bacillus subtilis* in guanidinium chloride. *J. Protein Chem.* **22**: 51-60
- Acharya, P., Rajakumara, E., Sankaranarayanan, R. and Rao, N.M. (2004)** Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase. *J. Mol. Biol.* **341**: 1271-1281
- Airaksinen, A. & Hovi, T. (1989)** Modified base compositions at degenerate positions of a mutagenic oligonucleotide enhance randomness in site-saturation mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **26**: 576-581
- Akutsu-Shigeno, Y., Teeraphatpornchai, T., Teamtisong, K., Nomura, N., Uchiyama, H., Nakahara, T. and Nakajima-Kambe, T. (2003)** Cloning and sequencing of a poly(DL-lactic acid) depolymerase gene from *Paenibacillus amylolyticus* Strain TB-13 and its functional expression in *E. coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2498-2504
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402
- Arnold, F.H. (1996)** Directed evolution: creating biocatalysts for the future. *Chem. Eng. Sci.* **51**: 5091-5102
- Arnold, F.H. (2001)** Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* **409**: 253-257
- Arnold, F.H., Moore, J.C. (1997)** Optimizing industrial enzymes by directed evolution. In: Advances in biochemical engineering and biotechnology. Scheper, T. (Hrsg.) Springer Verlag Berlin Heidelberg Vol. 58, pp. 2-14
- Arpigny, J.L and Jaeger, K.-E. (1999)** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* **343**:177-183
- Badalassi, F., Wahler, D., Klein, G., Crotti, P., Reymond, J.-L. (2000)** A versatile periodate-coupled fluorogenic assay for hydrolytic enzymes. *Angew. Chem.* **112**: 4233-4236
- Bairoch, A. (1999)** The ENZYME data bank in 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**: 310-311
- Barettino, D., Feigenbutz, M., Valcárcel, R. & Stunnenberg, H.G (1994)** Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **22**: 541-542
- Baumann, M., Stürmer, R. und Bornscheuer, U.T. (2001)** Eine Hochdurchsatz-Screening-Methode zur Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen. *Angew. Chem.* **113**: 4329-4333
- Birnboim, H. & Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid-DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523
- Bocola, M., Otte, N., Jaeger, K.-E., Reetz, M.T. & Thiel, W. (2004)** Learning from directed evolution: theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *ChemBioChem.* **5**: 100-109
- Bornscheuer, U.T. (2004)** Assay systems for screening or selection of biocatalysts. In: Enzyme functionality. Svenson, A., (ed.) Marcel Dekker, New York
- Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J. (1999)** Hydrolases in organic synthesis-regio- and stereoselective biotransformations. Wiley-VCH, Weinheim
- 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**: 2169-2173
- Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R. and Krishna, S.H. (2002)** Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol.* **10**: 433-437
- Bradford, B.B. (1976)** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L. & Menge, U. (1990)** A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**: 767-770
- Brakmann, S. (2001)** Discovery of superior enzymes by directed molecular evolution. *ChemBioChem.* **2**: 865-871

- Branneby, C., Carlqvist, P., Magnusson, A., Hult, K., Brinck, T., Berglund, P. (2003)** Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 874-875
- Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Keßeler, M., Stürmer, R. and Zelinski, T. (2004)** Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**: 788-824
- Brockerhoff, J. & Jensen, R.G. (1974)** Lipolytic Enzymes. Academic Press, New York, 1974
- Brzozowski, A.M., Derewenda, U., Derewenda Z.S., Dodson, G.G., Lawson, D.M., Turkenburg, J.P., Bjorkling, F., Hüge-Jensen, B., Patkar, S.A., Thim, L. (1991)** A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351**: 491-494
- Buchner, E. (1897)** Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **30**: 1110-1113
- Bulter, T., Alcade, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C. and Arnold, F.H. (2003)** Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 987-995
- Carr, R., Alexeeva, M., Enright, A., Eve, T.S., Dawson, M.J., Turner, N.J. (2003)** Directed evolution of an amine oxidase possessing both broad substrate specificity and high enantioselectivity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**: 4807-10
- Carrière, F., Thirstrup, K., Hjorth, S., Ferrato, F., Nielsen, P.F., Withers-Martinez, C., Cambillau, C., Esper, B., Thim, L., and Verger, R. (1997)** Pancreatic lipase structure-function relationships by domain-exchange. *Biochemistry* **36**: 239-248
- Cedrone, F., Ménez, A., Quéméneur, E. (2000)** Tailoring new enzyme function by rational redesign. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 405-410
- Chahinian, H., Nini, L., Boitard, E., Dubès, J.-P., Comeau, L.-C. and Sarda, L. (2002)** Distinction between esterases and lipases : a kinetic study with vinyl esters and triacylglycerols. *Lipids* **37**: 653-662
- Cheetham P.S.J. (2004)** Bioprocesses for the manufacture of ingredients for food and cosmetics. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **86**: 83-158
- Chen, K., Arnold, F.H. (1993)** Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5618-5622
- Chen-Goodspeed, M., Sorgorb, M.A., Wu, F., Raushel, F.M. (2001)** Enhancement, relaxation, and reversal of the stereoselectivity for phosphotriesterase by rational evolution of active site residues. *Biochemistry* **40**: 1332-1339
- Chin, J.T., Wheeler, S.L., Klibaniv, A.M. (1994)** On protein solubility in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 140-145
- Cho, A.R., Yoo, S.K. and Kim, E.J. (2000)** Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 235-238
- Chopra, S., Ranganathan, A. (2003)** Protein evolution by "codon shuffling": a novel method for generating highly variant mutant libraries by assembly of hexamer DNA duplexes. *Chem. Biol.* **10**: 917-926
- Cirino, P.C., Mayer, K.M., and Omeno, D. (2003)** Generating mutant libraries using error-prone PCR. In: Directed evolution library creation. Methods and protocols. Arnold, F.H. & Georgiou, G. (eds.) Humana Press, New Jersey
- Coco, W.M., Levinson, W.E., Christ, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C., & Monticello, D.J. (2001)** DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nat. Biotechnol.* **19**: 354-359
- Coco, W.M., Encell, L.P., Levinson, W.E., Christ, M.J., Loomis, A.K., Licato, L.L., Arensdorf, J.J., Sica, N., Pienkos, P.T., Monticello, D.J. (2002)** Growth factor engineering by degenerate homoduplex gene family recombination. *Nat. Biotechnol.* **20**: 1246-1250
- Cramer, A., Stemmer, W.P.C. (1995)** Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wild-type sequences. *BioTechniques* **18**:194-196
- Cramer, A., Raillard, S.-A., Bermudez, E. & Stemmer, W.P.C. (1998)** DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* **391**: 288-291
- Dalby, P.A. (2003)** Optimizing enzyme function by directed evolution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**: 500-505
- Dalbøge, H. & Lange, L. (1998)** Using molecular techniques to identify new microbial biocatalysts. *Trends Biotechnol.* **16** : 265-272
- Dartois, V., Baulard, A., Schanck, K., and Colson, C. (1992)** Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene

from *Bacillus subtilis* 168. *Biochim. Biophys. Acta* **1131**: 253-260

Dartois, V., Coppée, J.-Y., Colson, C., and Baulard, A. (1994) Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1670-1673

Darwin, C. (1859) On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London: John Murray.

