HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Komparative Analyse der adaptiven thermischen Eigenschaften lipolytischer Enzyme mit differentem Temperatur-Ursprung

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Agathe Mandrysch

aus Ratibor

Düsseldorf, August 2013

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

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
Korreferent: Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2013

In Liebe und Dankbarkeit

Meiner Eltern und ***Tim***

DANKSAGUNGEN

An erster Stelle geht mein besonderer Dank an Prof. Dr. K.-E. Jaeger für die Bereitstellung dieses überaus interessanten und vielseitigen Themas. Seine Betreuung sowie sein großes Verständnis auch für persönliche Angelegenheiten erleichterte mir sehr die Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Martina Pohl danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Die Arbeit wäre ohne die finanzielle Förderung durch die Deutsche Forschungs Gemeinschaft (DFG) sowie dem Graduiertenkolleg Seleca nicht möglich gewesen.

Dr. Birgit Strodel und Chetan Poojari vom Institut für Strukturbiochemie des Forschungszentrums Jülich danke ich für die Erstellung der Homologiemodelle bzw. moleküldynamischen Berechnungen der Enzyme.

Ein großes Dankeschön gilt ebenfalls Dr. Filip Kovačić für die langjährige Betreuung, die hilfsbereite Unterstützung, die zahlreichen und interessanten Diskussionen und die freundschaftlichen Gespräche.

Für ein wunderbares Arbeitsklima danke ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des IMET. Für die interessanten Diskussionen, auch in persönlichen Angelegenheiten und viele durchlachte Stunden möchte ich mich ganz herzlich bei der Gruppe des Büros 501 bedanken. Mein besonderer Dank gilt Anita, für ihr Verständis, ihre zahllosen wertvollen Ratschläge und ihre unbeschreibliche Hilfsbereitschaft. Ein riesengroßes Dankeschön geht vor allem an Franco, der mir nicht nur im Labor, sondern auch privat als toller Mensch zur Seite stand.

Ganz lieben Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Begleitung während meiner gesamten Promotionszeit.

An letzter Stelle und für mich immer an erster Stelle stehend, möchte ich meinen Eltern und Tim danken. Meinen Eltern, die mir stets Zuflucht boten und die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben. Und Tim, der ganz viel Sonnenschein in mein Leben gebracht hat und die Höhen und Tiefen dieser Zeit abpuffern musste. Ohne Euch wäre das alles hier nicht möglich gewesen. Danke, dass es euch gibt.

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

A. Mandrysch, C. Poojari, F. Kovačić, B. Strodel, K.-E. Jaeger, *Comparative Structural Analysis of Carboxylesterases from Psychrotolerant, Mesophilic, and Thermophilic bacteria,* Manuskript in Vorbereitung

Inhaltsverzeichnis

Akürzungsverzeichnis ____ *I*

Abbildungsverzeichnis ____ *II*

Tabellenverzeichnis ____ *IV*

1 Einleitung ____ *1*

1.1 Extremophilie – mikrobielle Anpassungsfähigkeit an extreme Umweltbedingungen ____ **1**

1.2 Leben unter extremen Temperaturen ____ **2**

1.2.1 Extremozyme – wertvolle Biokatalysatoren bei extremen Temperaturen ____ 4

1.2.2 Molekulare Adaption von Enzymen an extreme Temperaturen ____ 5

1.2.3 Herangehensweisen zur Analyse der molekularen Mechanismen der Temperatur–Adaption ____ 7

1.3 Analyse der Temperatur-Adaption anhand der evolutionär konservierten Struktur der α/β-Hydrolase-Faltung ____ **9**

1.3.1 Struktur und katalytischer Mechanismus lipolytischer Enzyme ____ 11

1.3.2 Biotechnologische Relevanz psychrophiler und thermophiler lipolytischer Enzyme ____ 13

1.3.3 Die thermophile Esterase Est2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* ____ 16

1.4 Zielsetzung ____ **18**

2 Material und Methoden ____ *19*

2.1 Chemikalien und Enzyme ____ **19**

2.2 Bakterienstämme ____ **20**

2.3 Plasmide ____ **20**

2.4 Oligonukleotide ____ **21**

2.5 Nährmedien und Zusätze ____ **23**

2.6 Puffer und Lösungen ____ **26**

2.7 Reaktions- und Nachweis-Kits ____ **27**

2.8 Geräte ____ **27**

2.9 Computerprogramme und Online-Datenbanken ____ **28**

2.10 Mikrobiologische Methoden 29
2.10.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien 29
2.10.2 Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) in Überexpressionskulturen 30
2.11 Genetische Methoden 31
2.11.1 Isolierung von Nukleinsäuren 31
2.11.2 In vitro-Rekombination von DNA 31
2.11.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren 31
2.11.4 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 32
2.11.5 *Overlap-extension* PCR (OE-PCR) 32
2.11.6 DNA-Sequenzierung 33
2.11.7 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA 34
2.12 Proteinbiochemische Methoden 34
2.12.1 Zellaufschluss zur Proteinisolierung 34
2.12.2 Aufreinigung von löslichen Proteinen mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) 34
2.12.3 Denaturierung und *in vitro* Renaturierung von *inclusion bodies* 34
2.12.4 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen 35
2.12.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen 35
2.12.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 36
2.12.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen 36
2.12.8 MALDI-TOF-MS-Analyse von Proteinen 37
2.13 Enzymaktivitätstests 38
2.13.1 Messung der Esterase-Aktivität durch Hydrolyse von *para*-Nitrophenyl-Substraten 38
2.13.2 Temperaturabhängigkeit der Aktivität 39
2.13.3 Temperatur-Stabilität 39
2.14 Homologiemodellierung und molekulardynamische Simulationen 40

3 Ergebnisse und Diskussion 41

3.1 Systematische Auswahl einer Serie homologer lipolytischer Enzyme mit differentem Temperatur-Ursprung 41
3.1.1 Auswahl der thermophilen Esterase Est2 als Basis der komparativen Analyse 42
3.1.2 Auswahl von Est2-homologen lipolytischen Enzymen aus *B. thailandensis, Pseudomonas sp.* B11-1 und *S. halifaxensis* 45
3.1.3 Verifizierung der strukturellen Ähnlichkeit von Est2, LipB, LipP und LipS auf Basis von Kristall- und Modell-Strukturen 48
3.1.4 Zusammenfassung: Auswahl einer Serie homologer lipolytischer Enzyme mit differentem Temperatur-Ursprung 53

3.2 Klonierung, Expression und Identifizierung der Est2-Homologen LipB, LipP und LipS 56

3.2.1 Konstruktion von Plasmiden zur Expression der Est2-Homologen LipB, LipP und LipS 56

3.2.2 Heterologe Überexpression der Est2-Homologen und deren Reinigung mittels Affinitätschromatographie 57

3.2.3 Zusammenfassung: Klonierung, Expression und Identifizierung der Est2-Homologen LipB, LipP und LipS 63

3.3 Biochemische Charakterisierung der Est2-Homolgen $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ 64

3.3.1 $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ zeigen vergleichbare Esterase-Substratspezifitäten 64

3.3.2 $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ haben verschiedene Temperatur-Optima 66

3.3.3 Unterschiede der Temperaturstabilität der Est2-Homologen $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ 69

3.3.4 Zusammenfassung: Biochemische Charakterisierung der Est2-Homologen $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ 72

3.4 In silico Analyse thermisch relevanter Molekül-Eigenschaften von Est2, LipB, LipP und LipS 74

3.4.1 Komparative Analyse der Zusammensetzung und Interaktionen der Aminosäuren von Est2, LipB, LipP und LipS 74

3.4.2 Identifizierung thermisch relevanter Sekundärstrukturelemente 77

3.4.3 Untersuchung der Flexibilität von Est2, LipB, LipP und LipS durch molekular-dynamische Simulationen 80

3.4.4 Zusammenfassung: In silico Analyse thermisch relevanter Molekül-Eigenschaften von Est2, LipB, LipP und LipS 84

3.5 Untersuchung der molekularen Mechanismen der Temperatur-Adaption durch rationales Proteindesign 86

3.5.1 Strategie zur Erzeugung der Est2- und LipS-Loop-Varianten 86

3.5.2 Konstruktion der Est2- und LipS-Loop-Varianten mittels OE-PCR 88

3.5.3 Expression und Reinigung der Est2- und LipS-Loop-Varianten 89

3.5.4 Einfluss der Temperatur auf die Stabilität und Aktivität der Est2-Loop-Varianten 95

3.5.5 Zusammenfassung: Untersuchung der molekularen Mechanismen der Temperatur-Adaption durch rationales Proteindesign 99

4 Zusammenfassung 102

5 Summary 104

6 Literaturverzeichnis 106

7 Anhang 127

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
∞	unendlich
3D	dreidimensional
°C	Grad Celsius
λ	Lambda
µ	Mikro (10^{-6})
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Å	Angström
A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. dest.	*Aqua destillata*
AIM	Autoinduktionsmedium
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxyterminus
kDa	Kilo-Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)
dNTP	Desoxynucleosid-5`-Triphosphate
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen & Zellkulturen
EC	*enzyme code*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere (*et alii, et aliae*)
EtOH	Ethanol
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GZE	Gesamt-Zell-Extrakt(e)
GZL	Ganz-Zell-Lysat(e)
h	Stunde
HPLC	*High-performance-liquid-chromatography*
HRP	*Horderadish peroxidase*
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalacto-pyranosid
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Luria-Bertani Broth
M	Molar
mA	Milliampere
max.	maximal
mg	Milligramm
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Molekulargewicht
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	Nano-Sekunde
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
Opt.	Optimum
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*)
pH	pH-Wert ($-\log_{10}[H^+]$)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RMSD	*Root-mean-square deviation*
RMSF	*Root-mean-square fluctuation*
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamn
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitol-monolaurat
U	Unit
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v	Version
v/v	Volumen pro Volumen (*volume per volume*)
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen (*weight per volume*)
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1: Darstellung der α/β-Hydrolase-Faltung (Bornscheuer, 2002). 10
Abb.1.2: Reaktionsmechanismus von Esterasen und Lipasen nach Jaeger *et al*. (1999). 12
Abb.1.3: Dreidimensionale Struktur und schematischer Aufbau von Est2 aus *A. acidocaldarius* nach De Simone *et al*. (2000). 17

Abb.3.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Est2 und dessen Homologen LipB, LipP und LipS. 47
Abb.3.2: Überlagerung der Protein-Struktur von Est2 mit den Homologiemodellen von LipB, LipP und LipS. 50
Abb.3.3: Das konservierte aktiven Zentrums von Est2, LipB, LipP und LipS. 52
Abb.3.4: Auswahlstrategie für eine Serie homologer lipolytischer Enzyme. 53
Abb.3.5:Übereinstimmungen und Unterschiede der vier homologen lipolytischen Enzyme. 54
Abb.3.6: Esterase Aktivität von GZE der Expressionen von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ bei 37° C und IPTG-Induktion. 58
Abb.3.7: Esterase Aktivität von GZE bei Expressionen von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ unter verschieden Temperatur- und Induktionsbedingungen. 60
Abb.3.8: Esterase Aktivität von fraktionierten *E. coli*-Extrakten nach Expression bei 15 °C in Autoinduktionsmedium. 61
Abb.3.9: SDS-PAGE-Analyse der Überexpressionen von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ bei 15 °C nach Fraktionierung und nach der immobilisierende Metall-Affinität-Chromatographie (IMAC). 62
Abb.3.10: Spezifischen Aktivitäten von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ gegenüber Nitrophenyl-Estern unterschiedlicher Kettenlänge. 65
Abb.3.11: Temperaturoptimum von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$. 67
Abb.3.12: Temperaturstabilitäten der Enzyme $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$. 70
Abb.3.13: Vergleich der Sekundärstrukturelemente von Est2 und dessen Homologen LipB, LipP und LipS. 78
Abb.3.14: Detaildarstellungen der Überlagerungen von Loop 2 und Loop 12 von Est2 und dessen Homologen LipB, LipP und LipS. 79
Abb.3.15: RMSD-Werte der Cα-Atome als Funktion der Zeit für MD Simulation von Est2, LipB, LipP und LipS bei 30 °C. 81
Abb.3.16: RMSD-Werte der Cα-Atome aller Aminosäuren der MD Simulation von Est2, LipB, LipP und LipS bei verschiedenen Temperaturen. 82
Abb.3.17: RMSF-Werte der Cα-Atome aller Aminosäuren der MD Simulationen von Est2, LipB, LipP und LipS bei verschiedenen Temperaturen. 84
Abb.3.18: Zusammenfassende Darstellung der Untersuchung der molekularen Gründe für die Temperatur-Adaption. 85
Abb.3.19: Schematische Darstellung von Est2- und LipS-Loop-Varianten. Dargestellt sind die Konstrukte der jeweiligen Varianten. 87

Abb.3.20: Schematische Darstellung der *overlap extension* PCR zur Erzeugung von Loop-Varianten von *est2* und *lipS.* 88
Abb.3.21: SDS-PAGE-Analyse der Überexpressionen der Est2-Mutanten nach Fraktionierung. 89
Abb.3.22: Esterase Aktivität von fraktionierten *E. coli*-Extrakten der Est2-Mutanten. 90
Abb.3.23: Reinigung der Est2-Mutanten durch IMAC. 91
Abb.3.24: SDS-PAGE-Analyse der Überexpressionen der LipS-Mutanten nach Fraktionierung. 92
Abb.3.25: Esterase Aktivität von fraktionierten *E. coli*-Extrakten der LipS-Mutanten. 93
Abb.3.26: Temperaturstabilitäten von Est2 und dessen Loop-Mutanten. 96
Abb.3.27: Schematische Darstellung der erzeugten Est2-Loop-Mutanten und der Auswirkungen des Austauschs von Loop 2 und 12 auf die Thermostabilität. 100

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Studien zur Temperatur-Adaption von Enzymen mit Betrachtungen des gesamtenTemperaturbereiches. ... 8
Tab. 1.2: Charakterisierungen von Lipasen und Esterasen aus (hyper)thermophilen Organismen nach Fucinos *et al.* (2012). ... 14
Tab. 1.3: Charakterisierungen von Lipasen und Esterasen aus psychrophilen Organismen nach Fucinos *et al.* (2012). ... 15

Tab. 2.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme ... 20
Tab. 2.2: Übersicht über verwendete Plasmide ... 20
Tab. 2.3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide ... 21
Tab. 2.4: Stammlösung und Endkonzentrationen der verwendeten Antibiotika in verschiedenen Bakterienstämmen ... 25
Tab. 2.5: Übersicht über die verwendeten Geräte ... 27
Tab. 2.6: Übersicht über das in der *Overlap-Extension* PCR verwendete Cycler-Programm ... 33
Tab. 2.7: Übersicht über die in der *Overlap-Extension* PCR verwendeteOlgonukleotiden ... 33
Tab. 2.8: Übersicht der verwendeten Renaturierungpuffer ... 35
Tab. 2.9: Zusammensetzung der SDS-Gele ... 36

Tab. 3.1:Potentielle lipolytische Template-Enzyme und ihre Homologen ... 43
Tab. 3.2: Homologe Serie lipolytischer Enzyme mit differentem Temperatur-Ursprung ... 46
Tab. 3.3: Ergebnisse der Überexpression, Reinigung und Identifikation von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$. ... 63
Tab. 3.4: Biochemische Charakteristika von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$, $LipS_{H6}$ und Est2 ... 72
Tab. 3.5: Aminosäuren-Zusammensetzung von Est2, LipB, LipP und LipS. ... 75
Tab. 3.6: Anzahl der Wechselwirkungen innerhalb von Est2, LipB, LipP und LipS ... 76
Tab. 3.7: Vergleich der RMSD-Werte der Loop 2 und Loop 12 Strukturen der Proteine Est2, LipB, LipP und LipS ... 83

1 Einleitung

1.1 Extremophilie – mikrobielle Anpassungsfähigkeit an extreme Umweltbedingungen

Rund um den Globus gibt es eine enorme Diversität an Ökosystemen. Hierzu zählen auch ökologische Nischen, die extreme Umgebungen und Lebensbedingungen mit sich bringen können, welche aus der Sicht des Menschen physikalische Grenzen des Lebens darstellen. Im Jahre 1969 sorgte Thomas Brock durch die Entdeckung von *Thermus aquaticus* in heißen Quellen des Yellowstone National Parks für eine wissenschaftliche Sensation (Brock & Freeze, 1969). In den vergangen Jahren wurden immer mehr Mikroorganismen isoliert, die den extremen Launen der Natur trotzen können. Entdeckt wurden sie unter anderem in kilometerdickem Eis von Gletschern, in ätzenden Säureseen, in den Tiefen der Ozeane, in stark salzhaltigen Gewässern und sogar in hochgiftigem radioaktivem Abfall (Madigan & Marrs, 1997).

Diese Organismen haben sich über Jahrmillionen hinweg an extreme Standorte angepasst, weswegen sie unter dem Begriff Extremophile zusammengefasst werden (Cavicchioli, 2002). Diese Extremophilen werden nach den außergewöhnlichen Bedingungen ihres Habitats klassifiziert. Sie überleben bei sehr hohen oder sehr niedrigen Temperaturen (Thermo- bzw. Psychrophile), extrem hohem hydrostatischem Druck (Barophile) oder hohen Salzkonzentrationen (Halophile) (Pikuta *et al.*, 2007).

Hinter der Fähigkeit in solchen Umgebungen überleben zu können, verbergen sich individuelle vielfältige Anpassungsmechanismen. Diese Mechanismen erfordern ein stabiles Milieu innerhalb der Zelle, sodass Stoffwechselreaktionen ungestört ablaufen können. Entsprechende regulatorische und strukturelle Anpassungen findet man in den Eigenschaften biologischer Strukturen wie Membranen, Proteinen oder Nukleinsäuren der Zelle. Diese Schutzmechanismen, welche die Wirkungen der extremen Umwelt abwehren, sind bei weitem noch nicht vollständig verstanden. Die adaptiven Veränderungen sind im genetischen Material codiert und machen diese Organismen aus evolutionsgeschichtlicher Hinsicht zu interessanten Forschungsobjekten. Ihre Lebensbedingungen kommen denen der frühen Erdgeschichte nah, wodurch sie zur Aufklärung von Fragen nach der Entstehung des Lebens beitragen können.

Die außergewöhnlichen Eigenschaften der Extremophilen machen sie zu interessanten Objekten für die Biotechnologie. Ihre bioaktiven Komponenten haben große Toleranzen gegenüber harschen Konditionen biotechnologischer und industrieller Verfahren.

Die evolutionären und molekularen Grundlagen ihrer Biodiversität und der mögliche Einsatz in zukunftsweisende Technologien machen Extremophile zu höchst interessanten

Forschungsobjekten. Die Aufklärung ihrer komplexen adaptiven Eigenschaften kann ein tieferes Verständnis der Evolution und Erhaltung von Biodiversität ermöglichen.

1.2 Leben unter extremen Temperaturen

Die Temperatur ist einer der wichtigsten Umweltfaktoren für das Leben, da sie Diffusion, Membranfluiditäten, Stabilitäten von Nukleinsäuren und Proteinen und die Löslichkeit von Salzen und Gasen beeinflusst (Lee *et al.*, 2007). Unter den Extremophilen haben Organismen mit Habitaten extremer Temperaturen große Aufmerksamkeit erregt.

Der größte Teil der Organismen lebt bei moderaten Temperaturen zwischen 20 °C und 40 °C. Die Detektion von natürlichen Temperaturen zeigt ein weitaus größeres Spektrum. Im Jahre 1983 wurde im antarktischen Russland die tiefste Temperatur von -89,2 °C gemessen, aktive Vulkane hingegen zeigten Temperaturen von ~ 2000 °C (Feller, 2010). Diese extremen Temperaturen konnten bislang mit keiner Form von Leben in Verbindung gebracht werden. Theoretische obere Grenzen des Lebens werden bei 140-150 °C gesetzt, da hier essentielle Biomoleküle, wie der Energieträger ATP, zerstört werden würden (Cowan, 2004). Die höchste Temperatur, bei der lebendige Organismen entdeckt werden konnten, ist nicht weniger beeindruckend. Der derzeitige Hitzerekord ist einem Mikroorganismus der Archaen zuzuordnen (*Methanopyrus kandleri)*, welcher trotz Temperaturen von 122 °C zu Wachstum befähigt ist und an vulkanischen Schloten (*Black Smoker*) am Meeresgrund des Pazifiks entdeckt wurde (Takai *et al.*, 2008). Weitere Organismen, die an hohe Temperaturen adaptiert sind, isolierten Wissenschaftler aus schwefelsauren oder vulkanisch aktiven Gebieten, heißen Quellen und hydrothermalen Tiefsee-Spalten (Huber *et al.*, 1990).

Am anderen Ende der Temperaturskala steht die Kälte, die den größten Teil der Biosphäre ausmacht. Grund hierfür ist die Tatsache, dass 70 % der Erdoberfläche mit Wasser bedeckt ist, wovon 90 % kälter als 5 °C sind (Feller & Gerday, 2003; Methe *et al.*, 2005). Weiterhin ist 25 % der Landoberfläche permanent gefroren, zu denen Gletscher, alpine Regionen, Höhlen und Permafrost-Böden polarer Regionen zählen (de los Rios *et al.*, 2007; Deming, 2002; Steven *et al.*, 2006; Stibal *et al.*, 2006). Dieser kalte Teil der Biosphäre schließt keineswegs mikrobielles Wachstum aus. Mikroorganismen aller drei Domänen des Lebens (Bakterien, Archaen und Eukaryoten) wurden bisher aus diesen kalten Umgebungen isoliert (Siddiqui & Cavicchioli, 2006). Der Rekord bakteriellen Wachstums bei niedrigen Temperaturen liegt bei -12 °C für das Bakterium *Psychromonas ingrahamii*, das aus Meereis in Alaska isoliert wurde. Bei diesen Temperaturen besitzt dieses Bakterium eine Generationszeit von 240 Stunden, wobei diese bei 5 °C zwölf Stunden beträgt (Breezee *et al.*, 2004).