Danielsen, S., Eklund, M., Deussen, H.J., Gräslund, T., Nygren, P.A., Borchert, T. (2001) *In vitro* selection of enzymatically active lipase variants from phage libraries using a mechanism-based inhibitor. *Gene* **72**: 267-274

Derewenda, U., Brzozowski, A.M., Lawson, D.M., Derewenda, Z.S. (1992) Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* **31**: 1532-1541

DeSantis, G., Zhu, Z., Greenberg, W.A., Wong, K., Chaplin, J., Hanson, S.R., Farwell, B., Nicholson, L.W., Rand, C.L., Weiner, D.P., Robertson, D.E., Burk, M.J. (2002) An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 6024-9025

DeSantis, G., Wong, K., Farwell, B., Chatman, K., Zhu, Z., Tomlinson, G., Huang, H., Tan, X., Bibbs, L., Chen, P., Kretz, K., Burk, M.J. (2003) Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through gene site saturation mutagenesis (GSSM). *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 11476-11477

Desnuelle, P., Sarda, L. & Ailhaud, G. (1960) Inhibition de la lipase pancréatique par le diéthyl-*p*-nitrophényl phosphate en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta* **37**: 570-571

Deussen, H.-J., Danielsen, S., Breinholt, J. and Borchert, T.V. (2000a) A novel biotinylated inhibitor for directed molecular evolution of lipolytic enzymes. *Bioorg. Med. Chem.* **8**: 507-513

Deussen, H.-J., Danielsen, S., Breinholt, J. and Borchert, T.V. (2000b) Design and synthesis of triglyceride analogue biotinylated suicide inhibitors for directed molecular evolution of lipolytic enzymes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**: 2027-2031

Dröge, M.J., Rüggeberg, C.J., van der Sloot, A.M., Schimmel, J., Dijkstra, D.S., Verhaert, R.M.D., Reetz, M.T. and Quax, W.J. (2003a) Binding of phage displayed *Bacillus subtilis* lipase A to a phosphonate suicide inhibitor. *J. Biotechnol.* **101**: 19-28

Dröge, M.J., Bos, R., Woerdenbag, H.J. and Quax, W. (2003b) Chiral gas chromatography for the determination of 1,2-O-isopropylidene-*SN*-glycerol stereoisomers. *J. Sep. Sci.* **26**: 771-776

Eckert, K.A., & Kunkel, T.A. (1990) High fidelity DNA synthesis by *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3739-3744

Eigen, M. (1984) The origin and evolution of life at the molecular level. *Adv. Chem. Phys.* **55**: 119-137

Eijkmann, C. (1901) Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *Centralbl. Bakteriol.* **29**: 841-848

Eipper, A. (2002) Neue Methoden für die gerichtete Evolution von Enzymen. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum

Eggert, T. (2001) Die lipolytischen Enzyme LipA und LipB von *Bacillus subtilis*: Charakterisierung und Optimierung mit gerichteter Evolution. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum

Eggert, T., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R. and Jaeger, K.-E. (2000) A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur. J. Biochem.* **267**: 6459-6469

Eggert, T., van Pouderoyen, G., Dijkstra, B.W. and Jaeger, K.-E. (2001) Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties and three-dimensional structure. *FEBS Lett.* **502**: 89-92

Eggert, T., van Pouderoyen, G., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B.W. and Jaeger, K.-E. (2002) Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surf. B* **26**: 37-46

Eggert, T., Brockmeier, U., Dröge, M.J., Quax, W.J., Jaeger, K.-E. (2003) Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino-acid supply and external pH. *FEMS Microbiol. Lett.* **225**: 319-334

Eggert, T., Reetz, M.T., and Jaeger, K.-E. (2004) Directed evolution by random mutagenesis: a critical evaluation. In: Enzyme functionality. Svenson, A. (ed.) Marcel Dekker, New York

Egloff, M.P., Marguet, F., Buono, G., Verger, R., Cambillau, C. and van Tilbeurgh, H. (1995) The 2,46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. *Biochemistry* **34**: 2751-2762

- Ferrari, E., Jarnagin, A.S. and Schmidt, B.F. (1993)** Commercial production of extracellular enzymes. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (eds.), Seiten 917-937. American Society for Microbiology, Washington, DC
- Fischer, M., Pleiss, J. (2003)** The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res.* **31**:319-321
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T., Petersen, S.B (2000)** What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* **82**:1033-1041.
- Franken, S.M., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H. & Dijkstra, B.W. (1991)** Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes. *EMBO J.* **10**: 1291302
- Funke, S.A., Otte, N., Bocola, M., Jaeger, K.-E., Thiel, W., Eggert, T. In silico scanning of protein-sequence space by QM/MM accelerates enzyme optimization using directed evolution. Zur Veröffentlichung eingereicht in: *Angewandte Chemie***
- Funke, S.A., Eipper, A., Reetz, M.T., Otte, N., Thiel, W., Van Pouderoyen, G., Dijkstra, B.W., Jaeger, K.-E. and Eggert, T. (2003)** Directed evolution of an enantioselective *Bacillus subtilis* lipase. *Biocatal Biotransform.* **21**: 67-73
- Georgescu, R., Bandara, G., and Sun, L. (2003)** Saturation mutagenesis. In: Directed evolution library creation. Methods and protocols. Arnold, F.H. & Georgiou, G. (eds.) Humana Press, New Jersey
- Glieder, A., Farinas, E.T., and Arnold, F.H. (2002)** Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nat. Biotech.* **20**: 1135-1139
- Goderis, H.L., Ampe, G., Feyten, M.P., Fouwe, B.L., Guffens, W.M., van Cauwenbergh, S.M., Tobbach, P.P. (1986)** Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 256-266
- Godfrey, T., West, S. (1996)** The application of enzymes in industrie. In: Industrial enzymologie, 2nd edition. Godfrey, T., Reichelt, J. (eds.) The Nature Press, NewYork
- Ghosh, D., Erman, M., Sawicki, M., Lala, P., Weeks, D.R., Li, N., Pangborn, W., Thiel, D.J., Jörnvall, H., Gutierrez, R., & Eyzaguirre, J. (1999)** Determination of a protein structure by iodination: the structure of iodinated acetylxykan esterase. *Acta Crystallog. Sect. D* **55**: 779-784
- Gray, K.A., Richardson, T.H., Kretz, K., Short, J.M., Bartnek, F., Knowles, R., Kan, L., Swanson, P.E., Robertson, D.E. (2001)** Rapid evolution of reversible denaturation and elevated melting temperature in a microbial haloalkane dehalogenase. *Adv. Synth. Catal.* **343**: 607-617
- Greener, A., Callahan, M., Jerpseth, B. (1996)** An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. In: *In vitro* mutagenesis protocols. Trower, M.K. (ed.) Humana Press, New Jersey
- Gribbs, M.D., Nevalainen, K.M., Bergquist, P.L. (2001)** Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene* **271**: 13-20
- Griffiths, A.D. and Tawfik, D.S. (2003)** Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by *in vitro* compartmentalization. *EMBO J.* **22**: 24-35
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., Cygler, M. (1994)** Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.* **3**: 82-91
- Grote, R. und Antranikian, G. (2003)** Verbund Biokatalyse und Innovationszentrum Biokatalyse-Biokatalysatoren im Dienste eines integrierten Umweltschutzes. *Transscript Sonderband 2003*: 6-11
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004)** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 763-781
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hanes, J., Plückthun, A. (1997)** *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4937-4942
- Harwood, C.R. (1992)** *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol.* **10**: 247-256
- Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C. and Ollis, D. (1999)** A barn of owls and bankers: a lush variety of α/β -Hydrolases. *Structure* **7**: R141-R146
- Henke, E., Bornscheuer, U.T. (1999)** Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error-prone PCR of a mutator strain and identification of mutants

showing enhanced enantioselectivity by a resorfin-based fluorescence assay. *Biol. Chem.* **380**: 1029-1033

Hildebrandt, G., Klavehn, W. (1930) Verfahren zur Herstellung von *L*-1-Phenyl-2-methylamino-propan-1-ol. Knoll A.-G. Chemische Fabriken in Ludwigshafen, Ger. Patent DE 548459

Hiraga, K. and Arnold, F.H. (2003) General method for sequence-independent site-directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **330**: 287-296

Hirose, I., Sano, K., Shioda, I., Kumano, M., Nakamura, K. and Yamane, K. (2000) Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. *Microbiology* **146**: 65-75

Hishino, A., and Isono, Y. (2002) Degradation of aliphatic polyester films by commercially available lipases with special reference to rapid and complete degradation of poly (L-lactide) film by lipase PL derived from *Alcaligenes* sp. *Biodegradation* **13**: 141-147

Hjorth, A., Carrière, F., Cudrey, C., Wöldike, H., Boel, E., Lawson, D.M., Ferrato, F., Cambillau, C., Dodson, G.G., Thim, L. & Verger, R. (1993) A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase. *Biochemistry* **32**: 4702-4707

Holwerda, K., Verkade, P.E. & de Willigen, A.H.A. (1936) Vergleichende Untersuchungen über die Verseifungsgeschwindigkeit einiger einsäuriger Triglyceride unter Einfluß von Pankreasextrakt. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **55**: 43-57

Horsman, G.P., Liu, A.M.F., Henke, E., Bornscheuer, U.T., and Kazlauskas, R.J. (2003) Mutations in distant residues moderately increase the enantioselectivity of *Pseudomonas fluorescens* esterase towards methyl-3-bromo-2-methylpropanoate and ethyl-3-phenylbutyrate. *Chem. Eur. J.* **9**: 1933-1939

Hotelier, T., Renault, L., Cousin, X., Negre, V., Marchot, P. and Chatonnet, A. (2004) ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Res.* **32**: D145-D147

Hughes, M.D., Nagel, D.A., Santos, A.F., Sutherland, A.J., Hine, A.F. (2003) Removing the redundancy from randomized gene libraries. *J. Mol. Biol.* **331**: 973-979

Hult, K. and Berglund, P. (2003) Engineered enzymes for improved organic synthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 395-400

IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology (1992) Enzyme Nomenclature, Academic Press Inc., San Diego, USA

Ivanova, T., Panaiotov, I., Boury, F., Proust, J.E. and Verger, R. (1997) Enzymatic hydrolysis of Poly-(D,L-lactide) spread monolayers by cutinase. *Colloid Polym. Sci.* **275**: 449-457

Jaeger, K.-E. (2004) Protein technologies and commercial enzymes. White is the hype-biocatalysts on the move. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 269-271

Jaeger, K.-E., Ransac, S., Koch, H.B., Ferrato, F. & Dijkstra, B.W. (1993) Topological characterization and modelling of the 3D structure of the lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **332**: 143-149

Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 29-63

Jaeger, K.-E., Steinbüchel, A., and Jendrossek, D. (1995) Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly (ω -hydroxyalkanoates). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3113-3117

Jaeger, K.-E., Reetz, M.T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**: 396-403

Jaeger, K.-E., Dijkstra, B.W. and Reetz, M.T. (1999) Bacterial biocatalysts-molecular biology, 3-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 315-351

Jaeger, K.-E. and Eggert, T. (2002) Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 390-397

Jaeger, K.E. and Eggert, T. (2004) Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 305-313

Janes, L.E., Kazlauskas, R.J. (1997) Quick E. A fast spectrophotometric method to measure the enantioselectivity of hydrolases. *J. Org. Chem.* **62**: 4560-4561

Janes, L.E., Löwendahl, C. and Kazlauskas, R.J. (1998) Quantitative screening of hydrolase libraries using pH-indicators: identifying active and enantioselective hydrolases. *Chem. Eur. J.* **4**: 2324-2331

Jarerat, A. and Tokiwa, Y. (2001) Degradation of poly (L-lactide) by a fungus. *Macromol. Biosci.* **1**: 136-140

- Kauffman, S. (1993)** The origins of order: self-organization and selection in evolution. Oxford University Press, New York
- Kawasaki, K., Kondo, H., Suzuki, M., Ohgiya, S. and Tsuda, S. (2002)** Alternate conformations observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase determined at 1.3 Å resolution. *Acta Cryst. D58*: 1168-1174
- Kazlauskas, R.J. (1994)** Elucidating structure-mechanism relationship in lipase: prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnol.* **12**: 464-472 [Erratum (1995) *Trends Biotechnol.* **13**: 195]
- Kazlauskas, R. J (2000)** Molecular modelling and biocatalysis: Explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**: 81-88
- Kikuchi, M., Ohnishi, K., Harayama, S. (1999)** Novel family shuffling methods for the *in vitro* evolution of enzymes. *Gene* **236**: 159-167
- Kikuchi, M., Ohnishi, K., Harayama, S. (2000)** An effective family shuffling method using single-stranded DNA. *Gene* **243**: 133-137
- Kim, H.K., Park, S.Y., Lee, J.K. and Oh, T.K. (1998)** Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 66-71
- Kim, K.W., Song, B., Choi, M.Y., Kim, M.J. (2001)** Biocatalysis in ionic liquids: markedly enhanced enantioselectivity of lipase. *Org. Lett.* **3**: 1507-1509
- Kim, Y.W., Choi, J.H., Kim, J.W., Perk, C., Kim, J.W., Cha, H., Lee, S.B., Oh, B.H., Moon, T.W., Park, K.H. (2003)** Directed evolution of *Thermus* maltogenic amylase toward enhanced thermal resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4866-4874
- Kim, Y.W., Lee, S.S., Warren, R.A., Withers, S.G. (2004)** Directed evolution of a glycosynthase from *Agrobacterium* sp. increases its catalytic activity dramatically and expands its substrate repertoire. *J. Biol Chem.* **279**: 42787-42793.
- Kitakuni, E., Yoshikawa, K., Nakano, K., Sasuga, J., Nobiki, M., Naoi, H., Yokota, Y., Ishioka, R., Yakabe, Y. (2001)** Biodegradation of poly(tetramethylene succinate-co-tetramethylene adipate) and poly(tetramethylene succinate) through water-soluble products. *Environ Toxicol Chem.* **20**:941-6.
- Koeller, K.M., Wong, C.-H. (2001)** Enzymes for chemical synthesis. *Nature* **409**: 241-246
- Koga, Y., Kato, K., Nakano, H. and Yamane, T. (2003)** Inverting enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* KWI-56 lipase by combinatorial mutation and high-throughput screening using single-molecule PCR and *in vitro* expression. *J. Mol. Biol.* **331**: 585-592
- Kok, R.G., Christoffels, V.M., Vosman, B. & Hellingwerf, K.J. (1993)** Growth-phase dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2329-2342
- Kolattukudy, P.E., Purdy, R.E. and Maiti, I.B. (1981)** Cutinase from fungi and pollen. *Methods Enzymol.* **71**: 652-664.
- Kragl, U., Eckstein, M. and Kraftzik, N. (2002)** Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 565-571
- Kühne, W.F. (1876)** Über das Verhalten verschiedener organisierter und sog. ungeformter Fermente. Über das Trypsin (Enzym des Pankreas). Verhandlungen des Heidelb. Naturhist.-Med. Vereins. N.S.I.3: Verlag von Carl Winters Universitätsbuchhandlung in Heidelberg.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.-K., Codani, J.-J., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Daniel, R.A., Denizot, F., Devine, K.M., Düsterhöft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.-Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Hénaud, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Konigstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.-M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauël, C., Médigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.-H., Parro, V., Pohl, T.-M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, g., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Serror,**