Anhand ihrer Temperaturansprüche können Mikroorganismen grundsätzlich in die drei Hauptgruppen Thermophile, Mesophile und Psychrophile klassifiziert werden. Thermophile können bei Temperaturen über 55 °C optimal wachsen (Basu & Sen, 2009). Manche von ihnen, die Hyperthermophilen bevorzugen Temperaturen über 80 °C (Stetter, 1999). Von den Wärme-liebenden Organismen werden die Psychrophilen unterschieden. Nach Morita (1975) haben Psychrophile ein Temperaturminimum von < 0 °C und ein Temperaturmaximum von > 20 °C, wobei ihr Optimum meist um 15 °C liegt. Differenziert werden hier die so genannten psychrotoleranten Organismen, die insgesamt ein breiteres Temperaturspektrum als die Psychrophilen haben (0-30 °C). Sie können zwar bei niedrigen Temperaturen wachsen, mögen es aber wärmer und haben ihr Temperaturoptimum über 20 °C (Casanueva *et al.*, 2010). Den größten Anteil der Mikroorganismen machen die Mesophilen aus, deren moderate Temperaturansprüche zwischen den Psychrotoleranten und Thermophilen liegen.

Obwohl die Lebensräume psychrophiler und thermophiler Organismen sehr lebensfeindlich zu sein scheinen, findet man in diesen Umgebungen erstaunlich viele und verschiedenste Mikroorganismen. Dies belegt die Existenz von einer Vielzahl von Anpassungsmechanismen (Lebedinsky *et al.*, 2007; Margesin & Miteva, 2011).

Thermophile Organismen haben einige Mechanismen zur Erhöhung der Schmelztemperatur ihrer Nukleinsäuren entwickelt. Hierzu zählen unter anderem der erhöhte GC-Gehalt der DNA, sowie Proteine, die sich an die DNA anlagern, Reparatursysteme und posttranskriptionale Modifikationen der RNA (Charlier & Droogmans, 2005).

Ein Adaptionsmechanismus Kälte-liebender Organismen betrifft die Zellmembranen. Durch Kälte werden biologische Membranen weniger dynamisch, wodurch Substrate und Nährstoffe diese Barrieren schlechter passieren können. Durch eine veränderte Zusammensetzung der Zellmembranen können Psychrophile und Psychrotolerante die Membranfluidität und Permeabilität erhöhen. Die Zusammensetzung thermophiler Membranen hingegen sorgt für mehr Rigidität (D'Amico *et al.*, 2006; Imanaka, 2011).

Dies sind nur einige der möglichen adaptiven Mechanismen, die die Integrität der Zelle schützen und die notwendigen Stoffwechselprozesse ermöglichen. Dabei sind für die chemischen Reaktionen dieser Vorgänge die Enzyme dieser Organismen von essentieller Bedeutung. Sie tragen an zahlreichen Stellen durch den Erhalt ihrer Funktion am stärksten zur Adaption an extreme Temperaturen bei.

1.2.1 Extremozyme – wertvolle Biokatalysatoren bei extremen Temperaturen

Psychrophile und thermophile Organismen sind im thermischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung und ihre Zellkomponenten müssen entsprechend angepasst sein, was ein großes Spektrum an sequenziellen, strukturellen und physiologischen Anpassungen erfordert. Der Schlüssel hierfür ist die Aktivität-Stabilität-Beziehung von Enzymen, welche die notwenigen metabolischen Umwandungen bewerkstelligen. Als natürliches Ergebnis produzieren diese Organismen spezifische Biokatalysatoren, so genannte Extremozyme, welche unter Bedingungen, bei denen ihre mesophilen Gegenstücke nicht bestehen könnten, stabil und funktionell sind.

Die außerordentliche Stabilität gegenüber extremen Temperaturen dieser Extremozyme weckte das Interesse der Industrie und Biotechnologie. Die wohl bekannteste Anwendung hitzetoleranter Enzyme sind Polymerasen zur Amplifizierung von DNA, wobei sich diese Anwendung längst nicht mehr auf die *Taq*-Polymerase aus *T. aquaticus* beschränkt. Neben Anwendungen in der Analytik finden thermostabile Enzyme auch Verwendungen in der Industrie. Die erhöhten Temperaturen bieten viele Vorteile in der Verfahrenstechnik. Höhere Temperaturen verbessern etwa die Löslichkeit polymerer Substrate, die Viskosität von Lösungen nimmt ab und es kommt zur Erhöhung von Diffusionsraten. Ein weiterer Vorteil ist das verringerte Risiko von Kontaminationen, das für Prozesse der Lebensmittelindustrie und Pharmazie maßgebend ist. Auch bei der Erzeugung von Brennstoffmaterialien aus Biomasse zur Erdöl-unabhängigen Energiegewinnung sind thermostabile Extremozyme von Bedeutung (Turner *et al.*, 2007; Viikari *et al.*, 2007). Weitere Anwendungen finden sich in der Waschmittelindustrie (Proteasen, Lipasen), Futtermittelindustrie (Phytase) und zahlreichen anderen industriellen Gebieten (Bruins *et al.*, 2001; de Miguel Bouzas *et al.*, 2006; Haki & Rakshit, 2003; Vieille & Zeikus, 2001).

Psychrophile Enzyme ermöglichen durch ihren Einsatz bei niedrigen Temperaturen Einsparungen im Energieaufwand bei heizaufwendigen Prozessen. Dies wird besonders in der Waschmittelindustrie deutlich, da Kälte-liebende Proteasen, Amylasen, Zellulasen und Lipasen das Waschen bei niedrigeren Temperaturen ermöglichen (Gerday *et al.*, 2000). Die Denaturierung psychrophiler Enzyme bei moderaten Temperaturen ermöglicht deren schnelle Inaktivierung. So haben in der Textilindustrie Kälte-tolerante Zellulasen gegenüber ihren mesophilen Gegenstücken den Vorteil, dass sie nicht durch erhöhte Temperaturen inaktiviert werden müssen. Hierdurch werden ungünstige Veränderungen der Gewebe vermieden (Marx *et al.*, 2007). Die Reduzierung der Temperaturen durch den Einsatz psychrophiler Enzyme kann außerdem vor einer Kontamination von mesophilen Mikroorganismen und Degenerierung thermosensitiver Komponenten schützen. Diese Eigenschaften hat sich die Lebensmittelindustrie zu nutzen gemacht. Für die Herstellung Laktose-freier Produkte werden Kälte-tolerante β-Galaktosidasen genutzt, aber auch bei der

Klärung von Fruchtsäften (Pektinasen), in der Backwarenindustrie (Amylasen) und bei der Herstellung von Zusatzstoffen wie Vanillin (Ferulasäureesterasen) werden psychrophile Enzyme eingesetzt (Feller, 2013; Feller & Gerday, 2003; Huston, 2008; Mathew & Abraham, 2004; Russell & Barton, 1992; Tutino *et al.*, 2009).

Der Einsatz von Kälte- und Wärme-adaptierten Extremozymen ist sehr vielfältig und vorteilhaft. Dabei ist die Möglichkeit, diese Enzyme in der Industrie und Biotechnologie einzusetzen, unbegrenzt. Die Erforschung neuer Extremophiler und ihrer Enzyme kann also zur ökonomischen und ökologischen Optimierung verschiedenster Anwendungen führen und die Etablierung neuer Prozesse ermöglichen.

1.2.2 Molekulare Adaption von Enzymen an extreme Temperaturen

Die Fähigkeit von Kälte- und Wärme-adaptierten Enzymen bei extremen Temperaturen ihre katalytische Aktivität und Stabilität nicht zu verlieren, macht sie neben dem industriellen Einsatz auch interessant für die Erforschung ihrer adaptiven Mechanismen. In den letzten Jahren wurden diese Mechanismen eingehend studiert. Die Adaptionen an extreme Temperaturen auf molekularer Ebene sind jedoch sehr vielfältig und nicht für jedes Enzym zutreffend, da keine generellen Faktoren der Aktivität und Stabilität beschrieben werden konnten.

Unter den zahlreichen Erklärungsansätzen hat sich die Hypothese der Korrelation von Temperatur und Rigidität bzw. Flexibilität sehr entwickelt. Diese besagt, dass die Konformation von psychrophilen Enzymen flexibler, also weniger rigide ist, wohingegen thermophile Enzyme zu verstärkter Rigidität neigen (Gerday *et al.*, 2000). Psychrophile Enzyme sind bei niedrigen Temperaturen vergleichsweise aktiv zu ihren mesophilen Gegenstücken. Dies bewerkstelligen sie durch die Anpassung ihrer katalytischen Parameter. Die Schwächung der Substratbindung bewirkt, dass die notwendige Aktivierungsenergie der katalytischen Reaktion gesenkt wird, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird. Hierbei wird die geschwächte Substratbindungen und der gleichzeitig verbesserte Zugang zum aktiven Zentrum durch die erhöhte Flexibilität der Struktur erzielt (D'Amico *et al.*, 2006; Siddiqui & Cavicchioli, 2006). Da flexible Proteinbereiche markante Strukturregionen der Proteinentfaltung sind (Vieille & Zeikus, 2001), wirkt die verstärkte Rigidität der thermophilen Enzyme deren Denaturierung bei hohen Temperaturen entgegen.

Um diese notwenige Rigidität oder Flexibilität gewährleisten zu können, weisen psychrophile und thermophile Enzyme spezifische Modifikationen auf, die zur Schwächung oder Stärkung der Struktur des Proteins beitragen können. Diese Modifikationen scheinen nahezu

unbegrenzt in ihrer Zahl zu sein, so dass im Folgenden nur solche adaptiven Mechanismen beschrieben werden, die in mehreren Studien bestätigt werden konnten.

Zusammensetzung der Aminosäuren

Durch Vergleichsstudien der Aminosäuresequenzen von psychrophilen, mesophilen und thermophilen Proteinen und ganzer Genome konnten Unterschiede des Gehaltes einiger Aminosäuren identifiziert werden. Hierzu zählen der Gehalt an Prolin und Arginin, der von psychrophilen zu thermophilen Enzymen ansteigt. Häufungen von Glycin befinden sich hingegen verstärkt in Kälte-liebenden Enzymen. Besonders Prolin trägt zu einer dichteren Packung der Struktur bei, was durch seine limitierten Konformationen bedingt ist (Prajapati *et al.*, 2007; Sriprapundh *et al.*, 2000). In thermophilen Enzymen gibt es mehr hydrophobe Aminosäuren, bevorzugt im Proteininneren. Die Proteinoberfläche hingegen enthält mehr geladene Aminosäuren (Muslin *et al.*, 2002).

Intramolekulare Wechselwirkungen

Die Betrachtung von Wechselwirkungen der Aminosäureresten in dreidimensionalen Strukturen führte zu der Feststellung, dass thermophile Enzyme mehr Wechselwirkungen innerhalb des Proteins aufweisen, als ihre mesophilen oder psychrophilen Gegenstücke. Hierzu zählt nicht nur die Anzahl der Wechselwirkungen, sondern auch die Verteilung dieser innerhalb der Struktur. Die vermehrten nicht kovalenten Wechselwirkungen wie elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Interaktionen, befinden sich bevorzugt an der Proteinoberfläche. Dieses verbesserte Netzwerk trägt zur Erhöhung der Rigidität bei, da die Brechung von Bindungen stets ein energetisch ungünstiger Prozess ist (Kumar *et al.*, 2000; Sælensminde *et al.*, 2009; Strickler *et al.*, 2006). Auch die vermehrte Anzahl von Disulfidbrücken in thermophilen Enzymen wurde beobachtet, da diese die Entropie des ungefaltenen Zustandes absenken (Siddiqui & Cavicchioli, 2006).

Strukturelle Anpassungen

Die Untersuchung der strukturellen Anpassungsmechanismen rückte die Eigenschaften der Proteinoberfläche in den Vordergrund. Besonders die Oberflächenloops weisen Substitutionen in den thermophilen und Insertionen in den psychrophilen Enzymen auf. Diese Lösungsmittel-exponierten Bereiche stellen einerseits kritische Punkte der Entfaltung dar, anderseits ermöglichen sie durch ihre Länge, Zusammensetzung und Konformation die Erhöhung der Rigidität bzw. Flexibilität der Proteine (Balasco *et al.*, 2013; Fields & Somero,

1998). So ist es auch erklärbar, dass bei thermophilen Loops häufiger Proline vorkommen (Charlier & Droogmans, 2005).

Diese genannten Modifikationen sind bei der Betrachtung der gesamten Struktur und deren intramolekularen Bedingungen sehr geringfügig. Diese kleinen Veränderungen können jedoch eine große Wirkung auf die thermischen Eigenschaften eines Proteins ausüben. So bewirken Substitutionen einzelner Aminosäuren nicht die Veränderung der gesamten Struktur, sondern meistens Modifikationen von hydrophoben Interaktionen oder von Wasserstoffbrückenbildungen. Diese Wechselwirkungen können so zur Stabilisierung oder Destabilisierung der gesamten Struktur beitragen. Viele Mechanismen werden auch kontrovers diskutiert, da es schwierig ist, die Daten zu generalisieren. Besonders die experimentellen Aspekte zur Untersuchung der Proteinflexibilität sind sehr komplex (Mamonova *et al.*, 2013).

1.2.3 Herangehensweisen zur Analyse der molekularen Mechanismen der Temperatur–Adaption

Bei der Untersuchung der molekularen Mechanismen von Enzymen zur Temperatur-Adaption ist die Strategie entscheidend. Bioinformatische Ausgangspunkte nutzen oftmals eine Vielzahl von Protein- oder Genom-Sequenzen von Enzymen oder Organsimen unterschiedlichen Temperatur-Ursprungs. Diese Strategien führen zur Erörterung von tendenziellen Aminosäure-Verteilungen bei bestimmten Temperaturbereichen (Adekoya *et al.*, 2006; De Vendittis *et al.*, 2008; Metpally & Reddy, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Andere Studien versuchen, die adaptiven Veränderungen in molekularen Wechselwirkungen und Dynamik der Enzyme zu verstehen (Mereghetti *et al.*, 2010; Paredes *et al.*, 2011). Hierfür werden dreidimensionale Protein-Strukturen genutzt. Die resultierenden Erklärungsansätze der adaptiven Mechanismen dieser systematischen Sequenz- und Struktur-Vergleiche sind jedoch theoretischer Natur, da meist experimentelle Nachweise fehlen.

Die meisten experimentellen Strategien hingegen basieren zunächst auf der Isolierung eines neuen extremophilen Enzyms. Nach darauffolgender Charakterisierung dieses Enzyms wird zu diesem Enzym ein passendes homologes, mesophiles oder extremophiles, Enzym identifiziert. Anschließende vergleichende Analysen können Aufschluss über die adaptiven Mechanismen geben. Die Studien beschränken sich vorwiegend auf den moderaten und nur einen extremen Temperaturbereich (psychrophil oder thermophil). In solcher Art wurden Studien über HSL-Enzyme, Acetatkinasen, Endonukleasen, Malatdehydrogenasen, Uracil-DNA Glycosylasen und Ribonukleasen durchgeführt und die adaptiven Unterschiede

theoretisch und experimentell erörtert (Altermark *et al.*, 2007; Mandrich *et al.*, 2004; Metpally & Reddy, 2009; Olufsen *et al.*, 2005; Ratcliff *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012). Auffallend ist hierbei, dass diese Ansätze vermehrt aus Vergleichen thermophiler und mesophiler Organismen bestehen.

Strategien, die homologe Enzyme aus dem gesamten Temperaturspektrum implizieren, scheinen die Ausnahme zu sein (Tab. 1.1). Ein Grund hierfür sind die thermolabilen Eigenschaften psychrophiler Enzyme, welche Schwierigkeiten im Umgang und in Kristallisationsexperimenten verursachen können.

Tab. 1.1: Vergleich zur Temperatur-Adaption von Enzymen über einen weiten Temperaturbereich.

	Temperaturbereich der Wirtsorganismen			
Enzym	**psychrophil (psychrotolerant)**	**Mesophil**	**thermophil**	**Referenz**
α-Amylase	*Pseudoalteromonas haloplanktis*	Schweine-Pankreas	*Bacillus amyloliquefaciens*	D'Amico *et al.* (2003)
Adenylat-Kinase	*Bacillus globisporus*	*Bacillus subtilis*	*Bacillus stearothermophilus*	Bae & Phillips (2004)
Citrat-Synthase	*Arthrobacter* DS2–3R	Schwein	*Sulfolobus solfataricus*	Bell *et al.* (2002)
DNA-Ligase	*P. haloplanktis*	*Escherichia coli*	*Thermus scotoductus*	Georlette *et al.* (2003)
3-Isoprpylmalate Dehydrogenase	*Vibrio sp.* 15	*Escherichia coli*	*Thermus thermophilus*	Svingor *et al.* (2001)
Xylanase	*P. haloplanktis*	*Streptomyces* sp. S38	*Scopulariopsis sp.*	Collins *et al.* (2003)

Einen ebenso entscheidenden Faktor stellt die phylogenetische Distanz der homologen Wirtsorganismen dar. Komparative Analysen, in denen Enzyme von Schweinen oder Fruchtfliegen mit denen aus Bakterien verglichen werden, sind durch große evolutionäre Distanzen geprägt, wodurch das Auffinden genereller Regeln der adaptiven Veränderungen erschwert wird (Arnold *et al.*, 2001). Auf der anderen Seite kann die Auswahl von homologen Enzymen mit sehr nahem phylogenetischem Ursprung ebenso hinderlich sein, da hier womöglich die adaptiven Mechanismen Spezies-spezifisch sind und damit keinen Aufschluss über grundlegende Prinzipien geben können.

Am Ende jeder Studie steht die Überprüfung der beobachteten möglichen adaptiven Modifikationen der Enzyme. Führten vergleichende Studien zur Identifizierung markanter

molekularer Unterschiede in homologen Enzymen, so können Mutationsexperimente den experimentellen Nachweis der funktionellen Bedeutung erbringen. Durch Substitution, Insertion oder Austausch einzelner Aminosäuren, Strukturbereiche und Domänen können so die für die Temperaturanpassung verantwortlichen Mechanismen verifiziert werden.

Manche Strategien setzen diese Mutationsstudien auch an den Beginn ihrer Analyse. Durch den Einsatz von Methoden zur gerichteten Evolution oder rationalem Proteindesign können entscheidende Positionen der Polypetidkette der Enzyme für die Aktivität und Stabilität bei extremen Temperaturen identifiziert werden (Arnold *et al.*, 2001).

Eine weitere Strategie, der so genannte *consensus approach,* identifiziert durch Sequenzvergleiche Modifikationen in ausschließlich konservierten Sequenzabschnitten homologer Enzyme, gefolgt von experimentellen Überprüfungen (Lehmann *et al.*, 2002).

Die interessantesten Ergebnisse der zahlreichen Strategien brachten jedoch solche Studien, die die strukturelle Konservierung der homologen Enzyme voraussetzen. Die Struktur eines Enzyms ist weitaus stärker konserviert als die Aminosäuresequenzen. Ein spezielles Strukturgerüst kann durch verschiedenste Sequenzen definiert werden. Vergleichende Studien mit homologen Enzymen unterschiedlichen Temperatur-Ursprungs, welche dieselben Strukturgerüste tragen, können die adaptiven Veränderungen zur Temperatur-Adaption verdeutlichen.

1.3 Analyse der Temperatur-Adaption anhand der evolutionär konservierten Struktur der α/β-Hydrolase-Faltung

Enzyme werden entsprechend ihrer katalytischen Funktion in sechs große Gruppen klassifiziert. Diese EC-Klassifizierung (*Enzymatic Commission Number*) impliziert keine Gruppierungen von strukturellen und evolutionären Merkmalen (Tipton & Boyce, 2000). Neben der EC-Klassifizierung können Enzyme auch durch ihre strukturellen Merkmale unterschieden werden. Durch diese Art von Klassifizierung können Verwandtschaftsgrade aufgeklärt werden, da die Strukturen von Proteinen stärker evolutionär konserviert sind als deren Reaktionsmechanismen und Aminosäuresequenzen (Caetano-Anolles *et al.*, 2009).

Es gibt zwei anerkannte Modelle zu der Frage, wie sich die verschiedenen Enzyme entwickelt haben. Das Modell der konvergenten Evolution beschreibt die Entstehung unterschiedlicher Enzyme durch parallele Entwicklungen von mehreren hypothetischen Vorläuferproteinen, die keine Homologien aufweisen. Das Modell der divergenten Evolution hingegen setzt voraus, dass sich verschiedene Enzyme aus nur einem hypothetischen Vorläuferprotein entwickelt haben (Glasner *et al.*, 2006).

Die divergente Evolution ermöglicht die Klassifizierung von Enzymen nach ihren Faltungsmotiven wie dem *TIM-barrel-Motiv*, der P-*loop* NTP Hydrolase-Faltung und der Ferredoxin- Faltung (Koonin *et al.*, 2002).

Ein weiteres bekanntes Beispiel von Faltungsmotiven ist die α/β-Hydrolase-Faltung (Abb. 1.1). Dieses kanonische Faltungsmotiv besteht klassischerweise aus 8 β-Strängen, wovon alle außer dem zweiten β-Strang parallel angeordnet sind. Diese β-Stränge sind wiederum von α-Helices eingeschlossen. Auch hier bildet der zweite β-Strang eine Ausnahme (Holmquist, 2000; Ollis *et al.*, 1992). Dieses stabile Gerüst ermöglicht strukturelle Anpassungen (Insertionen) für verschiedene Enzymaktivitäten, ohne die native α/β-Hydrolase-Faltung einbüßen zu müssen.

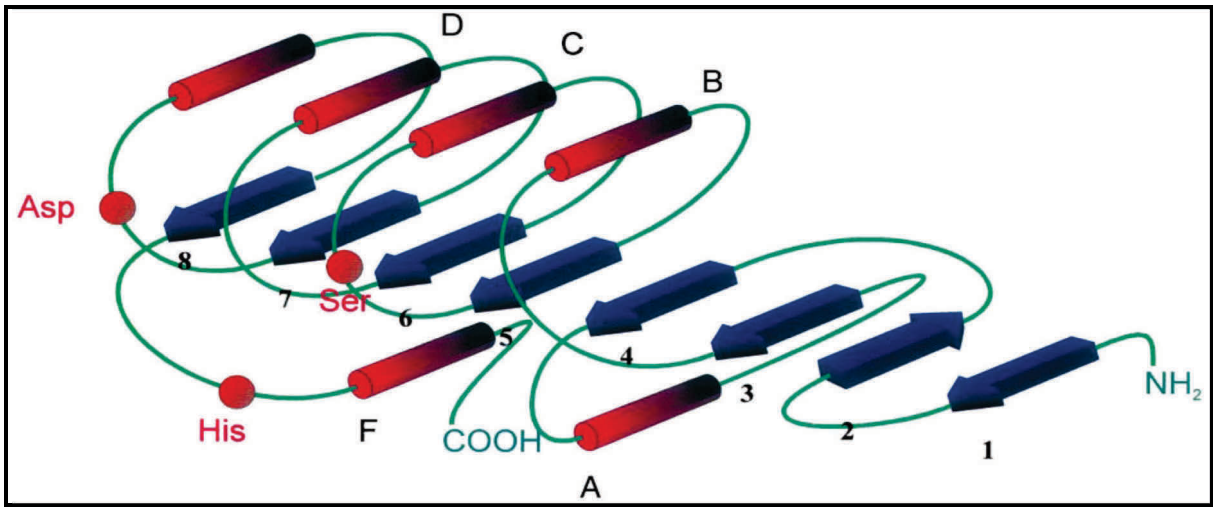

Abb.1.1: Darstellung der α/β-Hydrolase-Faltung (Bornscheuer, 2002). α-Helices sind in Rot dargestellt und mit Buchstaben markiert, β-Stränge sind in Blau dargestellt und mit Zahlen markiert, Loops in Grün dargestellt. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind durch rote Kreise kenntlich gemacht.

Diese Insertionen können ganze Domänen, wie die so genannte *lid* (Deckelstruktur) oder eine *Cap*-Region betreffen. Diese Insertionen von Strukturelementen sind für verschiedene Reaktionsmechanismen der Enzyme charakteristisch und ermöglichten die Entwicklung verschiedener Enzymfunktionen aus einem einzigen Proteingerüst. So zählen zu der α/β-Hydrolase-Faltung-Superfamilie Lipasen, Esterasen, Phopholipasen, Phosphatasen, Peptidasen, Dehalogenasen, Haloperoxidasen, Epoxid-Hydrolasen, Hydroxynitrillyasen und viele mehr (Bugg, 2004; Jochens *et al.*, 2011).

Strukturelle Grundlage für die Katalyse und Spezifität eines Enzyms ist das aktive Zentrum. Die hohe Konservierung der Strukturen der α/β-Hydrolase-Faltung-Superfamilie ermöglicht die spezielle Anordnung des aktiven Zentrums dieser Enzymfamilie. Dieses aktive Zentrum wird hier als katalytische Triade bezeichnet, da sie aus einem katalytischen Nukleophil

(Aspartat, Cystein oder Serin), einem Säurerest (Aspartat oder Glutamat) und einem Histidin besteht.

Die sehr gut konservierten Strukturen dieses Faltungsmotivs, der Erhalt des aktiven Zentrums und die gleichzeitige Variabilität der katalytischen Funktionen stellen eine gute Basis zu Untersuchung der molekularen Mechanismen der Temperatur-Adaption dar. Die interessanten Eigenschaften dieser Superfamilie ermöglichen die Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen und der evolutionären Verwandtschaften.

Studien zur Temperatur-Adaption von α/β-Hydrolase-Faltung-Enzymen, die das gesamte Temperaturspektrum mit ein beziehen, sind bis zum heutigen Stand noch nicht beschrieben worden.

1.3.1 Struktur und katalytischer Mechanismus lipolytischer Enzyme

Lipolytische Enzyme gehören zur Familie der Hydrolasen (EC3). Sie befähigt die Hydrolyse eines bestimmten chemischen Bindungstyps zu katalysieren. Anhand ihres Substratspektrums werden sie in Esterasen (EC 3.1.1.1.), Lipasen (EC 3.1.1.3.) und Phospholipasen (EC 3.1.4.3.) unterteilt. Phospholipasen katalysieren die Hydrolyse von Phospholipiden, während die anderen beiden Klassen die Hydrolyse von Carboxylestern katalysieren. Lipasen hydrolysieren die Ester von langkettigen Fettsäuren, wohingegen Esterasen kurzkettige Ester spalten (Arpigny & Jaeger, 1999).

Lipolytische Enzyme werden als extrazelluläre und zelluläre Enzyme in vielen Organismen gebildet und sind essentielle Bestandteile des Fettstoffwechsels. Da Esterbindungen weit verbreitet sind, ist eben dies nicht verwunderlich. So wurde eine Vielzahl verschiedener Esterasen und Lipasen aus eukaryotischen und prokaryotischen Organismen beschrieben. (Bornscheuer, 2002; Chahinian *et al.*, 2002; Jaeger & Reetz, 1998).

Ein charakteristisches Merkmal lipolytischer Enzyme ist der Aufbau und die Anordnung des aktiven Zentrums. Die katalytischen Aminosäuren Histidin und die saure Aminosäure (Aspartat oder Glutamat) sind am C-terminalen Ende des β-Strangs positioniert, wohingegen der katalytisch aktive Serinrest in einem konservierten Pentapeptid (GXSXG) lokalisiert ist. Eine Ausnahme bildet hier die GDSL-Familie (Akoh *et al.*, 2004; Arpigny & Jaeger, 1999). Dieses Konsensusmotiv bildet eine enge Schleife in einem β-Strang-Turn-α-Helix–Motiv. Durch energetisch ungünstige φ- und ϕ-Torsionswinkel des Peptidrückgrats wird hier der so genannte nukleophile Ellenbogen gebildet (*nucleophilic ellbow*), der das nukleophile Serin in das aktive Zentrum exponiert. Der nukleophile Ellenbogen ist das am stärksten konservierte Element der α/β-Hydrolase-Faltung. Ein weiteres Element des katalytischen Mechanismus

lipolytischer Enzyme ist das *oxyanion hole*. Dieses bildet eine Umgebung aus Wasserstoffbrücken-Donoren im aktiven Zentrum und stabilisiert dadurch den Übergangszustand während der Katalyse (Hausmann & Jaeger, 2010).

Der Mechanismus der Substrathydrolyse läuft im Wesentlichen in zwei Phasen ab, der Acylierung und Deacylierung, wobei die einzelnen Schritte in vier Teilen beschrieben werden können (Abb.1.2).

Im ersten Schritt wird das Substrat an das katalytische Serin gebunden. Dies geschieht durch den Angriff der nukleophilen Hydroxylgruppe des katalytisch aktiven Serins auf den Carbonylkohlenstoff des Substrates. Dies resultiert in der Bildung eines tetrahedralen Übergangszustands, der durch die katalytisch aktiven Histidin und Aspartat-Reste sowie das *oxyanion hole* stabilisiert wird.

Im nächsten Schritt findet die Freisetzung des Alkoholrestes durch einen Protonentransfer vom Histidin auf das Sauerstoffatom des Substrates statt. Diese Veresterung der Säurefunktion des Substrates mit dem Serinrest lässt einen Acyl-Enzym-Komplex entstehen.

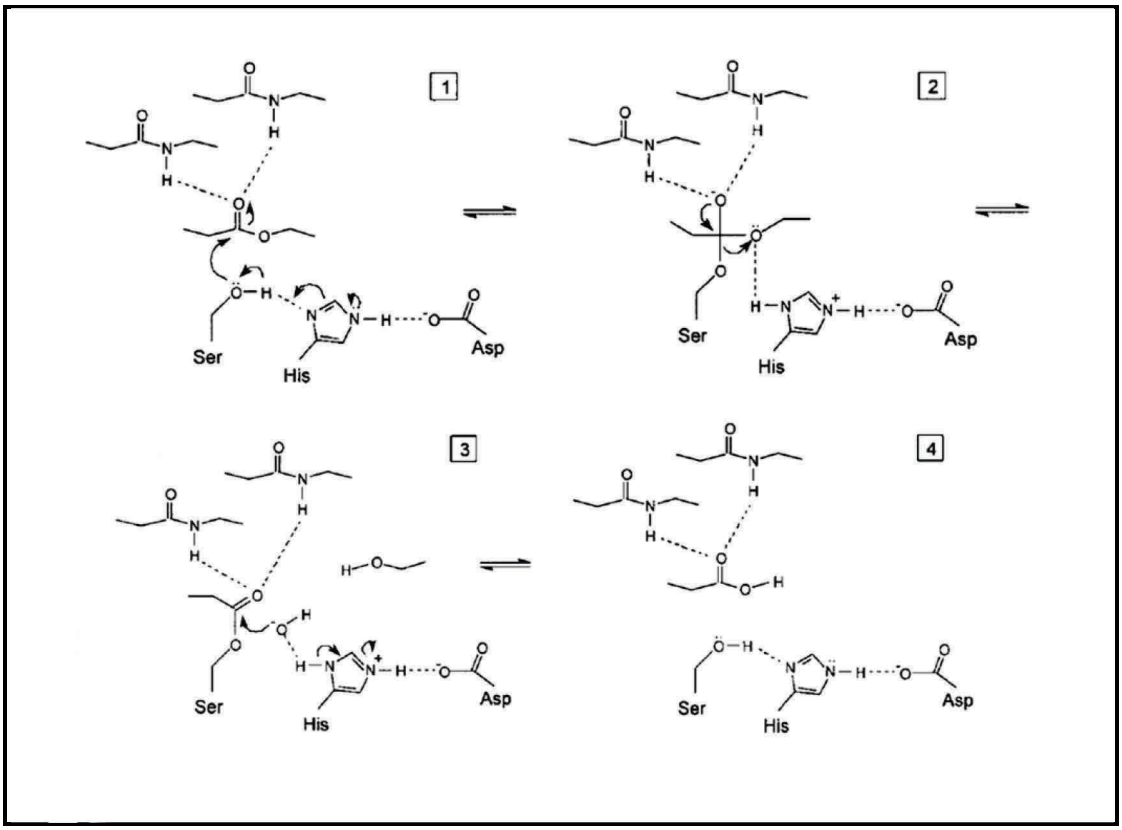

Abb.1.2: Reaktionsmechanismus von Esterasen und Lipasen nach Jaeger *et al*. (1999). Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der hydrolytischen Esterspaltung. Die katalytisch aktiven Aminosäurereste werden durch Serin (Ser), Aspartat (Asp) und Histidin (His) dargestellt. Die NH-Gruppen des Peptid-Rückgrats bilden das *oxyanion hole.*

Die Deacylierung beginnt mit dem dritten Schritt, bei welchem durch einen nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls erneut ein tetrahedralen Übergangszustand entsteht (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006; Jaeger *et al.*, 1999; Nardini & Dijkstra, 1999).

Der letzte Schritt besteht aus der Freisetzung des Enzyms und des Produktes. Durch die Übertragung eines Protons des Histidinrestes auf das Sauerstoffatom des Serins werden die Acylgruppen abgespalten, so dass das Enzym in der aktiven Ausgangsform vorliegt.

1.3.2 Biotechnologische Relevanz psychrophiler und thermophiler lipolytischer Enzyme

Lipolytische Enzyme sind von großem biotechnologischem Interesse. Diese Biokatalysatoren katalysieren reversibel die Hydrolyse von Esterbindungen. Ihre chemo-, regio- oder enantioselektiven Eigenschaften, die vergleichsweise hohe Stabilität in organischen Lösungsmitteln und die Tatsache, dass sie keine Kofaktoren benötigen, ermöglichen einen vielfältigen industriellen Einsatz dieser Biokatalysatoren (Jaeger & Eggert, 2002).

Lipasen und Esterasen werden bei Verfahren zur Herstellung von Lebensmitteln (z. B. bei der Prozessierung von Ölen und Fetten), pharmazeutischen und kosmetischen Produkten eingesetzt. Weiterhin finden diese Enzyme Anwendung in der Papier- und Textilindustrie, der Synthese von Feinchemikalien (Razematspaltung zur Herstellung von enantiomerenreinen chiralen Alkoholen) und bei der Produktion von Biodiesel (Alquati *et al.*, 2002; Divakar & Manohar, 2007; Hills, 2003; Jaeger & Eggert, 2002; Kourist & Bornscheuer, 2011). Diese Vielfältigkeit der Anwendungsmöglichkeiten verdeutlicht einen stetig hohen Bedarf an lipolytischen Enzymen. Die meisten dieser Biokatalysatoren sind mesophilen Charakters und haben eine optimale Aktivität zwischen 30 °C und 60 °C. Die Verfahren, bei welchen sie eingesetzt werden können, haben oftmals harsche Bedingungen, so dass Aktivitätsverluste zu verzeichnen sind. Höhere und niedrigere Prozesstemperaturen können diese Verfahren begünstigen. Aus diesen Gründen werden zunehmend neue Enzyme gesucht, die hierfür geeignete Eigenschaften mit sich bringen. Lipolytische Enzyme aus extremophilen Organismen bieten hier ein großes Potential (Fucinos *et al.*, 2012; van den Burg, 2003).

Lipasen und Esterasen produzierende Thermophile wurden in vielen Studien untersucht, welche die Isolierung, Aufreinigung und Charakterisierung der Enzyme implizierten (Atomi & Imanaka, 2004; Chakravorty *et al.*, 2011; Salameh & Wiegel, 2007a). Die hoch thermotolerante Esterase aus *Thermus thermophilus* HB27 hat ein Temperaturoptimum von > 80 °C und zeigte nach 135 Minuten Inkubation bei einer Temperatur von 90 °C noch die Hälfte ihrer Aktivität (Fucinos *et al.*, 2005). Eine andere Studie beschreibt ein Temperaturoptimum von sogar 100 °C bei der Esterase aus *Pyrococcus furiosus.* Mit einer

Halbwertszeit von 50 Minuten bei 100 °C ist dies die bis zum heutigen Stand thermostabilste Esterase (Ikeda & Clark, 1998). Die erste echte Lipase eines Hyperthermophilen wurde aus einem Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* im Jahre 2009 isoliert. Sie besitzt ein Temperaturoptimum von 90 °C und eine Halbwertzeit von zehn Stunden bei 80 °C (Levisson *et al.*, 2009b). Einige Charakterisierungen thermostabiler Lipasen und Esterasen sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst. Sie zeigen unterschiedliche Temperaturoptima von 60-100 °C auf und besitzen alle bemerkenswerte Stabilitäten bei sehr hohen Temperaturen.

Die Eigenschaften thermophiler lipolytischer Enzyme bieten durch ihre Stabilität gegenüber Lösungsmitteln und Detergenzien potentielle biotechnologische und industrielle Anwendungen. Sie werden in der Synthese von Biopolymeren, pharmazeutischen Chemikalien, Agrochemikalien, Aromen und Biodiesel verwendet (Haki & Rakshit, 2003).

Tab. 1.2: Charakterisierungen von Lipasen und Esterasen aus (hyper)thermophilen Organismen (Fucinos *et al.*, 2012).

		Eigenschaften der Enzyme*		
Wirtsorganismus	**Enzym**	**T_{opt} (°C)**	**$T_{½}$**	**Referenz**
Aeropyrum pernix K1	Esterase	90	160 h bei 90 °C	Gao *et al.* (2003)
A. fulgidus	Lipase	95	10 h bei 80 °C	Levisson *et al.* (2009b)
A. fulgidus	Esterase	80	26 Min bei 95 °C	Manco *et al.* (2000)
Alicyclobacillus acidocaldarius	Esterase	70	24 Min bei 85 °C	Manco *et al.* (1998)
Bacillus thermocatenulatus	Lipase	60-70	30 Min bei 60 °C	Schmidt-Dannert *et al.* (1996)
Picrophilus torridus	Esterase	70	21 h bei 90 °C	Hess (2008)
Pyrobaculum calidifontis VA1	Esterase	90	56 Min bei 110 °C	Hotta *et al.* (2002)
P. furiosus	Esterase	100	50 Min bei 126 °C	Ikeda & Clark (1998)
S. solfataricus P2	Esterase	80	1 h bei 80 °C	Shang *et al.* (2010)
Thermotoga maritima	Esterase	> 95	1.5 h bei 100 °C	Levisson *et al.* (2009a)
Thermosyntropha lipolytica	Lipase	96	6 h bei 100 °C	Salameh & Wiegel (2007b)
T. thermophilus HB27	Esterase	> 80	135 Min bei 85 °C	Fucinos *et al.* (2005)

*T_{opt} beschreibt das Temperaturoptimum und $T_{½}$ die Halbwertszeit der Stabilität bei den angegebenen Temperaturen.

In letzter Zeit haben auch Kälte-liebende Lipasen und Esterasen als industrielle Biokatalysatoren an Bedeutung gewonnen. Diese Enzyme finden Verwendung zur Herstellung von Feinchemikalien für die Lebensmittelindustrie und Pharmazie, aber auch als Additive in Detergenzien (kaltes Waschen), der Bioremediation (Kompostieren, Öl-Degradierung, xenobiotische Anwendungen), der Bio-Transformation, der Nahrungsindustrie (Gärung, Käseherstellung, Bäckerei, Fleischweichmacher) (Cavicchioli *et al.*, 2002; Demirjian *et al.*, 2001; Feller *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2009).

Bisher wurden nur einige Lipasen und Esterasen von psychrophilen Organismen isoliert und charakterisiert, von denen einige in Tabelle 1.3 beschrieben sind (Joseph *et al.*, 2008; Tutino *et al.*, 2009). Dazu gehört auch die Lipase LipB68 aus *Pseudomonas fluorescens,* die ein durchaus energieeinsparender Biokatalysator ist. Das Temperaturoptimum dieses Enzyms von 20 °C eignet sich zur Produktion von Biodiesel und auch bei 30 °C ist die Produktion noch ertragreich. Diese exzellente Produktivität bei 20-30 °C verschafft dieser Lipase gegenüber anderen Lipasen mit Temperaturansprüchen von 40-50 °C einen klaren Vorteil in industriellen Anwendungen (Luo *et al.*, 2006).

Tab. 1.3: Charakterisierungen von Lipasen und Esterasen aus psychrophilen Organismen nach Fucinos *et al.* (2012).

		Eigenschaften der Enzyme*		
Wirtsorganismus	**Enzym**	**T_{opt} (°C)**	**Stabilität**	**Referenz**
Acinetobacter sp. strain no. 6	Lipase	20	$T_{½}$: 30 Min bei 50 °C	Gomes & Steiner (2004)
Corynebacterium paurometabolum MTCC 6841	Lipase	25	Inaktivierung bei 40 °C	Joshi *et al.* (2006)
P. haloplanktis TAC 125	Esterase	20	4 °C über 3 Tage	Aurilia *et al.* (2007)
Pseudoalteromonas sp. wp27	Lipase	20-30	60 % bei 4 °C	Joseph *et al.* (2008)
Psychrobacter immobilis B10	Lipase	35	20 % bei 0 °C	Arpigny *et al.* (1997)
Psychrobacter sp. Ant 300	Esterase	35	Inaktivierung bei 4 °C	Kulakova *et al.* (2004)
Rhodotorula mucilaginosa	Esterase	45	20 % bei 0 °C	Zimmer *et al.* (2006)
Shewanella livingstonensis	Lipase	30	15 % bei 0 °C	Gomes & Steiner (2004)

*T_{opt} beschreibt das Temperaturoptimum.

Psychrophile Lipasen und Esterasen zeigen maximale katalytische Aktivität bei Temperaturen unter ~ 40 °C (Fucinos *et al.*, 2012). Diese Temperaturoptima stimmen gewöhnlich nicht mit der Wachstumstemperaturen der Wirtsorganismen überein, sondern liegen häufig 10-15 °C unter den Wachstumsbedingungen (Fucinos *et al.*, 2012).

1.3.3 Die thermophile Esterase Est2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*

Im Jahre 1971 wurde der thermoacidophile Stamm *A. acidocaldarius* aus heißen Quellen des Yellowstone National Parks erstmals beschrieben. Die Namensgebung ist hierbei auf die Einlagerung von zyklischen Fettsäuren in der zytoplasmatischen Membran zurückzuführen. Dieses Bakterium kann bei Temperaturen von 45–70 °C leben, wobei das Optimum bei ca. 60 °C liegt (Darland & Brock, 1971). Die hohe Thermostabilität seiner molekularen Komponenten wurde vielseitig erforscht, so dass sich dieser Stamm zu einem gut untersuchten Modellorganismus für thermophile Bakterien entwickelt hat. Aktuelle Projekte erforschen die Strukturen und Funktionen der thermophilen Enzyme dieses Organismus. So wurde auch die thermostabile Esterase Est2 aus diesem Organismus ausführlich beschrieben.

Durch vergleichende Studien von Aminosäuresequenzen konnte dieses Enzym der Familie der HSL-Familie (Hormon-sensitive Lipase) zugeordnet werden (De Simone *et al.*, 2000). Die Familie besteht aus mehreren Esterasen von Prokaryoten, welche psychrophile, mesophile und thermophile Bakterien einbeziehen. Die Enzyme zeigen Homologie zu der Hormon-sensitiven Lipase (HSL) von Säugetieren (Hemilae *et al.*, 1994).