- P., Shin, B.-S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenberg, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Warmbutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H.-F., Zumstein, E., Yoshikawa, H. & Danchin, A. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamla, T., Erdmann, V.A. (2003) Searching sequence space for high-affinity binding peptides using ribosome display. *J. Mol. Biol.* **329**: 381-388
- Lang, D.A., Manesse, M.L.M., de Haas, G.H., Verheij, H.M., Dijkstra, B.W. (1998) Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur. J. Biochem.* **254**: 333-340
- Leenslag, J.W., Pennings, A.J., Bos, R.R., Rozema, F.R., Boering, G. (1987) Resorbable materials of poly (L-lactide). *Biomaterials* **8**: 311-314
- Li, W.H., Graur, D. (1991) Fundamentals of molecular evolution. Sunderland, M.A. Sinauer Associates, Inc.
- Li, S.M., Molina, I., Martinez, M.B., and Vert, M. (2002) Hydrolytic and enzymatic degradations of physically crosslinked hydrogels prepared from PLA/PEO/PLA triblock copolymers. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **13**: 81-86
- Liebeton, K. (1999) Struktur-/Funktionsbeziehungen der Lipase von *Pseudomonas aeruginosa*: Untersuchungen struktureller Grundlagen der Enantioselektivität. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.
- Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. & Jaeger, K.-E. (2000) Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem. Biol.* **7**: 709-718
- Liese, A., Seelbach, K. & Wandrey, C. (2000) Industrial biotransformations. Wiley-VCH, Weinheim
- Lin, Z., Thorsen, T., and Arnold, F.H. (1999) Expression of horseradish peroxidase in *E. coli* by directed evolution. *Biotechnol. Prog.* **15**: 467-471
- Lipovsek, D., Plückthun, A. (2004) *In-vitro* protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J. Immunolog. Meth.* **290**: 51-67
- Lee, S.H., Ryu, E.J., Kang, M.J., Wang, E.-S., Piao, Z., Choi, Y.J., Jung, K.H., Jeon, J.Y.J., Shin, Y.C. (2003) A new approach to directed gene evolution by recombined extension on truncated templates (RETT). *J. Mol. Catal. B Enzym* **26**: 119-129
- Lesiusse, E., Schank, K., Colson, C. (1993) Purification and preliminary characterization of extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extreme basic pH tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **216**: 155-160
- Longhi, S., Manesse, M., Verheij, H.M., De Haas, G.H., Egmond, M., Knoops-Mouthuy, E. & Cambillau, C. (1997) Crystal structure of cutinase covalently inhibited by a triglyceride analogue. *Protein Sci.* **6**: 275-278
- Lonzano, P., de Diego, T., Carrie, D., Vaultier M., Iborra, J.L. (2001) Overstabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1529-1533
- Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G.L., Maranas, C.D., Benkovic, S.J. (2001) Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 11248-11253
- Lutz, S., Patrick, W.M. (2004) Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 291-297
- Marrs, B., Delagrave, S. and Murphy, D. (1999) Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 241-245
- Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthysens, G. & Cambillau, C. (1992) *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* **356**: 615-618
- Matthews, D.J., Wells, J.A. (1993) Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science* **260**: 1113-1117
- May, O., Nguyen, P.T., and Arnold, F.H. (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat. Biotechnol.* **18**: 317-320
- Miller, C.A. (2000) Advances in enzyme discovery. *Inform.* **11**: 489-495
- Mills, D.R., Peterson, R.L., Spiegelman, S. (1967) An extracellular darwinian experiment with a self-

duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**: 217-224

Miyazaki, K. (2002) Random DNA fragmentation with endonuclease V: application to DNA shuffling. *Nucleic Acids Res.* **30**: e139

Miyazaki, K., Arnold, F.H. (1999) Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function. *J. Mol. Evol.* **49**: 716-720

Miyazaki, K., Wintrode, P.L., Grayling, R.A., Rubingh, D.N. and Arnold, F.H. (2000) Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.* **297**: 1015-1026

Möller, B., Vetter, R., Wilke, D. & Foillois, B. (1991) Alkaline *Bacillus* lipases, coding DNA sequences therefor and bacilli which produce these lipases. Patent-Nr. WO91/16422

Moore, G.L. and Maranas, C.D. (2004) Modeling and optimization of directed evolution protocols. In: Evolutionary methods for protein engineering. In: Enzyme functionality. Svenson, A. (ed.) Marcel Dekker, New York

Moore, B.D., Stevenson, L., Watt, A., Flitsch, S., Turner, N.J., Cassidy, C. & Graham, D. (2004) Rapid and ultra-sensitive determination of enzyme activities using surface-enhanced resonance Raman scattering. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1133-1138

Morrison, K.L., Weiss, G.A. (2001) Combinatorial alanine-scanning. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**: 302-307

Mugford, P.F., Lait, S.M., Keay, B.A., and Kazlauskas, R.J. (2004) Enantiocomplementary enzymatic resolution of the chiral auxiliary: *cis,cis*-6-(2,2-dimethylpropanamido)spiro[4.4]nonan-1-ol and the molecular basis for the high enantioselectivity of subtilisin Carlsberg. *ChemBioChem.* **5**: 980-987

Murakami, H., Hohsaka, T., and Sisido, M. (2002) Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nature Biotechnol.* **20**: 76-81

Nakamura, K., Tomita, T., Abe, N., and Kamio, Y. (2001) Purification and characterization of an extracellular poly (L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. Strain K104-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 345-353

Nardini, M. & Dijkstra, B.W. (1999) α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**: 732-737

Ness, J.E., Welch, M., Giver, L., Bueno, M., Cherry, J.R., Borchert, T.V., Stemmer, W.P.C., and Minshull, J. (1999) DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. *Nat. Biotechnol.* **17**: 893-896

Ness, J.E., Del Cardayre, S.B., Minshull, J., Stemmer, W.P. (2000) Molecular breeding: the natural approach to protein design. *Adv. Protein Chem.* **55**:261-92.

Ness, J.E., Kim, S., Gottman, A., Pak, R., Krebber, A., Borchert, T.V., Govindarajan, S., Mundorff, E.C., Minshull, J. (2002) Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently. *Nat. Biotechnol.* **20**: 1251-1255

Neuberg, C., Hirsch, J. (1921) Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment (Carbologase). *Biochem. Z.* **115**: 282-310

Nobel, M.E.M., Cleasby, A., Johnson, L.N., Egmond, M.R., Frenken, L.G.J. (1993) The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* **331**: 123-128

Nthangeni, M.B., Patterton, H.-G., van Tonder, A., Vergeer, W.P. & Litthauer, D. (2001) Overexpression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme Microbiol. Technol.* **28**: 705-712

OECD-Organisation For Economic Co-Operation and development (ed.) Biotechnology for clean industrial products and processes-towards industrial sustainability. Paris, 1998

Ogawa, J., Shimizu, S. (1999) Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Trends Biotechnol.* **17**:13-20

Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L, Verschuere, K.H.G. & Goldman, A. (1992) The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**: 197-211

O'Maille, P.E., Bakhtina, M., Tsai, M.D. (2002) Structure-based combinatorial protein engineering (SCOPE). *J. Mol. Biol.* **321**: 677-691

Ostermeier, M., Shim, J.H. & Bencovic, S.J. (1999) A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat. Biotechnol.* **17**: 1205-1209

Ostermeier, M. (2003) Synthetic gene libraries: in search for the optimal diversity. *Trends Biotechnol.* **21**: 244-247