Esterasen und Lipasen wurden im Jahre 1999 durch Arpigny und Jaeger aufgrund von Aminosäuresequenz-Homologien und physiologischen Funktionen in acht Familie klassifiziert (Arpigny & Jaeger, 1999). Eine Erweiterung der Klassifizierung ist durch Hausmann & Jaeger (2010) beschrieben**.** Hier wurde auch die HSL-Familie definiert. Innerhalb dieser Familie wurden drei Sequenzblöcke mit konservierten Motiven identifiziert. Block I enthält das HGGG-Motif (*oxyanion hole*) und in Block II und III sind die Aminosäuren der katalytischen Triade konserviert (De Simone *et al.*, 2000; Manco *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 1999).

Durch die Auflösung der dreidimensionalen Struktur (PDB-Code 1EVQ) konnte Est2 sowohl als Mitglied der HSL-Familie als auch der Superfamilie der α/β-Hydrolasen beschrieben werden. Das aktive Zentrum konnte definiert werden, welches der katalytischen Triade lipolytischer Enzymen entspricht (Ser155, Asp252 und His282) und in den Blöcken II und III konserviert ist. Weiterhin wurden die hydrophobe Bindetasche und das *oxyanion hole*, in

dessen Formation das Aminosäuresequenz-Motiv His81-Gly82-Gly83-Gly84 (Block III) involviert ist, detektiert (De Simone *et al.*, 2000).

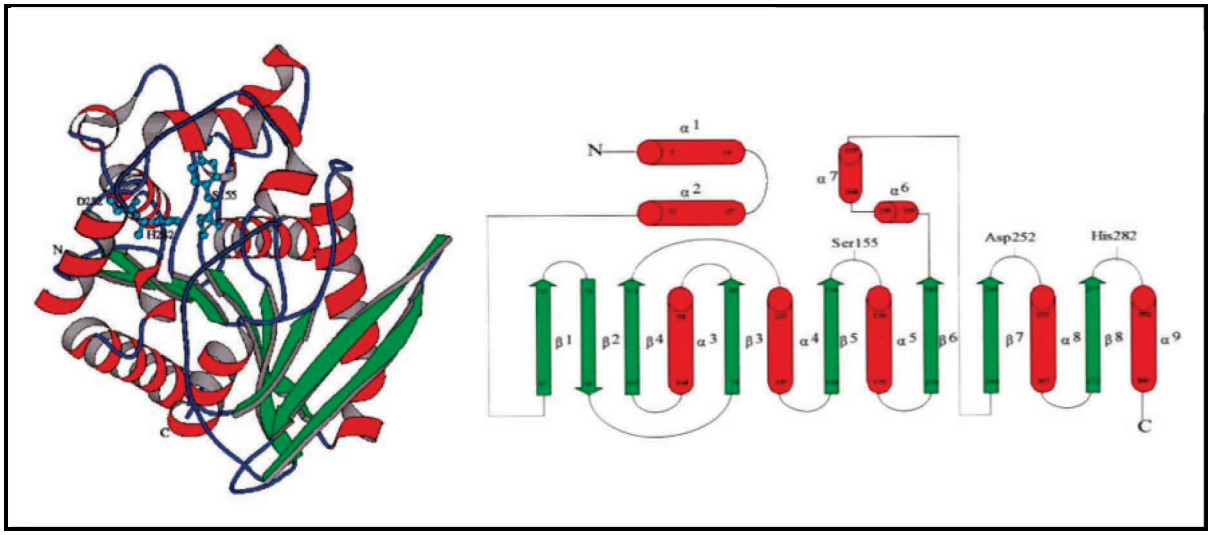

Abb.1.3: Dreidimensionale Struktur und zweidimensionale Strukturelemente von Est2 aus *A. acidocaldarius* nach De Simone *et al*. (2000). α-Helices sind in Rot, β-Stränge in Grün und Loops in Blau dargestellt. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind durch die Farbe Blau erkenntlich gemacht.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der HSL-Familie ist die *Cap*-Region, die aus zwei separaten helikalen Regionen gebildet wird und deren Funktion noch nicht vollständig verstanden ist (De Simone *et al.*, 2001).

Est2 besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDa (310 Aminosäuren) und hat ein Temperaturoptimum von 70 °C. Ebenso bemerkenswert ist die Temperaturstabilität, da Est2 bei 70 °C Inkubationstemperatur nach 14 Stunden keinen Aktivitätsverlust aufweist. Die Substratspezifität zeigt den Charakter einer Esterase, da Est2 bevorzugt kurzkettige *para*-Nitrophenyl-Ester (Optimum *para*-Nitrophenyl-Caproat) hydrolisiert (Manco *et al.*, 1998).

Durch Sequenzanalysen mit anderen homologen thermophilen und mesophilen HSL-Enzymen wurden putativen Gründe für die Thermostabilität von Est2 untersucht, experimentelle Nachweise wurden jedoch nur für den strukturellen Bereich des N-Terminus erbracht (Foglia *et al.*, 2007; Mandrich *et al.*, 2009; Mandrich *et al.*, 2004).

Anwendungen findet Est2 als Reporterenzym. So wird Est2 als Reporterenzym für *in vitro*-Transkription/Translationsversuche eingesetzt (Agafonov *et al.*, 2005). Zudem kann Est2 als abspaltbarer Affinitäts-Anhang zur Proteinaufreinigung genutzt werden (Huang *et al.*, 2007). Auch in der Milch- und Käse-Industrie und als Enzymbiosensor zum Nachweis von Pestiziden findet Est2 Verwendung (Mandrich *et al.*, 2006).

1.4 Zielsetzung

Thermophile und psychrophile Mikroorganismen besitzen durch ihre Adaption an außergewöhnliche Temperaturen ein enormes Reservoir an Enzymen mit besonderen Eigenschaften. Die ständig steigende Anzahl von neuen Entdeckungen dieser Enzyme dokumentiert das enorme Potential dieses Forschungsgebiets. Obgleich große Fortschritte im Verständnis der molekularen Mechanismen zur Temperatur-Adaption dieser Enzyme erzielt werden konnten, gibt es bisher keine generellen Erklärungen für diese adaptiven Veränderungen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen generelle molekulare Ursachen für die Adaption von lipolytischen Enzymen an extreme Temperaturen untersucht werden.

Mittels bioinformatischer Methoden sollte zunächst eine homologe Serie von lipolytischen Enzymen identifiziert werden, welche jeweils ein anderes Temperatur-Optimum haben. Die Abdeckung des gesamten Temperaturspektrums durch die homologen Enzyme, eine phylogenetische Distanz der Wirtsorganismen und eine gute Konservierung der Protein-Sequenzen und Strukturen sollte bei der Auswahl berücksichtigt werden.

Die gewählte homologe Serie von lipolytischen Enzymen soll im Folgenden biochemisch charakterisiert werden. Die vergleichende Betrachtung der gewonnenen experimentellen Daten und der molekularen Unterschiede erlauben die Veranschaulichung möglicher Ursachen für die adaptiven Mechanismen.

Der Nachweis erfolgt durch Mutationsexperimente der identifizierten Proteinelemente mittels rationalem Proteindesign. Die Überprüfung des Einflusses der Mutationen auf die thermische Aktivität und Stabilität sollen die Ergebnisse verifizieren und die adaptiven Veränderungen identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antibiotika, Chemikalien und Enzyme wurden im Reinheitsgrad entsprechend der Anwendung von den folgenden Firmen bezogen:

Antibiotika:	AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).
Chemikalien:	Fermentas (St. Leon-Rot), Fluka (Sternheim), Gibco BRL (Eggenstein), Invitrogen (Karlsruhe) Merck (Darmstadt), MoBiTec (Göttingen), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), TCI (Eschborn)
Enzyme:	Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Weitere Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Lysozym - Sigma (Deisenhofen), T4-DNA-Ligase - MBI Fermentas (St. Leon-Rot), *Pfu* DNA Polymerase - Stratagene (Heidelberg), Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase – Finnzymes (Espoo, Finland).
Medien-komponenten:	Difco (Detroit, USA), Gibco BRL (Eggenstein), Oxoid (Wesel), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim)
Antikörper**:**	RGS-His-Antikörper(Quiagen), Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich Peroxidase-Konjugat (BioRad)

2.2 Bakterienstämme

Tab. 2.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genetische Eigenschaft	Referenz
Escherichia coli BL21(DE3)	F$^-$ *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (λ*lts857 ind1 Sam7 nin5 lac*UV5- T7gene1)	Studier & Moffatt (1986)
E. coli DH5α	Φ80*lacZ*ΔM15*recA1 endA gyrA96 thi-1 hsdR17* (rK$^-$, mK$^+$) *supE44 relA1 deoR* Δ(*lacZYAargF*) U169	Hanahan (1983)
A. acidocaldarius subsp. acidocaldarius	Typstamm (=DSMZ 446)	Darland & Brock (1971)
Shewanella halifaxensis HAW-EB4	Typstamm (=DSMZ 17350)	Zhao *et al.* (2006)
Burkholderia thailandensis ATCC 700388	Typstamm (=DSMZ 13276)	Brett *et al.* (1998)

2.3 Plasmide

Tab. 2.2: Übersicht über verwendete Plasmide

Plasmid	Genetische Eigenschaft	Referenz
pET28a(+)	ColE1 $P_{T7\Phi10}$ Kan^R C-und N-His$_6$-*tag* *lacI*^{q}	Novagen (Madison, USA)
Rekombinante Plasmide		
pET28a-*lipBH*$_6$	0,986 kb *Nde*I/*Xho*IFragment mit *lipBH*$_6$ in pET28a+	diese Arbeit
pET28a-*lipPH*$_6$	0,942kb *Nde*I/*Xho*I Fragment mit *lipPH*$_6$ in pET28a+	diese Arbeit
pET28a-*lipSH*$_6$	0,941 kb *Nde*I/*Xho*I Fragment mit *lipSH*$_6$ in pET28a+	diese Arbeit
pMA-T -*lipP*B11-1	0,942 kb *Sfi*I Fragment mit *lipP* in pMA-T	GeneArt AG, Regensburg
pET28a-*est2H*$_6$	0,933 kb *Nde*I/*Sac*I Fragment mit *est2H*$_6$ in pET28a+	diese Arbeit

Plasmid	Genetische Eigenschaft	Referenz
pET28a-*LipS-L2BH*$_6$	0,933 kb *Nde*I/*Xho*I Fragment mit *lipS* H_6-*L2B* in pET28a+	diese Arbeit
pET28a-*LipS-L2AH*$_6$	0,941 kb *Nde*I/*Xho*I Fragment mit *lipS* H_6-*L2A* in pET28a+	diese Arbeit
pET28a-*LipS-L12BH*$_6$	0, 954 kb *Nde*I/*Xho*I Fragment mit *lipS* H_6-*L12B* in pET28a+	diese Arbeit
pET28a-*LipS-L12AH*$_6$	0,942 kb *Nde*I/*Xho*I Fragment mit *lipS* H_6*S-L12A* in pET28a+	diese Arbeit
pET28a-*Est2-L2BH*$_6$	0,945 kb *Nde*I/*Sac*I Fragment mit *est2H*$_6$-*L2B* in pET28a+	diese Arbeit
pET28a-*Est2-L2SH*$_6$	0,951 kb *Nde*I/*Sac*I Fragment mit *est2H*$_6$-*L2S* in pET28a+	diese Arbeit
pET28a-*Est2-L12BH*$_6$	0,945 kb *Nde*I/*Sac*I Fragment mit *est2H*$_6$-*L12B* in pET28a+	diese Arbeit
pET28a-*Est2-L12SH*$_6$	0,930 kb *Nde*I/*Sac*I Fragment mit *est2H*$_6$-*L12S* in pET28a+	diese Arbeit

2.4 Oligonukleotide

Tab. 2.3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	DNA-Sequenz (in 5'→ 3' Richtung)	Merkmal/ Modifikation
Konstruktionen des Vektors pET28a :		
LipS-up	GAAAGCCATATGCCGTTAGATCCAAAAGTCGCAC	*Nde*I
LipS-dw(N)	GGAGCTCTCACTCGAGGATCTCTAACAGATCTTGCTT	*Xho*I
LipB-up	CGATATCATATGTTTCGCCGTTTGCCCTTGACGATGCCG	*Nde*I
LipB-dw(N)	GGAGCTCTCACTCGAGAGCGCCGTCGAATGCCGC	*Xho*I
Est2-up	GAAAGCCATATGCCGCTCGATCCCGTCATTCAGC	*Nde*I
Est2-dw(N)	ACGCGAGCTCCTAGGCCAGCGCGTCTCGAAGTTTCT	*Sac*I

Bezeichnung	DNA-Sequenz (in 5'→ 3' Richtung)	Merkmal/ Modifikation
Oligonukleotide für die Verwendung bei der OE-PCR		
2B-S-dw	CGCGACGTCGAGGATCGGCGCGCTCTTCTCGTACG CGCGTCTAGACTCTGCGGGGGTC	OE-PCR-LipS-L2B
2B-S-up	GCGCCGATCCTCGACGTCGCGCCCGCGCCGATGTT TGCGATAGAGCATACTTTATTC	OE-PCR-LipS-L2B
2B-A-dw	CGCGACGTCGAGGATCGGCGCGCTCTTCTCGTACG CGGAACGAAATTGCTGGGCGGAG	OE-PCR-Est2-L2B
2B-A-up	GCGCCGATCCTCGACGTCGCGCCCGCGCCGATGTT TGCCGAGGTCCGAGAGTTTGAC	OE-PCR-Est2-L2B
2A-S-dw	CTTGACAGGAGGAAACAGCGACTGTTGGCGTCTAG ACTCTGCG	OE-PCR-LipS-L2A
2A-S-up	GTTTCCTCCTGTCAAGAAGGAGCCCGTGGCGATAG AGCATAGCTTTATTC	OE-PCR-LipS-L2A
2S-A-dw	CTCGATCGGCTTTCGTCTTCGTCAGCTCATTCATAT CGAGGGAACGAAATTGCTGGGCG	OE-PCR-Est2-L2S
2S-A-up	GACGAAGACGAAAGCCGATCGAGTGTTAGAGCCCG TGGCCGCCGAGGTCCGAGAGTTTG	OE-PCR-Est2-L2S
12B-S-dw	CGCCGCGCGTGCCGTCGAGCGGCGCGAAGCGCCA GTCGTCGCGTGCGTCGGCTTCGCTACGCAG	OE-PCR-LipS-L12B
12B-S-up	GCTCGACGGCACGCGCGGCGCGCCGTCGTTCGAG CGCGTCGCGCCAACACTTATCTATACCGC	OE-PCR-LipS-L12B
12B-A-dw	CGCCGCGCGTGCCGTCGAGCGGCGCGAAGCGCCA GTCGTCGCGGCTGTTCAAGTATTGATC	OE-PCR-Est2-L12B
12B-A-up	GCTCGACGGCACGCGCGGCGCGCCGTCGTTCGAG CGCGTCGCGCCGGCGTACATCGCGACGGC	OE-PCR-Est2-L12S
12A-S-dw	GTAGAGGACGGGTGAAAACCACGGATGCGTGAGTT CCTCCAGTGCGTCGGCTTCGCTACGC	OE-PCR-Est2-L12S
12A-S-up	GTAGAGGACGGGTGAAAACCACGGATGCGTGAGTT CCTCCAGTGCGTCGGCTTCGCTACGC	OE-PCR-Est2-L12B
12S-A-dw	GCTCAGGGCATTCAGCGGTGAACAATAGGGATTTT GGCTGTTCAAGTATTGATCCCG	OE-PCR-LipS-L12A
12S-A-up	CACCGCTGAATGCCCTGAGCCACAAAGATCTGCCG CCGGCGTACATCGCGACGGC	OE-PCR-LipS-L12A

Durch das Oligonukleotid in das PCR-Produkt eingefügte Schnittstellen wurden durch Unterstreichungen gekennzeichnet.

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) in HPLC-gereinigter und lyophilisierter Form bezogen. Sie wurden in den vom Hersteller angegebenen Volumen *A. dest*. aufgenommen, so dass sie in einer Konzentration von 100 pmol/µl vorlagen. Die gelösten Oligonukleotide wurden bei -20 °C gelagert.

2.5 Nährmedien und Zusätze

Sterilisation von Nährmedien und Zusätzen

Alle hitzestabilen Nähr- und Testmedien wurden für 20 Min bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 2 bar autoklaviert. Die hitzelabilen Komponenten wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter: ≤ 0,22 µm Porendurchmesser) und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur ≤ 60 °C zugesetzt. Glukoselösungen wurden ebenfalls sterilfiltriert oder separat autoklaviert und dem Medium nachträglich zugesetzt.

E. coli und *B. thailandensis* Medien

LB-Flüssigmedium

10	g	NaCl
10	g	Trypton
5	g	Hefeextrakt
1000	ml	A. dest.

Zur Herstellung von Festmedien wurde dem Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

E. coli Autoinduktionsmedium

TB-Medium

24	g	Hefeextrakt
12	g	Caseinhydrolysat
5	g	Glycerin
1000	ml	Kpi 100 mM (pH 7,0)

Kaliumphosphatpuffer (Kpi 100 mM pH 7,0)

10,66	g	K_2HPO_4
5,28	g	KH_2PO_4
1000	ml	A. dest.

Das Medium wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen wurden folgende Zusätze hinzugefügt: 2 % (w/v) Laktose, 0,4 % (w/v) Glukose.

A. acidocaldarius Medium

Lösung A (pH=4):

0.25	g	$CaCl_2$ x 2 H_2O
0.5	g	$MgSO_4$ x 7 H_2O
0,2	g	$(NH_4)_2$ SO_4
2	g	Hefeextrakt
5	g	Glukose
3	g	KH_2PO4
1000	ml	A. dest (für flüssiges Medium)
500	ml	A. dest (für festes Medium)

1 ml von Lösung B (*Trace element sol*. SL-6):

0,1	g	$ZnSO_4$ x $7H_2O$
0,03	g	$MnCl_2$ x $4H_2O$
0,3	g	H_3BO_3
0,2	g	$CoCl_2$ x $6H_2O$
0,01	g	CuC_{l2} x $2H_2O$
0,02	g	NiCl2 x $6H_2O$
0,03	g	Na_2MoO_4 x $2H_2O$
1000	ml	A. dest

Lösung C:

15	g	Agar
1000	ml	A. dest

Für flüssiges Medium werden Lösung A und Lösung B vermengt. Für festes Medium werden Lösung A und Lösung B und C vermengt.

S. halifaxensis Medium (Bacto Marine Broth)

5	g	Peptone
2	g	Hefeextrakt
0,1	g	Fe(III) citrate
5,9	g	$MgCl_2$
3,24	g	Na_2SO_4
1,8	g	$CaCl_2$
0,55	g	KCl
0,16	g	Na_2CO_3
0,08	g	$CaCl_2$ KBr
22	mg	H_3BO_3
4	mg	Na-silicate
2,4	mg	NaF
1,6	mg	$(NH_4)NO_3$
8	mg	Na_2HPO_4
1000	ml	A. dest

pH wird auf 7.6 ± 0.2 bei 25 °C eingestellt.

Antibiotika

Um auf plasmidkodierte Resistenzen zu selektionieren, wurden die Medien mit den entsprechenden Antibiotika in den in angegebenen Endkonzentrationen versetzt.

Tab. 2.4: Stammlösung und Endkonzentrationen der verwendeten Antibiotika in verschiedenen Bakterienstämmen

Antibiotikum	Stammlösung	*E. coli* [µg/ml]
Ampicillin	100 mg/ml in Millipore H_2O	**100**
Chloramphenicol	50 mg/ml in 70 % (v/v) EtOH	**50**
Gentamycin	30 mg/ml in Millipore H_2O	**10**
Kanamycin	50 mg/ml in Millipore H_2O	**50**
Tetrazyklin	50 mg/ml in 70 % (v/v) EtOH	**10**

2.6 Puffer und Lösungen

Tris-HCl Puffer:	100 mM Tris-HCl, (pH = 8)
TBS-Puffer:	25 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 150 mM NaCl, 3 mM KCl, (pH = 8)
TBST-Puffer**:**	0,2 % (v/v) Tween 20 in TBS-Puffer
Dunn-Carbonat-Puffer:	10 mM $NaHCO_3$, 3 mM Na_2CO_3, 20 % (v/v) Methanol
Blocking-Puffer:	30 g/l *skim milk powder* in TBST
Bradford Reagenz:	100 mg/l Coomassie Brilliant Blue G-250 , 50 ml/l Ethanol 95 % (v/v), 100 ml/l Phosphorsäure 85 % (w/v) Die Lösung wurde gerührt, die Feststoffe wurden herausgefiltert.
Coomassie Färbe-Lösung:	100 g/l Ammoniumsulphat, 1 % (v/v) Phosphorsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 20 % (v/v) Methanol
TBE-Puffer:	89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA
DNA Probenpuffer (5 x):	100 mM EDTA, 43% (v/v) Glycerol, 0.5 % (w/v) Bromphenol blue
SDS-Laufpuffer:	0,1 % (w/v) SDS; 25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin (pH =8,8)
SDS Probenpuffer:	10 % glycerol, 0,2 % (w/v) SDS, 0.125 M Tris-HCl (pH = 6.8), 0,1 % (w/v) Bromphenol blue, 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol
ECL-Lösungen*:*	Lösung A: 30 % Wasserstoffperoxid Lösung B: 11 mg p-Cumarsäure in 10 ml DMSO Lösung C: 50 mg Luminol in 500 ml 100 mM Tris-HCl, (pH= 8,6)
Lyse-Puffer:	50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, (pH = 8)
Wasch-Puffer:	50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol, (pH = 8)
Elutions-Puffer:	50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH = 8

2.7 Reaktions- und Nachweis-Kits

DNEasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH
innuPrep Plasmid Mini Kit	Analytik Jena,
ECL Western blotting detection Kit	Amersham Bioscience
Qiaquick PCR-Purification-Kit	Qiagen GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH
Omni-pure-OLS DNA extraction Kit	Omni Life Science GmbH
Protein Assay Kit	Thermo
Thrombin CleanCleave™-Kit	Sigma
TaKaRa Chaperone Plasmid Set	*Clontech Laboratories*

2.8 Geräte

Tab. 2.5: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung/ Hersteller
Blotapparaturen	(mini-) trans-Blot Elektrophorestic Transfer Cell BioRad
Brutroller	SB2 mit Aufsatz für 63 Kulturröhrchen (Carl Roth GmbH)
Brutschüttler	Infors HT Multitron Standard (Infors GmbH) oder Timix Control mit TH15 (Edmund Brühler) oder 3033 (GFL)
Elektrophorese-Apparaturen	Mini-Sub Cell GT System oder Wide Mini-Sub Cell GT System (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Isotopenmessgerät	Stella (Raytest)
PCR-Automat	Mastercyclr Gradient oder Ep-gradient S (mit Realpleax 4) (Eppendorf AG)
pH-Elektrode	GAT Ionode IJ44 (Nordantec GmbH)
pH-Meter	Multi-Calimatik Typ 766 (Knick Elektronische Messgeräte GmbH)
Photometer	Genesys 10 UV (Thermo)
Plattenphotometer	Spectra Max (MWG)
Power Supply	Consort EV243 / EV231 (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Sterilisator	KSG 25-2-3 (KSG Sterilisatoren GmbH) oder VARIOKLAV Dampfsterilisator (H+P Labortechnik AG)

Thermoblock	Thermomixer Comfort (Eppendorf)
Transilluminator	Eagle Eye II (Stratagene)
Ultraschall Geräte	Sonopuls Generator HD2070 mit Ultraschallwandler UW 2070 und Sonotrode KE76 oder MS72 (Bandelin)
Waage	Excellence (Sartorius)
Zentrifuge	Sorvall R6 6+ oder Sorvall RC-5b (Thermo), Centrifuge 5810R (Eppendorf), Mikro200 (Hettich Zentrifugen), CT 15E oder CT 15RE (VWR)

Alle hier nicht aufgeführten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

2.9 Computerprogramme und Online-Datenbanken

AIDA Image Analyzer v 4.18	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH	Quantifizierung von Westernblot Signalen
Bioedit v 7.1.3.0	Hall (1999)	Multiple Sequenzvergleiche
BLAST v 2.2.13	Altschul *et al.* (1990)	Homologievergleiche von Aminosäure und DNA-Sequenzen
CDD v.2.25	Marchler-Bauer *et al.* (2011)	Vorhersage von konservierten Proteindomänen
Clone Manager 7.0	Scientific & Educational Software	Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen
DSMZ Datenbank	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Datenbankrecherche zu Kulturbedingungen von Mikroorganismen
InterPro v 34.0	Hunter *et al.* (2012)	Vorhersage von Proteindomänen
Microsoft Office	Microsoft Deutschland GmbH)	Analyse kinetischer Daten
NCBI	Altschul *et al.* (1990)	Homologievergleiche
Pfam database v 24.0	Finn *et al.* (2010)	Vorhersage von Proteindomänen
Protein data bank	Berman *et al.* (2000)	Kristall-Strukturen von Proteinen

Protein Interactions Calculator (*PIC*)	Tina *et al.* (2007)	Berechnung von intramolekularen Interaktionen
ProtParam	Wilkins *et al.* (1999)	Berechnung der Aminosäure-Zusammensetzungen
Pymol v 1.5.0.4	Schrödinger, LLC	Darstellung von Protein-Strukturen
SignalP server 3.0	Dyrløv Bendtsen *et al.* (2004)	Vorhersage von Signalsequenzen
SoftMAX Pro (v 3.1.2)	Molecular Devices, LLC	Analyse von kinetischen Daten in Mikrotiterplatten
SwisPDB viewer (v 4.0.1)	Guex & Peitsch (1997)	Analyse von Protein-Strukturen
UniProt KB	ExPASy Proteomics Server	Informationen über die Proteinfunktion

2.10 Mikrobiologische Methoden

2.10.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli-Stämmen* und *B. thailandensis* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, auf LB-Agar-Platten oder in Flüssigmedien bei 37 °C. Zur Selektion bzw. Stabilisierung von Plasmiden wurde gegebenenfalls ein adäquates Antibiotikum (Tab. 2.4) zugefügt. Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Brutroller angezogen, während größere Kulturen im Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen: max. 1/5 bis 1/10 des Gefäßvolumens) auf einem Inkubationsschüttler bei 150 bis 200 UpM bebrütet wurden. Übernachtkulturen wurden für mindestens 16 h inkubiert. Zur Kultivierung von *A. acidocaldarius* wurden 10 ml des spezifischen Mediums in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit den Zellen inokuliert und ÜN bei 60 °C im Inkubationsschüttler bei 150 Upm bebrütet.

Die Anzucht von *S. halifaxensis* erfolgte in Erlenmeyerkolben, befüllt mit 10 ml des Mediums Bacto Marine Broth. Inkubiert wurden die Kolben zwei bis drei Tage lang bei 15 °C im Inkubationsschüttler (150 Upm).

Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedien ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden Übernachtkulturen mit 50 % Glycerin (80%) versetzt und bei -80 °C eingefroren.

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte (O.D.) bei 580 nm bestimmt. Eine $O.D._{580\ nm}$ = 1 entspricht dabei ungefähr einer Zellzahl von 1 x 10^9 Zellen pro ml.

2.10.2 Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) in Überexpressionskulturen

Vorkulturen

Für Übernachtkulturen wurden 10 mL LB-Medium entweder mit Einzelkolonien von LB-Agarplatten oder aus einer Gefrierkultur mit 1/500 Volumen inokuliert und für mindestens 16 h inkubiert.

Hauptkulturen

Hauptkulturen wurden aus einer Übernachtkultur auf eine Zelldichte, die einer $O.D._{.580nm}$ von 0,05 entsprach, angeimpft. Die Bestimmung der Zelldichte von Kulturen erfolgte nach geeigneter Verdünnung in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 580 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz.

Überexpression in *E. coli*

In LB-Medium

Zur heterologen Überexpression in *E. coli*-Stämmen wurden die Zellen in LB-Flüssigmedium bei 37 °C unter Selektionsdruck bis zu einer Zelldichte, die einer $O.D._{.580nm}$ von 0,5-0,8 entsprach, bebrütet. Die Induktion der Expression der T7-RNA-Polymerase erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,4 mM). Nach erfolgter Induktion wurden die Kulturen entweder bei 15 °C oder bei 37 °C weiter bebrütet. Unmittelbar vor Zugabe des IPTG sowie 1-5 h danach bzw. nach Inkubation ÜN wurden Proben für weitere Analysen entnommen.

In Autoinduktionsmedium

Die Hauptkultur wurde auf eine Zelldichte von $O.D._{.580nm}$ =0,05 angeimpft und zunächst für 2 h unter Selektionsdruck bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen, wenn nicht anders angegeben, bei 15 °C bis zu 48 h weiter bebrütet. Die Induktion der T7-RNA-Polymerase erfolgte durch im Medium vorhandene Laktose nach Verbrauch der Glukose.

2.11 Genetische Methoden

2.11.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Chromosomale DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer isoliert. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienstämmen erfolgte mit dem innuPREP Plasmid Mini-Kit der Firma Analytik Jena.

2.11.2 *In vitro*-Rekombination von DNA

Hydrolytischer Verdau, Modifikation und Ligation von DNA erfolgte nach Standardprozeduren gemäß Sambrook *et al.* (1989). Für optimale Reaktions-Bedingungen wurde nach Vorschrift der Hersteller der entsprechenden Enzyme verfahren und die mitgelieferten Puffer eingesetzt.

Wurden die Fragmente in weiteren Reaktionen eingesetzt, erfolgte eine Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen gemäß Hersteller. War eine Inaktivierung durch Hitze nicht möglich, wurden die Enzyme mit dem „Qiaquick PCR-Purification-Kit“ (Qiagen, Hilden) entfernt. Nach der Inkubation wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (2.11.3) zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe durchgeführt.

2.11.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Restriktionen und PCR-Fragmenten, zur präparativen Isolierung bestimmter DNA-Fragmente und bei der Mengenabschätzung von DNA gemäß Sambrook *et al.* (1989) angewendet. Für die Gelmatrix wurden je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente Agarose-Konzentrationen zwischen 0,75 % und 1,5 % (w/v) in 0,5 × TBE-Puffer eingesetzt. Zur Anfärbung der DNA im Agarosegel wurde Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 5 x DNA- Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von bis zu 11 V pro cm Elektrodenabstand mit 0,5 x TBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Die Visualisierung der DNA erfolgte nach Elektrophorese durch Bestrahlung mit UV-Licht (λ = 254-366 nm). Die Dokumentation der mit UV-Licht bestrahlten Gele erfolgte mit Hilfe des „Eagle Eye II“-Videodokumentationssytems. Als Größenstandards für die DNA-Gele wurden je nach zu erwartender Größe der DNA-Fragmente entweder der „GeneRuler^{TM} 50 bp DNA Ladder“ oder der „GeneRuler^{TM} 1kb DNA Ladder“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die

Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.11.4 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mit plasmidärer oder genomischer DNA durchgeführt. Es wurden PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt. Die Reaktionsansätze setzen sich wie folgt zusammen: 1 pmol/µl von jedem Oligonukleotid, 1x Reaktion Puffer des jeweiligen Herstellers, 3% DMSO (v/v), 0,2 mM dNTPs, 2 % (v/v) plasmidäre oder genomische DNA und 0,05 U/µl *Pfu* oder 0,02 U/µl Phusion DNA Polymerase. Die PCR wurde in dem PCR-Cycler „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt:

1 × (10 Min: 98 °C); 30 × (1 Min: 95 °C; 0,5 Min: 55–65 °C je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide; 0,5-2 Min: 72 °C je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments); 1 × (5 Min: 72 °C). Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des „Omni-pure-OLS DNA extraction Kit“ (OLS Omni Life Science GmbH & Co, Hamburg). Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung (Sequiserve, Vaterstetten) der PCR-Produkte ausgeschlossen.

2.11.5 *Overlap-extension* PCR (OE-PCR)

Die OE-PCR (Ho *et al.*, 1989) wurde in dieser Arbeit genutzt, um DNA-Fragmente in einer bestehenden Sequenz auszutauschen. Mittels OE-PCR werden zwei oder mehr DNA-Fragmente mit passenden, komplementären Überhängen, die das auszutauschende DNA-Fragment codieren, miteinander verknüpft. Im ersten Schritt werden die zu verknüpfenden Fragmente amplifiziert und mit den entsprechenden, komplementären Überhängen ausgestattet. In nachfolgenden Schritten werden die Fragmente zusammengeführt und vervielfältigt. Innerhalb dieser Arbeit wurde diese Strategie genutzt, um die codierenden Sequenzen einer bestimmten Loop-Region verschiedener Enzyme auszutauschen. Hierfür werden vier geeignete Oligonukleotide benötigt: zwei Ziel-DNA-flankierenden Oligonukleotide, sowie zwei zueinander komplementäre Primer. Der Ablauf der OE-PCR ist in Tabelle 2.6 und die verwendeten Oligonukleotide in Tabelle 2.7 aufgeführt. Die Produkte der erfolgreichen OE-PCR wurden anschließend mit *NdeI* und *XhoI* für Varianten von *lipS* und mit *NdeI* und *SacI* für Varianten von *est2* restringiert und über diese Schnittstellen in den Expressionsvektor pET28a kloniert.

Tab. 2.6: Übersicht über das in der *Overlap-Extension* PCR verwendete Cycler-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Primäre Denaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	30 s	30
Anlagerung/Elongation	72 °C	30 s	30
Finale Verlängerung	72 °C	10 Min	1
Kühlung	4 °C	∞	-

Tab. 2.7: Übersicht über die in der *Overlap-Extension* PCR verwendeten Oli1gonukleotiden

	Oligonukleotide		
Loop-Variante	**PCR 1**	**PCR 2**	**PCR 3**
LipS-L2B	LipS-up 2B-S-dw	2B-S-up LipS-dw	LipS-up LipS-dw
Est2-L2B	Est2-up 2B-A-dw	2B-A-up Est2-dw	Est2-up Est2-dw
LipS-L2A	LipS-up 2A-S-dw	2A-S-up LipS-dw	LipS-up LipS-dw
Est2-L2S	Est2-up 2S-A-dw	2S-A-up Est2-dw	Est2-up Est2-dw
LipS-L12B	LipS-up 12B-S-dw	12B-S-up LipS-dw	LipS-up LipS-dw
Est2-L12B	Est2-up 12B-A-dw	12B-A-up Est2-dw	Est2-up Est2-dw
LipS-L12A	LipS-up 12A-S-dw	12A-S-up LipS-dw	LipS-up LipS-dw
Est2-L12S	Est2-up 12S-A-dw	12S-A-up Est2-dw	Est2-up Est2-dw

2.11.6 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeiten von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

2.11.7 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA wurden nach (Hanahan, 1983) durchgeführt.

2.12 Proteinbiochemische Methoden

2.12.1 Zellaufschluss zur Proteinisolierung

Nach erfolgter Überexpression (2.10.2) wurde die Zelldichte bestimmt und die Zellen durch zentrifugieren geerntet (30 Min, 5.000 UpM, 4 °C). Die Zellproben wurden auf eine $O.D._{580nm}$= 10 in Tris-HCL Puffer eingestellt und einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson-Sonifier W250, 2 x 3 Min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Zwischen den beiden Ultraschallbehandlungen wurden die Proben für 3 Min auf Eis gekühlt. Der auf diese Weise hergestellte Gesamtzellextrakt (GZE) wurde direkt in weiteren Versuchen eingesetzt.

2.12.2 Aufreinigung von löslichen Proteinen mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC)

Zur Aufreinigung in *E. coli* BL21(DE3) überexprimierter rekombinanter Proteine wurde eine Affinitätschromatographie über ein Histidin-*Tag* durchgeführt. Nach erfolgreicher Überexpression (2.10.2) und Zellaufschluss zu Proteinisolierung (2.12.1) wurde der GZE zur Entfernung unlöslicher Komponenten durch 30 Min bei 16.000 g, 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde auf eine Säule, die mit 2 ml Ni-NTA *superflow agarose* (Qiagen) beladen war, aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen. Bei den folgenden Reinigungsschritten wurde nach Angaben des Herstellers des Säulenmaterials verfahren.

Dazu wird die Säule mit Puffern mit ansteigenden Imidazol-Konzentrationen gespült, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Säule wird je zweimal mit dem 10x - 20x Säulenvolumen Lysis- und Waschpuffer gespült, wobei die letztendliche Elution mit Elutionspuffer durchgeführt wird. Die Reinheit des eluierten Proteins wurde durch SDS-PAGE (2.12.6) und Enzymaktivitätstests (2.13.1) analysiert.

2.12.3 Denaturierung und *in vitro* Renaturierung von *inclusion bodies*

Die Überexpression rekombinanter Proteine kann zur Bildung mißgefalteten Proteins führen. Diese so genannten *inclusion bodies* können durch Zugabe von denaturierenden

Substanzen entfaltet werden. Anschließend werden die denaturierten Proteine mit großen Volumina verschiedener Puffern unterschiedlicher Zusammensetzung versetzt, um so die korrekte Faltung der Proteine hervorzurufen. In dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet um die LipS-Varianten zu renaturieren. Hierzu wurden die aufgeschlossen Zellen der Überexpressions-Kultur (2.10.2) zentrifugiert und das die *inclusion bodies* enthaltende Sediment vom Überstand getrennt. Das Zellpellet wurde anschließend in Denaturierungspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8); 8 M Harnstoff) aufgenommen und für 3h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Renaturierung erfolgte durch eine 1:20 Verdünnung in verschiedenen Renaturierungspuffer (Tab.2.8) und Inkubation ÜN bei 4 °C.

Der Erfolg wurde mittels Enzyme-Aktivitätstest (2.13.1) überprüft.

Tab. 2.8: Übersicht der verwendeten Renaturierungpuffer

Nummer	Tris-HCL pH 8,5 / mM	NaCl mM	KCl mM	Triton X-100 (v/v)	Sucrose M	Arginine M
1	50	9,6	0,4	0,05 %	0,4	0,5
2	50	9,6	0,4	0,05 %	0,4	-
3	50	9,6	0,4	0,05 %	-	-
4	50	240	10	0,05 %	0,4	0,5
5	50	240	10	0,05 %	0,4	-
6	50	240	10	0,05 %	-	-

2.12.4 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen

Die proteinhaltigen Lösungen wurden in den Zentrifugationskonzentratoren Vivaspin 20 (Vivascience, Hannover) bzw. Microcon YM-Filtereinheiten (Millipore) mit der passenden Ausschlussgröße in einer Kühlzentrifuge bei mindestens 4.000 UpM zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht war. Bei der Umpufferung des Proteins wurde mindestens dreimal auf 1/10 des Ursprungsvolumens konzentriert und jeweils mit dem Zielpuffer wieder auf das Ursprungsvolumen aufgefüllt.

2.12.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) oder mit Hilfe des Protein Assay Kit (Thermo) im Spektralphotometer Novaspec (Pharmacia) bestimmt.

2.12.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach (Laemmli, 1970). Die Zusammensetzung der SDS-Gele ist in Tab. 2.9 zusammengefasst. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5-10 Min bei 99 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelapparatur „Mini-PROTEAN Gelkammer II“ (Bio-Rad) in Elektrophorese-Laufpuffer durchgeführt. Dabei wurde, während sich die Proben im Sammelgel befanden, eine Spannung von 100 V angelegt, die beim Übertritt der Proben ins Trenngel auf 200 V erhöht wurde. Die Färbung der SDS-Gele nach Auftrennung der Proteine erfolgte mit der kommerziellen Färbelösung „SimplyBlue SafeStain“ (Invitrogen, Karlsruhe). Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenz-Detektors Stella (Raytest, Straubenhardt).

Tab. 2.9: Zusammensetzung der SDS-Gele

Lösungen	Sammelgel (5 %)	Trenngel (14 %)
Acrylamid-Stammlösung	0,83 ml	4 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	---	2,5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml	---
A. dest	2,77 ml	3,35 ml
10 % (w/v) SDS	50 µl	100 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

2.12.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zum immunologischen Nachweis wurden die Proteine zuerst auf einer PVDF-Immuno-Blot-Membran (Bio-Rad) immobilisiert und konnten dann über ein indirektes Enzym-Immunoassay nachgewiesen werden (Yuen *et al.*, 1989).

Proteintransfer auf PVDF-Membran

Die durch SDS-PAGE (2.12.6) aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der „Mini-Transfer-Blot Elektrophoretic Transfer Cell“-Apparatur (Bio-Rad) durch Elektroblotting auf eine PVDF-

Membran übertragen. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran kurz in Methanol, dann für 5 Min in A. dest. und abschließend für 5 Min in Dunn-Carbonat-Puffer equilibriert. Auch das Gel wurde für 5 Min in Dunn-Carbonat-Puffer equilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte in Dunn-Carbonat Puffer für 15 Min bei 150 mA und für weitere 20 Min bei 300 mA.

Immunodetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese für 1 h bei 30 °C in TBST-Puffer mit 5 % (w/v) *skim milk* geblockt, wobei alle Stellen auf der Membran abgesättigt werden, an die kein Protein gebunden hat. Alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschritte wurden bei 30 °C und unter leichtem Schütteln durchgeführt. Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurde die Membran als erstes für 1 h mit dem Erstantikörper (Anti-His-AK verdünnt in TBST-Puffer) inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Membran zweimal 30 Min in TBST-Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran mit dem Zweitantikörper-Enzym-Konjugat (Ziege-Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat, Bio-Rad; 1:5000 verdünnt in TBST-Puffer) für 1 h inkubiert. Daraufhin wurde die Membran zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper mit TBST-Puffer gewaschen (2 x 30 Min, 2 x 5 Min). Das auf der Membran gebundene Protein konnte dann indirekt über die an den Zweitantikörper gebundene HRP nachgewiesen werden. Der Zweitantikörper bindet spezifisch an den Erstantikörper und ist mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid katalysiert. Durch diese Reaktion gelangt Luminol in einen angeregten Zustand, der durch die Emission von Licht der Wellenlänge λ = 428 nm abklingt. Die maximale Lichtemission wurde mit Hilfe des ECL-Systems (Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detection System, Amersham Pharmacia) unter Verwendung des Chemilumineszenz-Detektors Stella (raytest) nachgewiesen, wobei die schwarzen Markierungen die Lokalisation der Proteine im Gel darstellt.

2.12.8 MALDI-TOF-MS-Analyse von Proteinen

Die Identität der Proteine wurde im Massenspektrometer durch MALDITOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation / Time Of Flight) Analysen bestimmt.

Nachdem die Proteine aus dem SDS-Gel ausgeschnitten worden waren, wurden sie 20 Min bei RT mit 350 µl Waschpuffer (10 mM Na_2HCO_3 in 30 % (v/v) Acetonitril) gewaschen. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis keine durch die Coomassie-Färbung des Gels verursachte Blaufärbung mehr vorhanden war. Die Gelfragmente wurden in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac) getrocknet und für 30 weitere Minuten bei RT mit 3 µl Trypsin Lösung (19.6 ng/µl in 3 mM Tris-HCl, pH = 8,8) versetzt. Daraufhin wurden die

Proteine mit weiteren 3 µl 3 mM Tris-HCl überschichtet und ÜN bei 30 °C inkubiert. Die Extraktion der Peptide aus der Gelmatrix erfolgte durch Zugabe *von* zunächst 3 µl H_2O und anschließend 5 µl 0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril. MALDI-TOF-MS wurde durchgeführt mit einem „Ultraflex III TOF/TOF“ Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen).

Die MALFI-TOF-MS Analyse erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum, Jülich.