- Otten, L.G., Sio, C.F., Vrieling, J., Cool, R.H., Quax, W.J. (2002) Altering the substrate specificity of cephalosporin acylase by directed evolution of the beta subunit. *J. Biol. Chem.* **277**: 42121-42127
- Park, S., Kazlauskas, R.J. (2001) Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *Chem. Commun.* **66**: 8395-8401
- Park, S. and Kazlauskas, R.J. (2003) Biocatalysis in ionic liquids-advantages beyond green technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14** : 432-437
- Pasteur, L. (1858) Mémoire sur la fermentation de l'acide tartrique. *C.R. Acad. Sci.* **46** : 615-618
- Penreac'h, G., Graille, J., Pina, M. and Verger, R. (2002) An ultraviolet spectrophotometric assay for measuring lipase activity using long-chain triacylglycerols from *Aleurites fordii* seeds. *Anal. Biochem.* **303**: 17-24
- Persson, M., Bornscheuer, U.T. (2003) Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. *J. Mol. Catal. B Enzym* **22**: 21-27
- Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346-356
- Pettersson, P.L., Johansson, A.-S., Mannervik, B. (2002) Transmutation of human glutathione transferase A2-2 with peroxidase activity into an efficient steroid isomerase. *J. Biol. Chem.* **277**: 30019-30022
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599
- Powell, K.A., Ramer, S.W., del Cardayré, S.B., Stemmer, W.P.C., Tobin, M.B., Longchamp, P.F. und Huisman, G.W. (2001) Gerichtete Evolution und Biokatalyse. *Angew. Chem.* **113**: 4068-4080
- Pranamuda, Y., Tokiwa, H., and Tanaka, H. (1997) Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1637-1640
- Pranamuda, H., and Tokiwa, Y. (1999) Degradation of poly (L-lactide) by strains belonging to genus *Amycolatopsis*. *Biotechnol. Lett.* **21**: 901-905
- Pranamuda, H., Tsuchii, A., and Tokiwa, Y. (2001) Poly (L-lactide)-degrading enzyme produced by *Amycolatopsis* sp. *Macromol. Biosci.* **1**: 25-29
- Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 50-108
- Qiang, W., Qiuyn, L., Gang, L. & Baojian, L. (2004) A novel method of DNA shuffling without PCR process. *Chinese Science Bulletin* **49**: 7689-7691
- Rajagopalan, P.T.R., Lutz, S., and Benkovic, S. (2002) Coupling interactions of distal residues enhance dihydrofolate reductase catalysis: mutational effects on hydride transfer rates. *Biochem.* **41**: 12618-12628
- Reetz, M.T. (2002) Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**: 145-150
- Reetz, M.T. (2003a) An overview of high-throughput screening systems for enantioselective enzymatic transformations. In: Directed enzyme evolution. Selection and screening methods. Arnold, F.H., Georgiou, G. (eds.) Humana Press, New Jersey
- Reetz, M.T. (2003b) Select protocols of high-throughput *ee* screening systems for assaying enantioselective enzymes. In: Directed enzyme evolution. Selection and screening methods. Arnold, F.H., Georgiou, G. (eds.) Humana Press, New Jersey
- Reetz, M.T. (2004) Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: practical and theoretical ramifications. *PNAS* **101**: 5716-5722
- Reetz, M.T., Zonta, A., Schimossek, K., Liebeton, K. & Jaeger, K.-E. (1997) Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by *in vitro* evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **36**: 2830-2832
- Reetz, M.T., Becker, M.H., Kühling, K.M. & Holzwarth, A. (1998) Time-resolved IR-thermographic detection and screening of enantioselectivity in catalytic reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**: 2647-2650
- Reetz, M.T., Becker, M.H., Klein, H.-W. & Stöckigt, D. (1999) A method for high-throughput screening of enantioselective catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**: 1758-1761
- Reetz, M.T. & Jaeger, K.-E. (2000) Superior biocatalysts by directed evolution. *Top. Curr. Chem.* **200**: 31-57
- Reetz, M.T., Kühling, K.M., Hinrichs, H., Deege, A. (2000a) Circular dichroism as a detection method in the screening of enantioselective catalysts. *Chirality* **12**: 479-482.

- Reetz, M.T., Kühling, K.M., Deege, A., Hinrichs, H. & Belder, D. (2000b)** Super-high-throughput screening of enantioselective catalysts by using capillary array electrophoresis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**: 3891-3893
- Reetz, M.T., Wilensek, S., Zha, D. & Jaeger, K.-E. (2001)** Directed evolution of an enantioselective enzyme using combinatorial multiple cassette mutagenesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 3589-3591
- Reetz, M.T., Tielmann, P., Eipper, A., Ross, A., Schlotterbeck, G. (2004)** A high-throughput NMR-based *ee*-assay using chemical shift imaging. *Chem. Commun. (Camb)*. **21**: 1366-1367.
- Reetz, M.T., Torre, C., Eipper, A., Lohmer, R., Hermes, M., Brunner, B., Maichele, A., Bocola, M., Arand, M., Crinin, A., Genzel, Y., Archelas, A. & Furstoss, R. (2004a)** Enhancing the enantioselectivity of an epoxide hydrolase by directed evolution. *Org. Lett.* **6**: 177-180
- Reetz, M.T., Daligault, F., Brunner, B., Hinrichs, H., Deege, A. (2004b)** Directed evolution of cyclohexanone monooxygenases: enantioselective biocatalysts for the oxidation of prochiral thioethers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**: 4078-4081.
- Rejeb, I.B., Hamida, J.B., Gargouri, M. (2004)** Coupled-enzyme system for the determination of lipase activity. *Biotechnol Lett.* **26**:1273-1276.
- Reymond, J.-L. and Wahler, D. (2002)** Substrate arrays as enzyme fingerprinting tools. *ChemBioChem.* **3**: 701-708
- Roberts, B.L., Markland, W., Ley, A.C., Kent, R.B., White, D.W., Guterman, S.K., Ladner, R.C. (1992)** Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2429-2433
- Robertson, D.E., Chaplin, J.A., DeSantis, G., Podar, M., Madden, M., Chi, E., Richardson, T., Milan, A., Miller, M., Weiner, D.P., Wong, K., McQuaid, J., Farwell, B., Preston, L.A., Tan, X., Snead, M.A., Keller, M., Mathur, E., Kretz, P.L., Burk, M.J., Short, J.M. (2004)** Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis. *Appl Environ. Microbiol.* **70**: 2429-2436
- Rosenbaum, T. (2003)** Reinigung und biochemische Charakterisierung der extrazellulären Lipasen aus *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit, Fachhochschule Aachen
- Rotticci, D., Rotticci-Mulder, J.C., Denman, S., Norin, T. and Hult, K. (2001)** Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering. *ChemBioChem.* **2**: 766-770
- Rouhi, A.M. (2002)** Chiral roundup. *Chem. Eng. News.* **80**: 43-50
- Rouhi, A.M. (2004)** Chiral chemistry. *Chem. Eng. News.* **82**: 47-62
- Rungpragaphyan, S., Kawarasaki, Y., Imaeda, T., Kohda, K., Nakano, H., & Yamane, T. (2002)** Highthroughput, cloning-independent protein library construction by combining single-molecule DNA amplification with *in vitro* expression. *J. Mol. Biol.* **318**: 395-405
- Sakai, K., Kawano, A., Iwami, A., Nakamura, M., and Moriguchi, M. (2001)** Isolation of a thermophilic poly-L-lactide degrading bacterium from compost and its enzymatic characterization. *J. Biosci. Bioeng.* **92**: 298-300
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487491
- Salazar, O., Cirino, P.C., Arnold, F.H. (2003)** Thermostabilization of a cytochrome P450 peroxxygenase. *ChemBioChem.* **4**: 891-893
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York
- Sarda, L. & Desnuelle, P. (1958)** Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta* **30**: 513-521
- Schallmeyer, M., Singh, A., and Ward, O.P. (2004)** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol./Rev. Can. Microbiol.* **50**: 1-17
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. & Witholt, B. (2001)** Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**: 258-268
- Schmidt, R.D. and Verger, R. (1998)** Lipases: interfacial enzymes with with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**: 1609-1633
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M.L., Atomi, H., Schmid, R.D. (1996)** Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1301**: 105-114
- Schöfer, S.H., Kraftzik, N., Wasserscheid, P., Kragl, U. (2001)** Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity. *Chem. Commun.* **1**: 425-426

- Schoemaker, H.E., Mink, D., Wubbolts, M.G. (2003)** Dispelling the myth-biocatalysis in industrial synthesis. *Science* **299**: 1694-1697
- Schönheyder, F. & Volqvartz, K. (1945)** On the affinity of pig pancreatic lipase for triacproin in heterogenous solution. *Acta Physiol. Scand.* **9**: 57-67
- Schrag, J.D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H.J., Schmid, R., Schomburg, D., Rydel, T.J., Oliver, J.D., Strickland, L.C., Dunaway, C.M., Larson, S.B., Day, J. & Mc Pherson, A. (1997)** The open confirmation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* **5**: 187-202
- Secundo, F., Carrera, G., Tarabiono, C., Brocca, S., Lotti, M. (2004)** Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated *Candida rugosa* lipase isoform 1 in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **86**: 236-40.
- Shao, Z., Zhao, H., Giver, L., Arnold, F.H. (1998)** Random-priming *in vitro* recombination: a effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* **26**: 681-683
- Short, J.M. (2001)** Saturation mutagenesis in directed evolution. US Patent US6171820
- Sieber, V., Martinez, C.A., and Arnold, F.H. (2001)** Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat. Biotechnol.* **19**: 456-460
- Smeets, J.W.H. & Kieboom, A.P.G. (1992)** Enzymatic enantioselective ester hydrolysis by carbonyl-esterase NP. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **111**: 490-495
- Song, J.K., Rhee, J.S. (2001)** Enhancement of stability and activity of phospholipase A₁ in organic solvents by directed evolution. *Biochim. Biophys. Acta* **1547**: 370-378
- Song, J.K., Chung, B., Oh, Y.K., Rhee, J.S. (2002)** Construction of DNA-shuffled and incrementally truncated libraries by a mutagenic and unidirectional reassembly method: changing from a substrate specificity of phospholipase to that of a lipase. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 6146-6151
- Stemmer, W.P.C. (1994a)** DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10747-10751
- Stemmer, W.P.C. (1994b)** Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391
- Stinson, S.C. (2001)** Chiral pharmaceuticals. *Chem. Eng. News* **79** : 79-97
- Straathof, A.J.J., Panke, S. and Schmid, A. (2002)** The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 548-556
- Streit, W.R., Daniel, R. and Jaeger, K.-E. (2004)** Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 285-290
- Studier, F.W. & Moffat, B.A. (1986)** Use of the bacteriophage T7-RNA-Polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130
- Syldatk, C., Hauer, B., May, O. (2001)** Biokatalyse in der chemischen Industrie. *Biospektrum* **2**: 154-147
- Tabor, S. (1990)** Expression using the T7 RNA polymerase/promoter-System. In: Current protocols in molecular biology, Vol. 2. Ansel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.D., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) J. Wiley & Sons. Inc.
- Taran, F., Gauchet, C., Mohar, B., Meunier, S., Valleix, A., Renard, P.Y., Créminon, C., Grassi, J., Wagner, A., Mioskowski, C. (2002)** High-throughput screening of enantioselective catalysts by immunoassay. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**: 124-127
- Taylor, S.V., Kast, P. und Hilvert, D. (2001)** Genetische Selektion- eine Strategie zur Untersuchung und Herstellung von Enzymen. *Angew. Chem.* **113**: 3408-3463
- Teeraphatpornchai, T., Nakajima-Kambe, T., Akutsu-Shigeno, Y., Nakayama, M., Nomura, N., Nakahara, T. & Uchiyama, H. (2003)** Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. *Biotechnol. Lett.* **25**: 23-28
- Theil, F. (1997)** Enzyme in der organischen Synthese. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Theil, F., Schick, H., Winter, G. & Reck, G. (1991)** Lipase-catalyzed transesterification of meso-cyclopentane diols. *Tetrahedron* **47**: 7569-7582
- Thirstrup, K., Carrière, F., Hjorth, S., Rasmussen, P.B., Woldike, H., Nielsen, P.F. and Thim, L. (1993)** One-step purification and characterization of human pancreatic lipase expressed in insect cells. *Federation of European biochemical societies* **327**: 79-84
- Thirstrup, K., Verger, R. & Carrière, F. (1994)** Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. *Biochemistry* **33**: 2748-2756

- Tielmann, P., Boese, M., Luft, M., Reetz, M.T. (2003)** A practical high-throughput screening system for enantioselectivity by using FTIR spectroscopy. *Chemistry* **18**: 3882-3887.
- Tindall, K.R. & Kunkel, T.A. (1988)** Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-6013
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Joengbloed, J.D., Bron, S. & van Dijk, J.M. (2000)** Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 515-547
- Tomassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M., Lazdunski, A. (1992)** Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **9**: 73-90
- Uchida, H., Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Tokiwa, Y., Nakahara, T. (2000)** Properties of a bacterium which degrades solid poly (tetramethylene succinate)-co-adipate, a biodegradable plastic. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**: 25-29
- Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S. & Jones, T.A. (1994)** The sequence, crystal structure determination and refinement of the two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2**: 293-308
- Vandamme, E., Schanck-Brodruock, K.H., Colson, C. and Hanotier, J.D.V. (1987)** DNA segment coding for a specific lipase, vectors for expression thereof, microorganisms transformed by these vectors and use of these microorganisms for the production of the lipase. Patent: EP 0243338-A
- Van Loo, B., Spelberg, J.H., Kingma, J., Sonke, T., Wubbolts, M.G., Janssen, D.B. (2004)** Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling. *Chem Biol.* **11**: 981-990
- Van Oort, M.G., Debeer, A.M.T.J., Dijkman, R., Leuveling Tjeenk, M., Verheij, H.M., de Haas, G.H., Wenzig E. & Götz, F. (1989)** Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* **28**: 9278-9285
- Van Pouderooyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.-E. & Dijkstra, B.W. (2001)** The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal fold α/β hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* **309**: 215-226
- Van Rantwijk, F., Lau, R.M. and Sheldon, R.A. (2003)** Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends Biotechnol.* **21**: 131-138
- Van Tilbeurgh, H., Egloff, M.-P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., (1993)** Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* **326**:814-820
- Verger, R. (1997)** "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. *Trends. Biotechnol.* **15**: 32-38
- Vert, M. (1989)** Bioresorbable polymers for temporary therapeutic applications. *Angew. Makromol. Chemie* **166**: 155-158
- Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.-E., Streit, W.R. (2003)** Prospecting for novel biocatalysts in the soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6235-6242
- Wackett, L.P. (2004)** Novel biocatalysts by database mining. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 280-284
- Wada, M., Hsu, C.-C., Franke, D., Mitchell, M., Heine, A., Wilson, I., Wong, C.-H. (2003)** Directed evolution of N-acetylneuraminic acid aldolase to catalyze enantiomeric aldol reactions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**: 2091-2098
- Wahler, D., Badalassi, F., Crotti, P., and Reymond, J.-L. (2002)** Enzyme fingerprints of activity, and stereo- and enantioselectivity from fluorogenic and chromogenic substrate arrays. *Chem. Eur. J.* **8**: 3211-3228
- Wang, L., Brock, A., Herberich, B., Schultz, P.G. (2001)** Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* **292**: 498-500
- Welton, T. (1999)** Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chem. Rev.* **99**: 2071-2083
- Williams, D.F. (1981)** Enzymatic hydrolysis of polylactic acid. *Eng. Med.* **10**: 5-7
- Williams, G.J., Domann, S., Nelson, A., Berry, A. (2003)** Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 3143-3148
- Winkler, U.K. & Stuckmann, M. (1979)** Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **138**: 663-670
- Winkler, F.K., D'Arcy, A. & Hunziker, W. (1990)** Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**: 771-774
- Witholt, B., Boekhout, M., Brock, M., Kingma, J., Heerikhuizen, H.V. & Leij, L.D. (1976)** An

efficient and reproducible procedure for the formation of spheroblasts from variously grown *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **74**: 160-170

Witt, U., Müller, J.-R., und Deckwer, W.-D. (1995) New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favourable use properties. *J. Environ. Pol. Deg.* **3**: 215-223