2.13 Enzymaktivitätstests

2.13.1 Messung der Esterase-Aktivität durch Hydrolyse von *para*-Nitrophenyl-Substraten

Die Messung der Esterase-Aktivität erfolgte mit *para*-Nitrophenyl-Estern. Die mit der Hydrolyse von *para*-Nitrophenyl-Estern einhergehende Produktbildung von *para*-Nitrophenol lässt sich anhand eines Farbumschlags nach gelb verfolgen. Dieser kann durch die spektralphotometrische Messung der Absorption bei 405-410 nm registriert und aufgezeichnet werden. Als Standardsubstrat wurden 0,2 mM *para*-Nitrophenyl-Butyrat (pNPB C4) oder *para*-Nitrophenyl-Caproat (pNPC C6) verwendet. Hierzu wurde das Substrat in Isopropanol gelöst. Der Substratpuffer (40 mM Na_2HPO_4/ NaH_3PO_4, 0,09% (w/v) gummi arabicum, 0,36 % (v/v) Triton X-100, 2 % (v/v) propan-2-ol (pH 7.1)) wurde nach Manco *et al.* (1998) hergestellt. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden Substratpuffer und Substrat im Verhältnis 20:1 gemischt und in der Reaktion eingesetzt. Die Aktivitätstests wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei 200 µl Testlösung mit 5-10 µl Probe vermischt wurden. Wenn Zellextrakte als Enzymprobe eingesetzt wurden, berechnete sich die Hydrolyse-Geschwindigkeit durch die Änderung der Absorption über die Zeit.

Bei Einsatz von aufgereinigtem Enzym kann die Aktivität durch das Lambert-Beer Gesetz in Unit berechnet werden. 1 Unit Enzymaktivität ist als die Enzymmenge definiert, die 1 µmol *para*-Nitrophenol pro Minute freisetzt. Diese spezifische Enzymaktivität wurde durch folgende Gleichung berechnet: $((\Delta O.D._{.410nm}$ * Gesamtvolumen) / (Schichtdicke * Probenvolumen * Zeit * Extinktionskoeffizient 10,4))

Als molarer Extinktionskoeffizient von *para*-Nitrophenol zur Berechnung der Aktivität wurde in Standard-Messungen 10.400 M^{-1} cm^{-1} verwendet. Um die Hintergrundaktivität des Substrates mit einzubeziehen, wurden für alle Versuche Leerproben mitgeführt, die von der Enzymaktivität subtrahiert wurden. Aktivitätsmessungen erfolgten jeweils in Dreifachbestimmung.

Zur Bestimmung von Kettenlängen-Spezifitäten der untersuchten Esterasen wurden *para*-Nitrophenyl-Ester mit unterschiedlichen Kettenlängen (C2-C18) mit einer Konzentration von 0,2 mM als Substrat verwendet.

2.13.2 Temperaturabhängigkeit der Aktivität

Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der Esterasen wurde im Bereich von 5-80 °C gemessen. Um die optimale Temperatur der Enzyme zu ermitteln, wurde der Substratpuffer auf unterschiedliche Temperaturen im Thermomixer (Eppendorf) erwärmt. Zur Bestimmung kinetischer Parameter wurden die Substrate in den Konzentrationen von 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1 mM, 1,2 mM und 1,4 mM angesetzt. Die Messung erfolgte für jeden Temperaturschritt einzeln in Mikrotiterplatten. In einer vorangegangenen Kinetikmessung wurde die einzusetzende Enzymmenge und Inkubationsdauer ermittelt. Die Inkubationsdauer und Konzentration wurde so gewählt, dass die Werte in der Anfangssteigung der Kurve lagen. In den 96-*well*-Platten wurde 2 µL Enzym vorgelegt. In *deepwell*–Platten wurde 0,1 mL Substrat vorgelegt. Zur Variation der Temperaturen wurde unter Berücksichtigung des pH-Wertes der Substratpuffer auf die jeweilige Temperatur erwärmt bzw. gekühlt. Die Temperatur des Substratpuffers wurde mit einem Thermometer überprüft. Sobald der Puffer die entsprechende Temperatur erreichte, wurden 1,9 mL in die *deepwell*–Platten pipettiert um die Substratlösung herzustellen. 200 µL Substratlösung wurden anschließend sofort in die Mikrotiterplatten pipettiert und bei der entsprechenden Temperatur im Mikrotiterplatten-Inkubator für die zuvor ermittelte Dauer inkubiert. Schließlich wurde in Dreifachbestimmung eine Endpunkt Messung bei 410 nm im Plattenphotometer gemacht. Um die Hintergrundaktivität des Substrates mit einzubeziehen, wurden für alle Versuche Leerproben mitgeführt, die von der Enzymaktivität subtrahiert wurden.

2.13.3 Temperatur-Stabilität

Um die Abnahme der Enzymaktivität in Abhängigkeit von Inkubationstemperatur und Zeit zu verfolgen, wurden die Esterasen Temperaturen von 5-80 °C über einen längeren Zeitraum ausgesetzt. Hierfür wurde eine Substratkonzentration von 0,2 mM genutzt. Das Enzym wurde in einem Gradienten PCR-Heizblock (Eppendorf Mastercycler gradient) auf die entsprechende Temperatur erwärmt und insgesamt 180 Min inkubiert. Im Abstand von 20 Min wurden je 2 µL Enzymlösung entnommen und die Restaktivität bei 410 nm über 5 Min durch Zugabe von 200 µL Substratlösung bestimmt. Hierbei wurde das Spektralphotometer auf die Temperatur-Optima des zu untersuchten Enzyms vorgeheizt. Die einzusetzende

Enzymkonzentration wurde durch eine vorangegangene Aktivitätsmessung so gewählt, dass die Werte in der Anfangssteigung der Kurve lagen. Letztlich wird die verbliebene Restaktivität (in Prozent) bezogen auf einen Referenzansatz ohne Präinkubation angegeben. Um die Hintergrundaktivität des Substrates mit einzubeziehen, wurden für alle Versuche Leerproben mitgeführt, die von der Enzymaktivität subtrahiert wurden.

2.14 Homologiemodellierung und molekulardynamische Simulationen

Um nun Modelle der gesuchten Strukturen zu erstellen, wurde das Tool Modeller 9v8 (Eswar *et al.*, 2001) benutzt. Die Qualität und Stereochemie des dreidimensionalen Strukturmodells wurde mit den Programmen PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski *et al.*, 1993), ProSa (Wiederstein & Sippl, 2007) und Qmean (Benkert *et al.*, 2009) getestet. Mittels des Programms GROMACS (Hess *et al.*, 2008a) wurden die Strukturen einer Energieminimierung unterzogen. Nach einigen Schritten der Minimierung wurden das Model überlagert und solche mit dem geringsten RMSD-Wert für die molekulardynamischen Simulationen verwendet. Die molekulardynamischen Simulationen wurden mit dem Programm Gromacs 4.5.4 (Hess *et al.*, 2008a) unter Verwendung des GROMOS96 53A6–Kraftfeldes (Oostenbrink *et al.*, 2004) durchgeführt. Es wurde in einer mit SPC-Wasser (Simple Point Charge) gefüllten Simulationszelle gearbeitet. Die Simulationen wurde 100 ns lang in einer 8.5 x 8,5 x 8,5 nm^3 große Simulationszelle durchgeführt.

Die Generierung und Analyse der Homologiemodelle und molekulardynamischen Simulationen wurde von Chetan Poojari in der Arbeitsgruppe von Prof. Birgit Strodel, Institut für strukturelle Biochemie ICS-6 (Multiscale Modelling Group), Forschungszentrum, Jülich durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Systematische Auswahl homologer lipolytischer Enzyme mit differentem Temperatur-Ursprung

Zur Untersuchung der Adaption von Enzymen an unterschiedliche Temperaturen wurde in dieser Arbeit ein Homologie-basierter Ansatz gewählt, der homologe Enzyme verschiedener Temperatur-Klassen vergleichend untersuchen soll. Dazu sollten ein an hohe Temperaturen angepasstes Enzym, ein mesophiles Enzym und ein Kälte-liebendes Enzym gewählt werden und vergleichend analysiert werden. Die strukturellen und biochemischen Charakteristika der gewählten Enzyme sollen Aufschluss über die Mechanismen der spezifischen Temperatur-Adaption geben.

Hierzu erfolgte zuerst die Auswahl eines einzelnen Template-Enzyms und dazu homologer Enzyme (3.1.1-3.1.2). Anschließend sollte die Ähnlichkeit der Enzyme auf Sequenz- und Struktur-Ebene untersucht werden (3.1.3-3.1.5).

Psychrophile und thermophile Enzyme besitzen die Eigenschaft, bei extremen Temperaturen katalytisch aktiv und stabil zu sein. Für die Enzymaktivität ist die Aufrechterhaltung der Struktur eines Enzyms notwendig, da die Struktur mit der Funktion auch bei extremen Bedingungen einhergeht.

Die Korrelation von Stabilität und Aktivität stellt einen zentralen Aspekt in der Untersuchung der Adaption von Enzymen an unterschiedliche Temperaturen dar. Aus diesem Grund sollte das in dieser Arbeit gesuchte Template-Enzym eine bekannte Struktur und Funktion haben. Die Struktur eines Enzyms ist weitaus höher konserviert als dessen Aminosäuresequenz, da sich dieselbe Struktur aus verschiedenen Sequenzen aufbauen kann (Gherardini & Helmer-Citterich, 2008; Sleator, 2012). So sollte das Template-Enzym eine bekannte Struktur besitzen, um es mit Modell-Strukturen der homologen Enzyme vergleichen zu können. Wegen ihrer starken strukturellen Konservierung (α/β Hydrolase-Faltung) wurde in dieser Arbeit die Klasse der lipolytischen Enzyme gewählt.

Die Auswahl von homologen lipolytischen Enzymen für die Analyse der Temperatur-Adaption erfolgte schrittweise und mit verschiedenen Auswahlkriterien. Ausführliche Beschreibungen werden in den nachfolgenden Kapiteln gegeben.

Die wesentliche Aufgabe der bioinformatischen Analyse zur Generierung einer Serie von homologen lipolytischen Enzymen bestand also darin, aus einer erheblichen Menge an Enzymen mit aufgeklärter 3D-Struktur ein geeignetes Enzym und dessen Homologe heraus zu filtern, welche sich auf Sequenz-, Struktur- und Funktionsebene ähneln. Hierbei sollte jedoch eine gewisse phylogenetische Distanz bewahrt werden, so dass evolutive Veränderungen ersichtlich werden können. Um mit Hilfe dieses Ansatzes auf die Frage nach

den Mechanismen der Temperatur-Adaption der Enzyme einzugehen, sollten die gewählten Enzyme verschiedene Temperaturbereiche abdecken.

3.1.1 Auswahl der thermophilen Esterase Est2 als Basis der komparativen Analyse

Die große Anzahl der bereits bekannten Kristall-Strukturen von lipolytischen Enzymen wird durch eine Vielzahl von Kriterien reduziert. Ausschlaggebend für die Eignung eines Template-Enzyms ist im Besonderen, dass es homologe Enzyme mit anderem Temperatur-Ursprung gibt.

Für die Auswahl des Template-Enzyms wurde die Protein-Datenbank PDB genutzt (Berman *et al.*, 2000), welche dreidimensionale Strukturdaten von Proteinen enthält. Aus den ca. 90.000 dort annotierten Strukturen entfallen ~ 35 % auf bakteriellen Proteinen. Für diese Arbeit wurde die Gruppe der lipolytischen Enzyme gewählt, da sie evolutionär konservierte Strukturen aufweisen (Arpigny & Jaeger, 1999). Es wurden weiterhin nur die zur Enzymklasse EC 3.1.X.X, welche die Spaltung von Ester-Bindungen katalysieren, gehörenden Protein-Strukturen betrachtet (1.353 Strukturen).

Um aus diesem Pool von 1.353 Enzymen mit bekannter 3D-Struktur ein geeignetes Templates zu identifizieren, wurden die Protein-Strukturen auf verschiedene Kriterien hin untersucht. Zu diesen zählten die Kultivierungsbedingungen und Risikogruppen der Wirtsorganismen, welche mittels der Datensammlung der Deutschen Stammsammlung (DSMZ GmbH, Braunschweig; www.dsmz.de) ermittelt wurden. So wurden schwierige Kulturbedingungen und Organismen der Risikogruppe zwei und aufwärts ausgeschlossen. Ein weiteres Kriterium war die Verfügbarkeit und Qualität von Daten über die Enzyme. Dazu wurden Publikationen und deren Informationswert über die potentiellen Template-Enzyme kritisch geprüft. Die Enzyme wurden hinsichtlich vorhandener Signalsequenzen mittels Vorhersagen durch den *Signal-P prediction server* (Dyrløv Bendtsen *et al.*, 2004) analysiert und vermeintlich sekretierte Enzyme ausgeschlossen. Beschriebene Schwierigkeiten bei der Gewinnung der Proteine durch heterologe Genexpression, sowie aufwendige Protokolle zur Gewinnung reinen Proteins waren ebenfalls Ausscheidungskriterien. Diese Kriterien dienten der einfacheren Handhabung der Enzyme und erhöhen somit das biotechnologische und industrielle Potential.

Im Folgenden wurden die Homologie-Verhältnisse der einzelnen Enzyme auf Sequenzebene betrachtet. Mit den Proteinsequenzen der potentiellen Template-Enzyme wurde dazu eine Datenbanksuche mit BLAST (Altschul *et al.*, 1990) durchgeführt. Zur Gewährleistung der

Homologie wurden Sequenzen, die untereinander unter 30 % Identität aufwiesen, ausgeschlossen. Um die adaptiven Mechanismen verdeutlichen zu können, sollte die Homologie nicht über 60 % sein, da hier die Wirtsorganismen meist zum selben Genus oder sogar zur selben Spezies gehören. Weiterhin sollte jedes Enzym einen homologen Partner aus jedem Temperaturbereich aufweisen können. Unter Zuhilfenahme von Datenbanken wie PGTdb und GOLD (Huang *et al.*, 2004; Pagani *et al.*, 2012) wurden hierzu die Wirtsorganismen der homologen Enzyme ihren Temperaturklassen zugeordnet.

Durch diese Auswahlstrategie konnte die Anzahl von 1.353 gelösten lipolytischen Protein-Strukturen auf 15 potentielle Template-Enzyme reduziert werden (Tab.3.1).

Die Auswahl des Template-Enzyms aus diesen 15 Enzymen beruhte auf weiteren Aspekten, die sich auf die homologen Enzyme bezogen. Dabei lag das Augenmerk auf der Analyse der Aminosäuresequenzen. Anhand dieser wurde nach putativen Funktionen der homologen Enzyme gesucht, da diese in der Mehrzahl uncharakterisierte Enzyme sind. Sekundäre Datenbanken, wie Pfam, InterPro und die CDD Funktion von BLAST (Finn *et al.*, 2010; Hunter *et al.*, 2012; Marchler-Bauer *et al.*, 2011) stellen bei solchen Fragestellungen gute Softwarewerkzeuge der Bioinformatik. Diese Datenbanken analysieren die Charakteristika von Sequenzmustern und erlauben so eine mögliche Zuordnung zu bekannten Protein-Familien. Eine Klassifizierung der putativen Enzyme in dieselbe Protein-Familie wie das jeweilige Template-Enzym erhöht den Faktor der strukturellen Ähnlichkeit der gewählten Enzyme erheblich.

Tab.3.1:Potentielle lipolytische Template-Enzyme und ihre Homologen

Template-Enzym				Homologe Enzyme
PDB-ID*	**Enzym**	**Wirtsorganismus**	**Temperatur - Klassifikation**	**Temperatur - Klassifikation der Wirtsorganismen**
1EVQ	thermostabile Esterase Est2	*Alicyclobacillus acidocaldarius*	thermophil	2 psychrophil 4 psychrotolerant 4 mesophil 4 thermophil
1JKM	Brefeldin A Esterase	*Bacillus subtilis*	mesophil	4 psychrophil 4 thermophil
1T4M	thermostabile Esterase	*Bacillus amyloliquefaciens*	mesophil	5 psychrophil 1 psychrotolerant 3 thermophil
1YS2	Lipase	*Burkholderia cepacia*	mesophil	6 psychrophil 1 psychrotolerant
2ES4	Lipase	*Burkholderia glumae*	Mesophil	6 psychrophil 2 psychrotolerant 1 thermophil
3E0X	Lipase/Esterase	*Clostridium acetobutylicum*	Mesophil	5 psychrophil 5 thermophil

1YZF	Lipase/ Acylhydrolase	*Enterococcus faecalis*	Mesophil	8 psychrophil 3 thermophil
1JI3	thermostabile Lipase	*Geobacillus stearothermophilus*	Thermophil	2 psychrotolerant 8 mesophile 5 thermophil
3D3N	Lipase/Esterase	*Lactobacillus plantarum*	psychrophil	3 psychrophil 4 mesophil 3 thermophil 2 hyperthermophil
1Z8H	GDSL-Lipase	*Nostoc sp. PCC 7120*	mesophil	3 psychrophil 6 thermophil
3I6Y	Esterase	*Oleispira antarctica*	psychrophil	6 psychrophil 2 psychrotolerant 2 mesophil 2 thermophil
2ORY	Lipase	*Photobacterium sp. M37*	psychrophil	1 mesophil 1 thermophil
2PBL	Thioesterase	*Silicibacter sp. TM1040*	Mesophil	2 psychrophil 3 thermophil
1JFR	Lipase	*Streptomyces exfoliatus*	Thermophil	2 psychrophil 3 mesophil 2 thermophil
2RAU	Esterase/Lipase	*Sulfolobus solfataricus*	hyperthermophil	1 psychrotolerant 1 mesophil 8 thermophil 7 hyperthermophil

Die Auswahl der aufgeführten Enzyme basiert auf Kultivierbarkeit und Risikogruppen der Wirtsorganismen, der Gewinnbarkeit der Proteine, sowie auf dem Vorhandensein von Sequenz-homologen Enzymen mit 30-60 % Identität in anderen Temperaturbereichen. *Zugriffschlüssel der PDB-Datenbank (PDB-ID).

Die Zuordnung von Protein-Familien durch Datenbanken erfolgt durch einen automatisierten Vergleich mit einer erheblichen Anzahl von Enzymen. Zusätzlich zu dieser automatisierten Funktions- und Strukturbestimmung wurden die Aminosäuresequenzen hinsichtlich ihrer Zuordnung nach Arpigny & Jaeger (1999) analysiert. Hierbei werden die lipolytischen Enzyme anhand von konservierten Sequenz-Blöcken und für lipolytische Enzyme speziellen Motiven klassifiziert.

Durch diese Auswahlstrategie konnte das für diese Arbeit verwendete Template-Enzym definiert werden: die thermophile Esterase Est2 aus *A. acidocaldarius*. Im Jahre 1998 wurde diese Esterase aus dem thermoacidophilen Organismus *A. acidocaldarius* erstmals isoliert (Manco *et al.*, 1998). Diese Spezies bewohnt heiße Quellen des Yellowstone National Parks. Die Wachstumstemperaturen liegen zwischen 45 °C und 70 °C, wobei die optimale Wachstumstemperatur zwischen 60 °C bis 65 °C liegt (Darland & Brock, 1971). Bis zum heutigen Stand wurden über dieses Enzym zahlreiche Publikationen veröffentlicht. Diese enthalten unter anderem die biochemische Charakterisierung, die Auflösung und Analyse der Struktur, aber auch Untersuchungen hinsichtlich der katalytischen Aktivität und Stabilität bei

hohen Temperaturen (De Simone *et al.*, 2000; Del Vecchio *et al.*, 2001; Manco *et al.*, 2000; Manco *et al.*, 2001; Pezzullo *et al.*, 2013).

Die Auswahlstrategie der zu Est2 homologen Enzyme ergab 14 potentielle Kandidaten: jeweils vier aus thermophilen, mesophilen und psychrotoleranten und zwei aus psychrophilen Organismen (Anhang Tab.7.1).

3.1.2 Auswahl von Est2-homologen lipolytischen Enzymen aus *B. thailandensis*, *Pseudomonas sp*. B11-1 und *S. halifaxensis*

Die homologen Enzyme werden aufgrund von verschiedenen Kriterien definiert. Hierzu wird die Ähnlichkeit der Enzyme durch vergleichende Analysen der Sequenzen genutzt.

Der nächste Schritt bestand in der Auswahl der zu Est2 homologen Enzyme von Est2. Dabei sollte aus jeden Temperaturbereich ein Enzym vertreten sein. Da Est2 selbst ein thermophiles Enzym ist, beschränkte sich die Suche auf ein mesophiles und maximal zwei Enzyme aus kälteren Temperaturbereichen. Hierzu erfolgten weitere Sequenzvergleiche. Ein wichtiger Faktor bei dieser Auswahl war die Stärke der Konservierung der Sequenz in der Nähe des aktiven Zentrums der Enzyme. Es wurden drei Enzyme aus verschiedenen Temperaturbereichen mit hochkonserviertem aktiven Zentrum gefunden. Im Folgenden werden die ausgewählten Enzyme beschrieben.

Das Kälte-liebende Gegenstück zu Est2 bildet in diesem homologen Ansatz die putative Esterase LipS aus dem psychrophilen Stamm *S. halifaxensis* HAW-EB4. Mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 10 °C wurde dieser Organismus erstmals im Jahre 2006 aus dem Atlantischen Ozean, in 215 m Tiefe in Halifax, Kanada, isoliert (Zhao *et al.*, 2006).

Den mesophilen Teil der homologen Serie übernimmt die putative Esterase LipB. Dieses Enzym wurde im Genom des Stammes *B. thailandensis* E264 identifiziert, welcher seinen natürlichen Lebensraum in Reis-Feldern in Zentral-Thailand hat. Lebensfähig ist dieses Bakterium bei Temperaturen zwischen 25 °C bis 42 °C, wobei sein Optimum zwischen 30 und 37 °C liegt (Brett *et al.*, 1998).

Um den Temperatur-Sprung von 10 °C (Temperatur-Optimum für *S. halifaxensis*) auf 37 °C (Temperatur-Optimum für *B. thailandensis*) zu minimieren, wurde noch das vierte homologe Enzym LipP gewählt, welches aus dem psychrotoleranten Organismus *P*seudomonas *sp.* B11-1 stammt. Psychrotolerante Organismen können in einem breiteren Temperaturbereich als psychrophile Organismen überleben (Morita, 1975). So wurden für dieses Bakterium sowohl Wachstumstemperaturen von 4 °C als auch von 28 °C (optimal)

beschrieben. Dieser Stamm wurde aus Erdproben in Alaska isoliert. Bis zum heutigen Stand wurden aus *Pseusomonas sp.* B11-1 zwei lipolytische Enzyme isoliert, wobei eines LipP entspricht. Im Jahre 1998 wurde dieses Enzym isoliert und einige biochemische Charakteristika analysiert (Choo *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2003). Identifizierungen von Esterasen aus den Stämmen *S. halifaxensis* und *B. thailandensis* sind bis zum heutigen Stand nicht beschrieben worden.

Die Wirtsorganismen aller vier homologen Enzyme gehören der Domäne der Bakterien an. Die Phyla der Enzyme unterscheiden sich jedoch. *A. acidocaldarius* zählt zu den Firmicutes (Klasse Bacilli). Die drei anderen Wirtsorganismen werden dem Phylum der Proteobakteria zugeordnet. Dabei gehört *B. thailandensis* zur Klasse der Betaproteobakteria, wohingegen *Pseudomonas sp.* B11-1 und *S. halifaxensis* zu den Gammaproteobakteria gezählt werden. Dies verdeutlicht, dass die vier homologen Enzyme eine hinreichende phylogenetische Distanz aufweisen, so dass evolutiven Vorgängen der Temperatur-Adaption ausreichend Raum gegeben sein sollte.

Tab.3.2: Homologe Serie lipolytischer Enzyme aus verschiedenen Temperaturhabitaten

Enzym	Wirtsorganismus	Temperatur Klassifikation	UniProt ID[1]	AS[2]	Sequenz Identität (%)[3]
Est2	*A. acidocaldarius subsp. acidocaldarius* DSM 446	thermophil	Q7SIG1	310	-
LipB	*B. thailandensis E264*	mesophil	Q2SWM9	327	45
LipP	*Pseudomonas sp.* B11-1	psychrotolerant	O52270	308	47
LipS	*S. halifaxensis HAW–EB4*	psychrophil	B0TNQ0	312	38

Für jedes Enzym sind der Zugriffschlüssel der UniprotKB[1] und die Anzahl der Aminosäuren[2] angegeben. Die prozentuale Identität[3] bezieht sich auf die Aminosäuresequenz von Est2.

Die Klassifizierung der vier Enzyme mit den Datenbanken Pfam, InterPro und CDD ergab eine einheitliche Einordnung, was die Wahrscheinlichkeit der strukturellen Ähnlichkeit der homologen Enzyme erhöht (Finn *et al.*, 2010; Hunter *et al.*, 2012; Marchler-Bauer *et al.*, 2011). Die vier Enzyme wurden von der Pfam und InterPro Datenbank der Familie der α/β-Hydrolase-Faltung zugeordnet (pfam07859, IPR013094). Dieser Familie gehört eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen unterschiedlichsten phylogenetischen Ursprungs und katalytischer Funktion an. Strukturell wird diese Familie durch das typische Gerüst des α/β-Hydrolase-Faltungsmotivs definiert (Ollis *et al.*, 1992). Die Analyse durch die CDD Datenbank ergab eine Zuordnung in die Superfamilie der Esterasen und Lipasen (cd00312).

Ein Sequenzvergleich auf Aminosäureebene (Abb. 3.1) zeigt die Übereinstimmungen bzw. Abweichungen der Primärstruktur. So besitzt Est2 mit 310 Aminosäuren die kürzeste und LipB mit 327 Aminosäuren die längste Polypeptidkette.

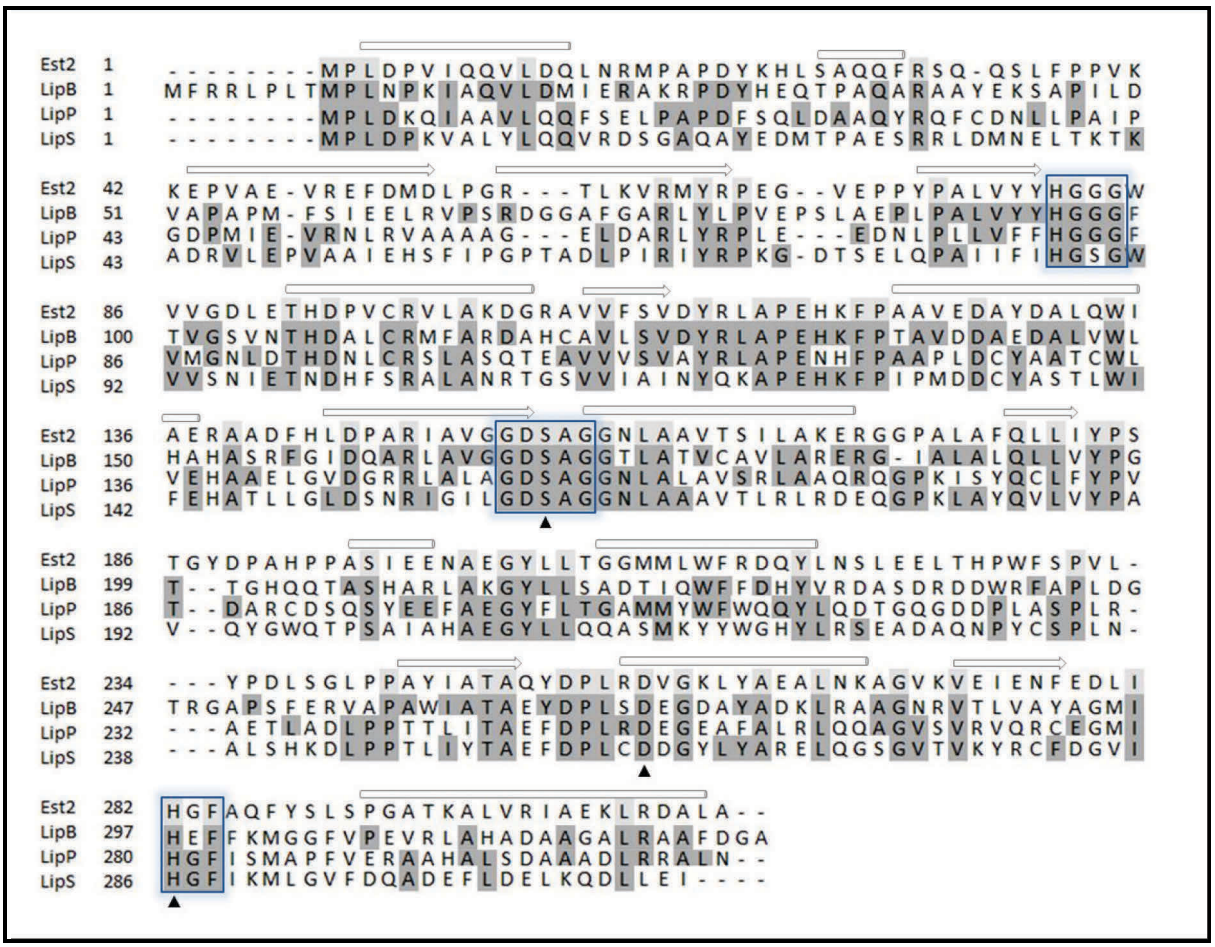

Abb.3.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Est2 und dessen Homologen LipB, LipP und LipS. Der Vergleich bezieht sich auf die Aminosäuresequenz von Est2. Die dunkelgrau hinterlegten Aminosäuren sind mit den jeweiligen Aminosäuren von Est2 identisch, hellgrau hinterlegten Aminosäuren in der Est2 Sequenz spiegeln die in allen vier Enzymen konservierten Aminosäuren wieder. Die Aminosäuren der katalytischen Triade S/D/H sind durch schwarze Dreiecke markiert. Die eingerahmten Sequenzelemente kennzeichnen konservierte Motive. Über den Sequenzen sind die Sekundärstrukturelemente von Est2 schematisch dargestellt α-Helices werden zylindrisch, β-Stränge als Pfeile dargestellt, Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren an.

Die Identitäten der Aminosäuresequenzen werden durch den Sequenzvergleich verdeutlicht. Nahezu die Hälfte der Aminosäuren von LipP (47 % Identität) und LipB (45 % Identität) sind zur Est2-Sequenz identisch. LipS besitzt mit 38 % die geringste Identität zur Est2-Sequenz. Alle vier Aminosäuresequenzen zeigen untereinander 62 identische Aminosäuren. Besonders starke Konservierungen treten in den Bereichen der Sekundärstrukturelemente von Est2 auf, wobei die Konservierung von verschiedenen Loops unterbrochen wird.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen verdeutlicht zudem die Existenz der katalytischen Triade, welche das aktive Zentrum der α/β-Hydrolasen bildet (Ollis *et al.*, 1992). Hierbei ist

das nukleophile Serin im Pentapetid GXSXG eingebettet. Bei allen vier homologen Enzyme besteht dieses Pentapeptid aus folgenden Aminosäuren: GDSAG. Die vier weiteren auf dieses Pentapeptid folgenden Aminosäuren GXLA sind mit Ausnahme der zweiten Aminosäure ebenfalls identisch. Aber auch die zur katalytischen Triade gehörenden Aspartat und Histidin sind gut konserviert. Ein weiteres konserviertes katalytisches Motiv ist das HGGG Motiv, welches das so genannte *oxyanion hole* stabilisiert (Manco *et al.*, 1999) Publikationen sowohl zu Est2 als auch zu LipP ordneten diese beiden Enzyme der HSL-Familie (Hormon-sensitive Lipase) zu (Choo *et al.*, 1998; De Simone *et al.*, 2000). Bei der Betrachtung der identischen Anteile aller vier Sequenzen wird deutlich, dass alle vier Enzyme der HSL-Familie zuzuordnen sind, welche der Gruppe IV nach der Klassifizierung von Arpigny & Jaeger (1999) entspricht. Die Sequenzen dieser Enzym-Klasse beinhalten drei konservierte Blöcke. In Block I befindet sich das konservierte HGGG Motiv. Das im spezifischen Pentapeptid GDSAG lokalisierte katalytische Serin, sowie die zur katalytischen Triade gehörende Aminosäuren Aspartat und Histidin befinden sich in Block II und Block III (Arpigny & Jaeger, 1999; Hausmann & Jaeger, 2010).

3.1.3 Verifizierung der strukturellen Ähnlichkeit von Est2, LipB, LipP und LipS auf Basis von Kristall- und Modell-Strukturen

Zur Überprüfung der strukturellen Ähnlichkeiten der homologen Enzyme werden ausgehend von der Kristallstruktur des Template-Enzyms Homologiemodelle erstellt. Genaue Betrachtungen der 3D-Struktur des Template-Enzyms und der Modelle der homologen Enzyme soll sicherstellen, dass sich die molekularen und strukturellen Eigenschaften der gewählten Enzyme stark ähneln.

3.1.3.1 Homologiemodellierung von LipS, LipP und LipB

Zu den gewählten Est2-Homologen LipB, LipP und LipS existieren keine Strukturdaten. Eine Möglichkeit, die Defizite an Informationen und strukturellen Daten über diese Enzyme auszugleichen, ist die Entwicklung von dreidimensionalen Computermodellen. Für verwandte Proteine gilt, dass eine homologe Aminosäuresequenz auch mit einer ähnlichen 3D-Struktur korreliert (Jaroszewski *et al.*, 2002; Nayeem *et al.*, 2006). Durch die Generierung von Homologiemodellen von LipB, LipP und LipS sollte die strukturelle Ähnlichkeit zur besseren Analyse der Unterschiede der Enzyme untersucht werden. Als Basis für die Modellierung der homologen Enzyme diente die Kristall-Struktur von Est2 (De Simone *et al.*, 2000). Die Qualität der Strukturmodelle hängt mit der Identität der Aminosäuresequenzen zusammen. So sollten die Sequenzen mindestens 30 % identische Aminosäuren enthalten. Der Bereich

unter 25 % Sequenzidentität wird als *twilight zone* bezeichnet, da sich hier die richtige Struktur nur schwierig bestimmen lässt (Jaroszewski *et al.*, 2000).

Vor der Aufklärung der Kristall-Struktur von Est2 generierten Manco *et al.* (1999) ein Homologiemodell dieses Enzyms. Diese Homologiemodellierung basierte auf Sequenzidentitäten von 30 % und weniger. Anhand dieses Modells definierten sie die putative Struktur inklusive der zur katalytischen Triade zählenden Aminosäuren. Die strukturellen Beschreibungen von Est2 wurden durch die Kristall-Struktur bestätigt (De Simone *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse unterstreichen das Potential eines Homologiemodells. LipB, LipP und LipS weisen Sequenzidentitäten von 45 %, 47 % und 38 % auf, so dass sich diese Homologiemodelle zur weiteren Analyse gut eignen.

Die Ergebnisse der letzten kritischen Bewertung der Techniken zur Protein-Struktur-Vorhersagen zeigten, dass die Qualität der Homologiemodellierung ein zuverlässiges Niveau erreicht hat. Die ständigen Verbesserungen der Modellierungs-Software und die wachsende Zahl der bekannten Protein-Strukturen machen Homologiemodellierungen zu einem leistungsfähigen Instrument der Bioinformatik (Takeda-Shitaka *et al.*, 2004).

Für die Entwicklung eines angemessenen Strukturmodells ist jedoch nicht nur die Identität zum Template entscheidend. So ist eine hinreichende Qualität der Template-Struktur von zentraler Bedeutung, welche hier mit einer Auflösung von 2,6 Ä für Est2 gegeben ist (De Simone *et al.*, 2000). Die Generierung der Homologiemodelle (2.14) erfolgte am Institut für strukturelle Biochemie ICS-6 (Forschungszentrum Jülich). Um die Modelle der gesuchten Strukturen zu erstellen, wurde das Programm Modeller benutzt (Eswar *et al.*, 2001). Die Qualität und Stereochemie der dreidimensionalen Strukturmodelle wurde mit den Programmen QMEAN, GROMACS, PROCHECK und ProSa überprüft (Benkert *et al.*, 2009; Hess *et al.*, 2008a; Laskowski *et al.*, 1993; Wiederstein & Sippl, 2007). Diese Validierung sicherte eine gute Qualität der dreidimensionalen Homologiemodelle, so dass diese im Folgenden zur komparativen Analyse genutzt werden konnten.

3.1.3.2 Identifizierung der strukturellen Ähnlichkeit von Est2, LipB, LipP und LipS durch Überlagerung von Kristall- und Modell-Strukturen

Nach der Generierung der Homologiemodelle wurden diese mittels des Programms Pymol (Schrödinger, LLC) mit der 3D-Struktur von Est2 überlagert, um die Gemeinsamkeiten dieser zu erarbeiten (Abb. 3.2).

Abb.3.2: Überlagerung der Protein-Struktur von Est2 mit den Homologiemodellen von LipB, LipP und LipS. Die *Cap*-Region ist in Braun, α-Helices sind in Rot, β-Stränge in Gelb und Loops in Grün dargestellt. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind durch die Farbe Blau kenntlich gemacht (Est2: Ser169, Asp267, His297 LipP: Ser155, Asp250, His280; LipS: Ser161, Asp256, His286).

Diese Überlagerung lässt das α/β- Hydrolase-Faltungsmotiv erkennen (Nardini & Dijkstra, 1999; Ollis *et al.*, 1992). Hier bildet dieses Faltungsmotiv ein zentrales, überwiegend paralleles acht-strängiges β-Faltblatt. Eine Ausnahme bildet der zweite β-Strang, der antiparallel ausgerichtet ist. Diese β-Strukturen sind von fünf α-Helices (α3, α4, α5, α8 und α9) umgeben und bilden so die Kernarchitektur des α/β-Hydrolase-Faltungsmotivs.

Dieses strukturelle Gerüst besitzt eine enorme stabile Plastizität, so dass es natürliche Insertionen ohne Folgen des Funktionsverlustes ertragen kann. Dies wird zudem durch die verschiedenen Größen von α/β Hydrolase-Proteinen ersichtlich, welche beispielweise aus 181 Aminosäuren (*Bacillus subtilis* Lipase Lip A) oder 582 Aminosäuren (*Mus musculus* Acetylcholinesterase mACE) bestehen können (Heikinheimo *et al.*, 1999; van Pouderoyen *et al.*, 2001). Die Insertionen können Loops hinter den β-Strängen 3, 4, 6, 7 oder 8 betreffen. Eine solche Insertion, welche gleich eine ganze Domäne enthält, ist in allen vier homologen Strukturen zu erkennen, die so genannte *Cap*-Region. Diese wird zum einen aus den ersten

N-terminalen Aminosäuren, welche die Helices α1 und α2 enthalten, gebildet (Est2:1-45; LipB:1-57; LipP: 1-47; LipS: 1-50). Zum anderen gehören Bereiche zwischen dem sechsten und siebten β-Strang zu dieser Region. Die *Cap*-Region bedeckt das aktive Zentrum und wird mit der Substrat-Spezifität und anderen Funktionen von Enzymen in Verbindung gebracht und gehört zur Klassifizierung der HSL-Familie (De Simone *et al.*, 2001; Miled *et al.*, 2003; Widmann *et al.*, 2010). Ein Beispiel hierfür ist die Familie der Epoxidhydrolasen. Hier konnte nachgewiesen werden, dass der Loop hinter dem sechsten β-Strang (der so genannte NC-Loop) die Substrat-Bindetasche definiert und die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums reguliert (Barth *et al.*, 2004a, b).

Die Überlagerung der Strukturen verdeutlicht die übereinstimmende Lage des aktiven Zentrums der Enzyme, an dem die eigentliche Umsetzung der Substrate stattfindet. Die Identifizierung der katalytischen Triade innerhalb der Struktur erlaubt einen Einblick in das aktive Zentrum der Moleküle. Die katalytische Triade von Est2 wurde durch Manco *et al.* (1999) an folgenden Positionen der Polypeptidkette identifiziert: Ser155, Asp252 und His282. Durch Vergleiche der Aminosäuresequenzen (Abb. 3.1) und durch die Überlagerung der 3D-Struktur von Est2 mit den Homologiemodellen von LipB, LipP und LipS (Abb. 3.2) konnten auch in den homologen Enzymen die putativen katalytischen Triaden lokalisiert werden. Im Vergleich mit Est2 zeigte LipB die größte Differenz der Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triade (Ser169, Asp267, His297). Da die Polypeptidkette von LipB vergleichend zu Est2 aus 17 zusätzlichen Aminosäuren besteht, ist dies auf die durch Insertionen bedingte Verlängerung der Polypetidkette zurückzuführen. Diese Insertionen machen sich im Wesentlichen am N-Terminus der Polypeptidkette bemerkbar. Die Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triaden von LipP und LipS in der Polypeptidkette entsprechen nahezu der des aktiven Zentrums von Est2 (LipP: Ser155, Asp250, His280; LipS: Ser161, Asp256, His286).

Eine detaillierte Betrachtung der räumlichen Ausrichtung der zur katalytischen Triade gehörenden Aminosäuren verdeutlicht die Lokalisation des jeweiligen nukleophilen Serin an der Spitze des so genannten *nucleophilic elbow* (Abb. 3.3). Das katalytisch aktive Aspartat befindet sich hinter Strang β7 und der katalytisch aktive Histidinrest ist in einem Loop zwischen β8 und α9 lokalisiert (Abb. 3.2).

Die Aminosäurereste der katalytischen Triade sind in der gleichen Weise angeordnet wie in allen Esterasen dieser Familie. Sowohl die relative Orientierung der Reste zueinander, die durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden, als auch die Bildung des *oxyanion hole* durch die Stickstoffatome der Glycine des HGGG Motivs sind identisch positioniert. Die beschriebenen Strukturbereiche sind sowohl in der Familie der

HSL-ähnlichen Esterasen als auch bei den hier betrachteten vier homologen Enzymen sehr gut konserviert (Laurell *et al.*, 2000).