Witt, U., Müller, R.-J. und Klein, J. (1997) Biologisch abbaubare Polymere: Status und Perspektiven. Franz-Patatz-Zentrum, Braunschweig

Whittle, E. and Shanklin, J. (2001) Engineering Δ^9 -16:0-acyl carrier protein (ACP) desaturase specificity based on combinatorial saturation mutagenesis and logical redesign of the castor Δ^9 -18:0-ACP desaturase. *J. Biol. Chem.* **24**: 21500-21505

Wong, T.S., Tee, K.L., Hauer, B., Schwaneberg, U. (2004) Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* **32**: e26

Zaks, A. (2001) Industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**:130-136

Zha, D., Wilensek, S., Hermes, M., Jaeger, K.-E. & Reetz, M.T. (2001) Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Chem. Commun.* **24**: 2664-2665

Zha, D., Eipper, A., Reetz, M.T. (2003) Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: a new tool in directed evolution. *ChemBioChem.* **4**: 34-39

Zhang, Y.X., Perry, K., Vinci, V.A., Powell, K., Stemmer, W.P.C. & del Cardayré, S.B. (2002) Genome shuffling leads to rapid improvement in bacteria. *Nature* **415**: 644-646

Zhang, N., Suen, W.C., Windsor, W., Xiao, L., Madison, V., Zaks, A. (2003) Improving tolerance of *Candida antartica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Prot. Eng.* **16**: 599-605

Zhao, H., and Arnold, F. H. (1997) Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res.* **25**: 1307-1308

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

Zhao, H., Malhotra, S.V. (2002) Enzymatic resolution of amino acid esters using ionic liquid N-ethyl pyridinium trifluoroacetate. *Biotechnol. Lett.* **24**: 1257-1260

Zhao, H. and Zha, W. (2004) Evolutionary methods for protein engineering. In: Enzyme functionality. Svenson, A., (ed.) Marcel Dekker, New York

Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M., Keller, M. (2002) Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 15681-15686

Zou, J., Hallberg, H.M., Bergfors, T., Oesch, F., Arand, M., Mowbray, S.L., Jones, T.A. (2000) Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases. *Structure Fold* **8**: 111-122

8 ANHANG

8.1 Mathematische Formeln:

8.1.1 Formel zur Berechnung der Lipaseaktivität nach spektrometrischer Bestimmung mit dem Substrat *p*-Nitrophenylpalmitat

$$A \left[\frac{\text{mol}}{\text{l} * \text{min}} \right] = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E * V_{\text{ges}}}{\epsilon_{(pNPP)} * d * V_{\text{Probe}} * t} \quad (\text{Lambert-Beer'sches Gesetz})$$

Da eine Lipaseeinheit U als die Enzymmenge definiert wurde, die 1 μmol *p*-Nitrophenol pro min freisetzt, gilt:

$$A \left[\frac{U}{\text{ml}} \right] = \frac{\Delta E * V_{\text{ges}}}{\epsilon_{(pNPP)} * d * V_{\text{Probe}} * t} * 1000 \quad (\text{bezogen auf das Volumen der Probe } (V_{\text{Probe}}))$$

Da der molare Extinktionskoeffizient (ϵ) von *p*-Nitrophenol (pH 7,5) $15000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ beträgt und die Bestimmung standardmäßig über 15min (t) in einem Gesamtvolumen von 2,5 mL (V_{ges}) durchgeführt und in Küvetten mit einer Schichtdicke (d) von 1cm gemessen wurde, ist folgende Vereinfachung der Formel möglich:

$$A \left[\frac{U}{\text{ml}} \right] = \frac{\Delta E}{V_{\text{Probe}[\text{ml}]}} * 0,01$$

8.1.2 Formel zur Berechnung des *ee*-Wertes (*enantiomeric excess*)

$$ee [\%] = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right) * 100\%$$

n_1 : Stoffmenge 1. Enantiomer; n_2 : Stoffmenge 2. Enantiomer

8.1.3 Formel zur Berechnung des *E*-Wertes

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ee)]}{\ln[1 - c(1 - ee)]}$$

c = Umsatz; ee = *ee*-Wert

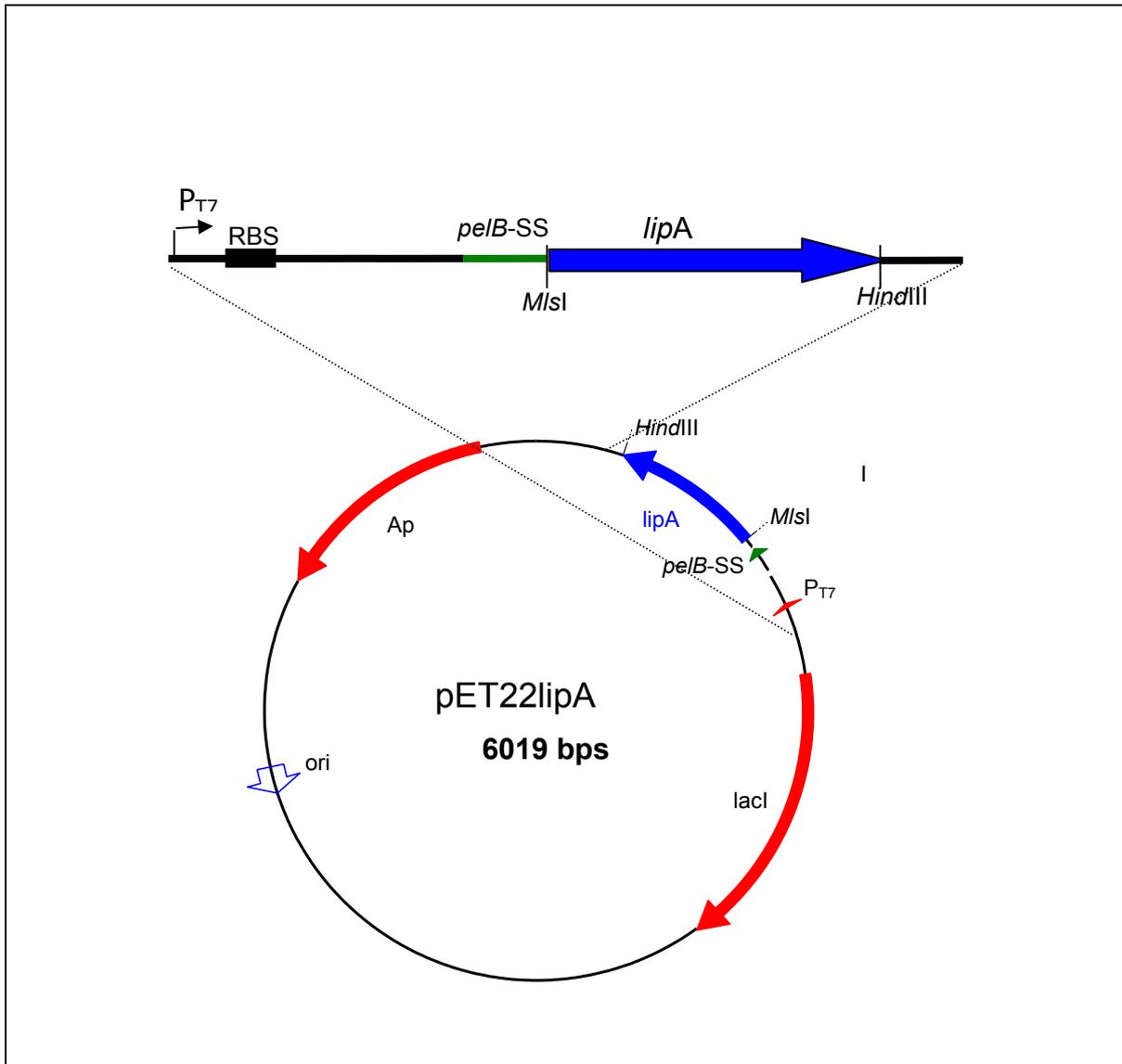
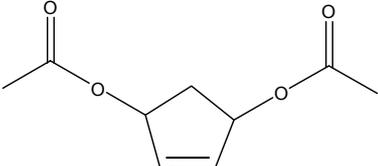
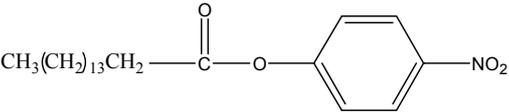
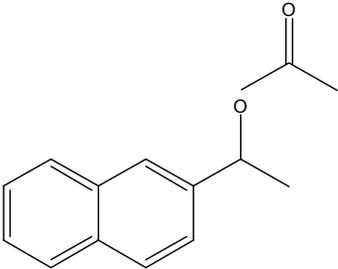
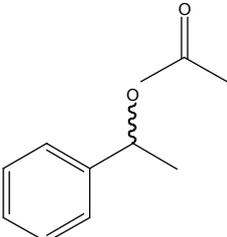
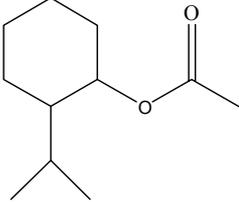
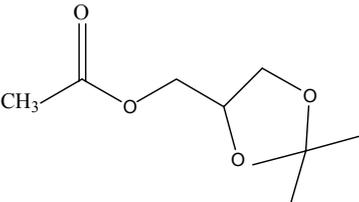


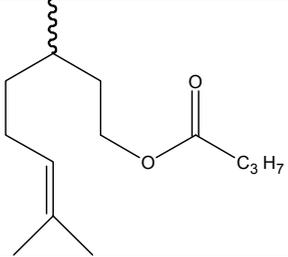
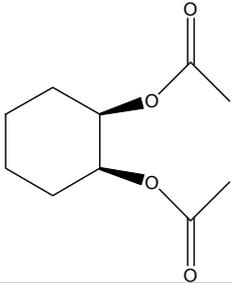
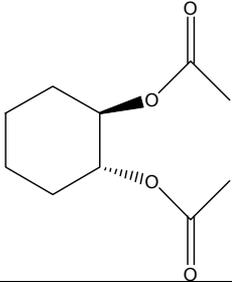
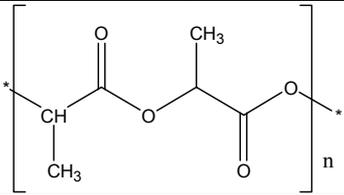
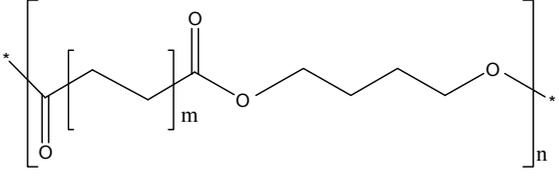
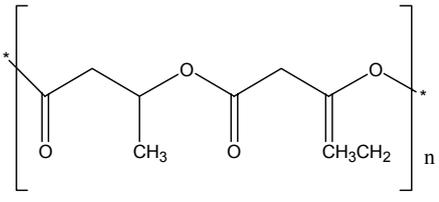
Abb. 35: Karte des rekombinanten Plasmids pET22lipA. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: P_{T7}: T7-Promotor; RBS: Ribosomenbindestelle; *pelB-SS*: Signalsequenz der Pectatlyase aus *Erwinia chrysanthemi*; Ap: Ampicillin-Resistenzgen; ori: Origin.

8.3 Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Substrate

Tab. 27: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Substrate

| | |
|---|---|
| <i>meso</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten |  |
| <i>p</i> -Nitrophenyl-Plamitat | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NO}_2$  |
| <i>(R)</i> / <i>(S)</i> -1-(2-Naphthyl)ethylacetat (NEA) |  |
| <i>rac</i> -1-Phenylethylacetat (PEA) |  |
| <i>rac</i> -Menthylacetat (MA) |  |
| <i>rac</i> - α,β -Isopropylidenglycerol-Butyrat (IPG-Butyrat) |  |

Fortsetzung Tab. 26

| | |
|--|--|
| <p><i>rac</i>-β-Citronellyl-Butyrat</p> |  |
| <p><i>cis</i>-1,2-Cyclohexandiol-bis-acetat</p> |  |
| <p><i>trans</i>-1,2-Cyclohexandiol-bis-acetat</p> |  |
| <p>Poly-(D, L-Lactid) (PLA)</p> |  |
| <p>Bionolle</p> |  |
| <p>Poly-(3-Hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBcoVa)</p> |  |

DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jäger danke ich für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas im Rahmen des EU-Projektes, die konstruktiven Diskussionen und die mir gebotenen Möglichkeiten, internationale Erfahrungen zu sammeln.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei Prof. Dr. M. Bott bedanken.

Ich bedanke mich für die gewährte finanzielle Unterstützung des Graduiertenkollegs „Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Mein herzlicher Dank gilt Dr. T. Eggert für die engagierte und freundschaftliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieser Promotionsarbeit, für die Hilfe bei der Lösung vieler größerer und kleinerer wissenschaftlicher Probleme und für die kritische und aufmerksame Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Prof. Dr. M.T. Reetz, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung (Mülheim a. d. Ruhr) danke ich für die gute Kooperation im Rahmen des EU-Projektes und darüber hinaus. An dieser Stelle möchte ich auch den Herren Dr. A. Eipper, Dr. H. Krumm und Dr. W. Wiesenhöfer für die sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit danken.

Ich danke Prof. Dr. W. Thiel, Dr. M. Bocola und Herrn N. Otte vom Arbeitskreis „Theoretische Chemie“ des Max-Planck-Instituts für Kohlenforschung (Mülheim a. d. Ruhr) für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der theoretischen Betrachtung der gerichteten Evolution der Lipase aus *Bacillus subtilis*.

I thank Prof. Dr. W. J. Quax, Laboratory of Pharmaceutical Biology-Rijksuniversität Groningen (Niederlande) for hosting me from May, 10th to may, 25th 2004 at his institute and for the good cooperation in general concerning the directed evolution of the *B. subtilis* Lipase A. I thank Mrs Y. Boersma for the experimental help and for the nice time and Dr. M. J. Dröge for very interesting discussions.

I thank Dr. R. Verger, Labatoire de Lipolyse Enzymatique-Centre National de la Recherche Scienifique (Marseille, Frankreich) to give me the opportunity to work at his institute from July, 21st to August, 5th 2004. I thank Dr. C. Serveau for the experimental help and to everything beyond science during my stay in Marseille.

I thank Prof. Dr. B. Dijkstra, Laboratory of Biophysical Chemistry-Rijksuniversität Groningen (Niederlande) and Dr. G. van Pouderoyen for very helpful discussions concerning questions about the LipA-3D-structure.

I would like to thank all participants of the EU-Project “EvoCatal” for good cooperations, interesting discussions and a very nice atmosphere during the semi-annual meetings.

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. Willbold, Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Bereitstellung der ionischen Flüssigkeiten.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn T. Rosenbaum für die ausgezeichnete Hilfe bei der Durchführung der Experimente bedanken.

Den Mitarbeitern des Instituts für molekulare Enzymtechnologie danke ich für das angenehme und kameradschaftliche Arbeitsklima während meiner gesamten Promotionszeit. Mein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „Gerichtete Evolution“, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden und für eine freundschaftliche Atmosphäre gesorgt haben. Ich danke Frau J. Andexer, Frau S. Heckmann, Frau M. Kötter und Herrn M. Puls für die aufmerksame und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Last but not least danke ich meiner Familie für die liebevolle Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit und Christian, der sich in „guten Zeiten“ mit mir gefreut und mich in „schlechten Zeiten“ aufgemuntert hat.