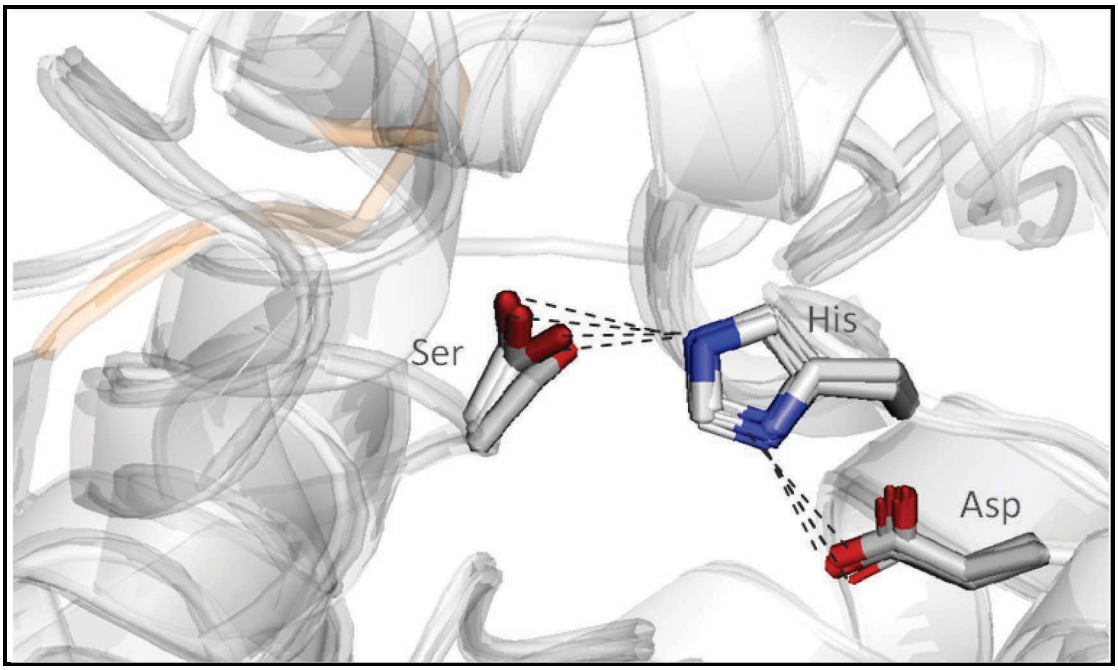

Abb.3.3: Das konservierte aktiven Zentrums von Est2, LipB, LipP und LipS. Die Großdarstellung des aktiven Zentrums der Struktur von Est2 und den Homologiemodellen von LipB, LipP und LipS verdeutlicht, dass die Aminosäuren der katalytischen Triade in ordnungsgemäßen Abstand von bis zu 4 Å sind (Gutteridge & Thornton, 2005), um Wasserstoffbrücken-Bildung zu ermöglichen (Ser-His: 2,7 Å für Est2; 3,8 Å für LipB; 3,48 Å für LipP; 2,77 Å für LipS und His-Asp: 3,2 Å für Est2;3,04 Å für LipB; 3,12 Å für LipP; 2,73 Å für LipS). Die Lokalisation des HGGG Motivs ist im Hintergrund in Orange dargestellt.

Die Modelle unterscheiden sich in Bezug auf ihre Gesamtfaltung nur geringfügig. Somit konnte mit Hilfe der Homologie-Modelle von LipB, LipP und LipS bestätigt werden, dass die gewählten Enzyme eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen und sich somit für die folgenden Untersuchungen eignen. Gleichzeitig können spezifische Unterschiede vor diesem Hintergrund benannt werden. Diese betreffen bestimmte Loops an der Oberfläche der Proteine, die sich in ihrer Länge, Komposition und Konformation unterscheiden. Loops übernehmen verschiedenste Aufgaben in Bereichen der Proteinfunktion, Liganden-Bindung und Formation aktiver Zentren von Enzymen und können somit einen interessanten Ansatz in dieser Struktur-basierten komparativen Studie darstellen (Fernandez-Fuentes *et al.*, 2005).

3.1.4 Zusammenfassung: Auswahl homologer lipolytischer Enzyme mit differentem Temperatur-Ursprung

Zur Analyse der Mechanismen der Temperatur-Adaption wurde ein homologes Set an lipolytischen Enzymen identifiziert, welches aus einem Template-Enzym mit bekannter Struktur und homologen Enzymen unterschiedlichen Temperatur-Ursprungs besteht. Zur Auswahl dieser Enzyme wurde eine mehrstufige Strategie angewandt (Abb. 3.4).

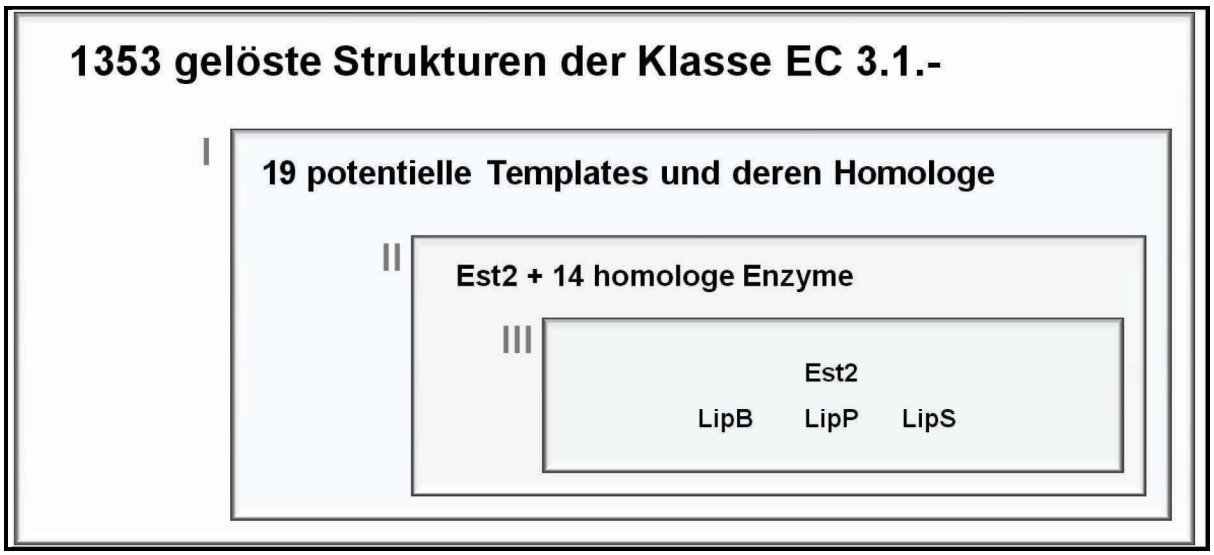

Abb.3.4: Auswahlstrategie für homologer lipolytischer Enzyme. Die Darstellung verdeutlicht die verschiedene Auswahlkriterien: I = Kultivierungsbedingungen und Risikogruppen der Wirtsorganismen, Verfügbarkeit und Qualität von Daten über die Enzyme, Handhabung der Enzyme, Vorhandensein von Homologen aus jedem Temperaturbereich mit 30 %-60 % Identität; II = I + Anzahl und Klassifizierung der Homologen; III = Abdeckung des Temperaturspektrums, Ähnlichkeiten der Enzyme auf Sequenz- und Struktur-Ebene.

Im ersten Schritt der Auswahlstrategie konnten 15 potentielle Template-Enzyme mit bekannter 3D-Struktur mit geeigneten homologen Enzymen aus der Klasse der lipolytischen Enzyme identifiziert werden (Tab.3.1). Die zweite Stufe der Auswahlstrategie führte zur Identifizierung des Template-Enzyms. Die gute Charakterisierung, besonders hinsichtlich der Thermostabilität, aber auch die große Anzahl von 14 potentiellen homologen Enzyme machte die thermophile Esterase Est2 zu einem guten Template-Enzym für die vergleichend Analyse der Temperatur-Adaption. Zur Identifizierung der homologen Enzyme wurden in der dritten Stufe der Auswahlstrategie weitere Kriterien vergleichend betrachtet. Die detaillierte Überprüfung der Ähnlichkeit der drei ausgewählten homologen Esterasen LipB (mesophil), LipP (psychrotolerant) und LipS (psychrophil) erfolgte durch Betrachtung der Aminosäuresequenzen und Protein-Strukturen (Tab.3.2).

Durch die vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen konnten daraufhin konservierte Bereiche in allen vier Enzymen verifiziert werden. Diese setzen sich aus der katalytischen

Triade und konservierten Motiven und Sequenzblöcken zusammen, die eine Einordung aller Enzyme in die HSL-Familie ermöglichte (Abb.3.1).

Zur vergleichenden Betrachtungen der Protein-Strukturen wurden dreidimensionale Homologiemodelle von LipB, LipP und LipS erstellt. Der komparative Vergleich auf struktureller Ebene konnte die starke Konservierung des α/β-Hydrolase-Faltungsmotivs (Abb. 3.2) und des aktiven Zentrums (Abb. 3.3) validieren (Nardini & Dijkstra, 1999; Ollis *et al.*, 1992).

Zusammenfassend konnten auf Sequenz- und Strukturebene große Ähnlichkeiten der gewählten homologen Enzyme verifiziert werden (Abb. 3.5).

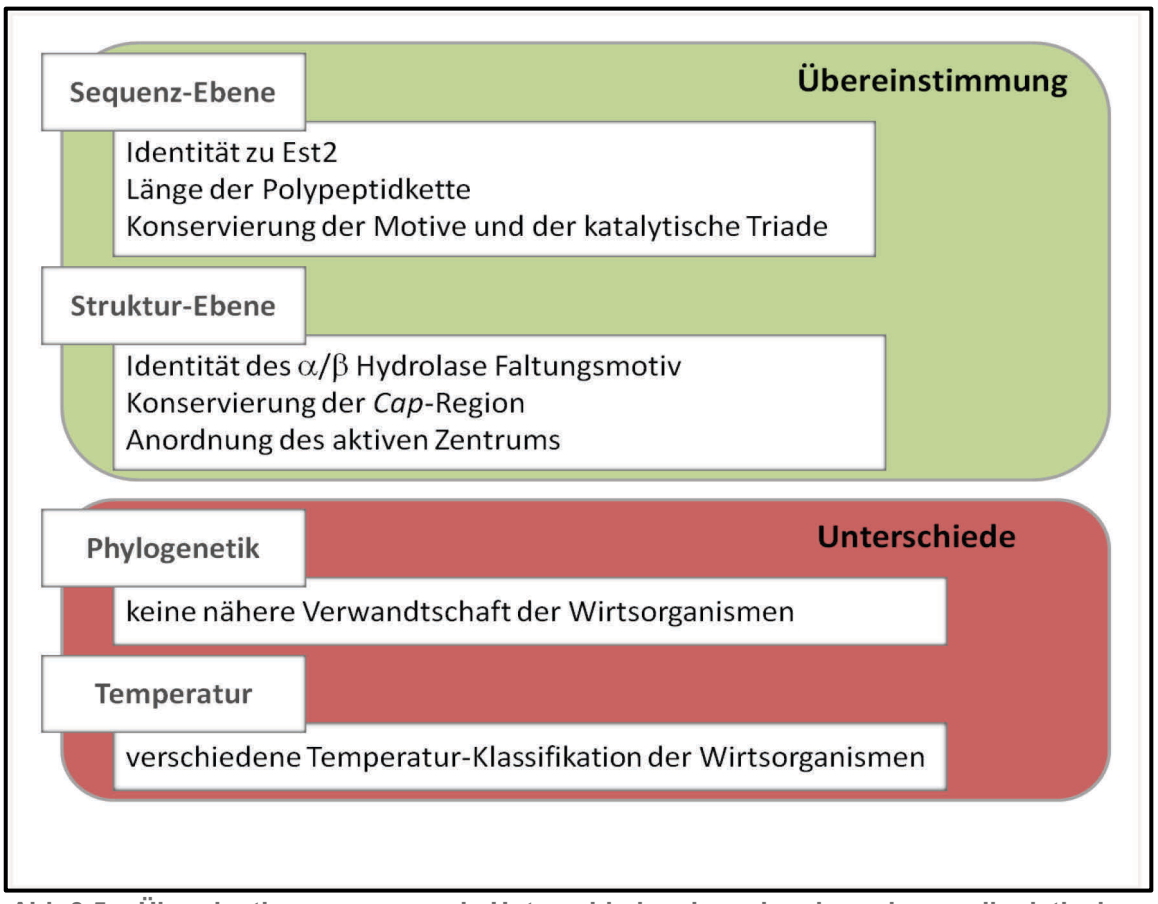

Abb.3.5: Übereinstimmungen und Unterschiede der vier homologen lipolytischen Enzyme. Die Darstellung verdeutlicht die Ähnlichkeiten auf Sequenz-und Struktur-Ebene der homologen Enzyme, sowie die Aspekte, die die Enzyme unterscheiden.

Somit eignen sich diese Enzyme, um spezifische Unterschiede der Enzyme herauszuarbeiten und auf deren unterschiedliche Temperatur-Ursprünge zurückzuführen. Auf diese Weise sollen im Folgenden die molekularen Mechanismen der Temperatur-Adaption analysiert werden.

Die Auswahl von homologen Enzymen mit unterschiedlichem Temperaturbereich ergab schon in anderen Studien eine geeignete Basis zur Untersuchung von Temperatur-

Adaptions-Mechanismen. So konnte unter anderem durch Studien von homologen Kinasen, α-Amylasen und Ligasen bestimmte Eigenschaften der Temperatur-Adaption identifiziert werden (Bae & Phillips, 2004; D'Amico *et al.*, 2003; Georlette *et al.*, 2003). Diese Studien beziehen sich allerdings oftmals auf Organismen eng verwandten phylogenetischen Ursprungs, da dies meist hohe Sequenz-Homologien mit sich bringt. Durch diese Betrachtung werden die Mechanismen der Adaption jedoch Spezies-bezogen analysiert, wodurch die Möglichkeit besteht, dass diese nicht generalisiert werden können. Die Wirtsorganismen der hier ausgewählten Esterasen besitzen aus phylogenetischer Sicht keine nähere Verwandtschaft, da sie alle unterschiedlichen Familien zuzuordnen sind. Dies ermöglicht die Analyse der allgemeinen molekularen Mechanismen und nicht der Spezies- oder Familien-spezifischen Mechanismen.

Die Eigenschaften psychrophiler und thermophiler Esterasen wurden in zahlreichen Studien untersucht, wobei sich die Studien meistens speziell in Richtung einer extremen Temperatur orientierten. So wurden mesophile nur mit thermophilen oder nur mit psychrophilen Esterasen verglichen. Dies zeugt von dem neuartigen Potential der in dieser Arbeit ausgewählten Serie der homologen Esterasen. Nach heutigem Stand ist dies die erste detaillierte vergleichende Analyse einer Serie von vier Esterasen aus dem gesamten Temperaturspektrum.

3.2 Klonierung, Expression und Identifizierung der Est2-Homologen LipB, LipP und LipS

Die bioinformatische Auswahlstrategie führte zu einem komparativen Set an homologen Enzymen aus unterschiedlichen Temperaturbereichen. Um die Enzyme LipB, LipP und LipS für die biochemische Charakterisierung zu Verfügung zu stellen, wurden sie durch heterologe Expression der Gene in *E. coli* hergestellt. Nach der Konstruktion der Expressionsvektoren (3.2.1), sollten geeignete Bedingungen zur erfolgreichen Überexpression der Gene ermittelt werden. Die Produkte wurden zuvor auf DNA-Ebene mit einem N-terminalen Histidin-Tag versehen. In Folge dessen sollten die rekombinanten Enzyme mittels Affinitätschromatographie homogen isoliert werden können (3.2.2).

3.2.1 Konstruktion von Plasmiden zur Expression der Est2-Homologen LipB, LipP und LipS

Für die Überexpression der Gene *lipB*, *lipP* und *lipS* wurde das *E. coli* T7-Expressionssystem verwendet, das sehr hohe Proteinexpressionsraten erzielen kann (Rosenberg *et al.*, 1987; Studier *et al.*, 1990). Hierzu wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) verwendet , welcher das für die T7-RNA-Polymerase kodierende Strukturgen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors im Genom trägt und somit in der Lage ist, Gene unter Kontrolle des T7-Promotors zu exprimieren (Studier & Moffatt, 1986). Den zweiten Teil dieses System bildet ein pET-Vektor, auf dem stromaufwärts vom zu exprimierenden Gen der T7-Promotor codiert ist. Für die hier vorgenommen Klonierungen wurde der Vektor pET28a verwendet, der die Information für einen N- und C-terminalen His_6-*tag* trägt.

Um die Gene in diesen Vektor zu inserieren, wurden die für die Gene kodierenden Bereiche von der genomischen DNA der jeweiligen Stämme mittels PCR amplifiziert (2.11.4). Eine Ausnahme bildet hier das Gen *lipP*, das als synthetisches DNA-Molekül bezogen wurde, da hier die genomische DNA nicht zugänglich war. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide dienten sowohl der exakten Amplifizierung der Gene als auch der Insertion von Erkennungssequenzen für bestimmte Restriktionsendonukleasen. Die *Nde*I-Erkennungssequenz, die das Startcodon ATG beinhaltet, wurde am 5`-Ende, und die *Xho*I-Erkennungssequenz, welche das Stoppcodon TGA enthält, am 3`-Ende der jeweiligen Gene eingefügt.

Nach der PCR erfolgte die Reinigung der resultierenden Produkte und Hydrolyse mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (*Nde*I und *Xho*I) (2.11.2). Der mit den gleichen Restriktionsendonukleasen hydrolisierte Vektor und die Gene wurden anschließend ligiert und das jeweilige Produkt in *E. coli* DH5α transformiert (2.11.7). Um Mutationen und fehlerhafte Vorgänge auszuschließen, wurden die Konstrukte nach der Klonierung durch

Sequenzierung überprüft. Die aus dieser Klonierungsstrategie resultierenden Expressionsplasmide enthielten einen His_6-*tag* am N-Terminus, eine Ribosomenbindestelle, den T7-Promotor und das zu exprimierende Gen *lipB*, *lipP* oder lipS. Die Bezeichnungen dieser Expressionsplasmide lauten hier *E. coli* BL21(DE3)- pET28a-*lipB*H_6, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipP*H_6 und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipS*H_6 genannt.

3.2.2 Heterologe Überexpression der Est2-Homologen und deren Reinigung mittels Affinitätschromatographie

Um die Funktion nicht charakterisierter Proteine zu ermitteln, sollten diese so isoliert werden, dass sie aktiv, rein und in hoher Konzentration vorliegen. Hierzu wurde eine Reihe von Expressionsexperimenten durchgeführt, um die optimalen Bedingungen zur Produktion großer Mengen Proteins zu finden. Da die rekombinanten Proteine einen His_6-*tag* trugen, werden sie in den folgenden zwei Kapiteln (3.2 und 3.3) als $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ bezeichnet.

Zur Überexpression von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ im heterologen Wirt wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden pET28a-*lipB*H_6, pET28a-*lipP*H_6 und pET28a-*lipS*H_6 transformiert (2.11.7). Zunächst wurden für das T7-Expressionsystem gebräuchliche Expressionsbedingungen geprüft (2.10.2). Hierzu erfolgte eine Überexpression mit IPTG-Induktion bei 37 °C. Die Ergebnisse wurden mit SDS-PAGE-Analysen (2.12.6) und Aktivitätsmessungen (2.13.1) nach zwei, vier und sechs Stunden nach der Induktion geprüft. In den SDS-PAGE-Analysen, bei der vergleichbare Proteinmengen aus den GZE des Negativkontrollstammes (*E. coli* BL21(DE3)-pET28a) und der drei Expressionsstämme (*E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipB*H_6, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipP*H_6 und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipS*H_6) aufgetrennt wurden, konnte bei jeder Probe der Expressionsstämme eine zusätzliche Proteinbande bei einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa identifiziert werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies entspricht den aus der Primärstruktur berechneten Molekulargewichten der Enzyme. Die Proteinbanden verstärkten sich mit zunehmender Expressionsdauer nicht, sodass davon auszugehen ist, dass nach zwei Stunden das maximale Proteinlevel innerhalb der Zellen erreicht war.

Die starke Überproduktion einzelner Proteine kann zu fehlerhaften Faltung führen (Singh & Panda, 2005), so dass der Erfolg der Überexpression durch Aktivitätsmessungen geprüft wurde. Da durch Sequenz- und Strukturanalysen die Enzyme LipS und LipB als putative Esterasen zugeordnet werden konnten und LipP als Esterase beschrieben ist (Choo *et al.*, 1998), wurde das Esterase-Substrat *para*-Nitrophenyl-Butyrat gewählt (Leščić Ašler *et al.*, 2010). Den Erwartungen entsprechend erwies sich dieses Substrat hier als geeignet. So konnten den zusätzlichen Proteinbanden der Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipB*H_6, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipP*H_6 und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipS*H_6

vergleichend zum Negativkontrollstamm auch zusätzliche Esterase-Aktivitäten zugeordnet werden (Abb.3.6).

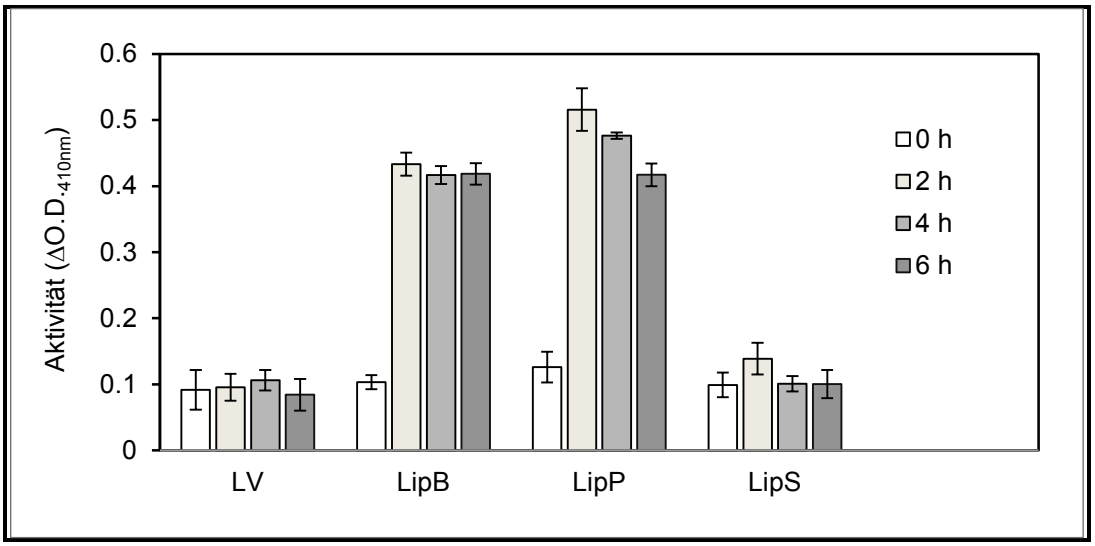

Abb.3.6: Esterase Aktivität von GZE der Expressionen von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ bei 37° C und IPTG-Induktion. Dargestellt sind die Ergebnisse von Aktivitätsmessungen der GZE des Negativkontrollstammes *E. coli* BL21(DE3)- pET28a (LV) und der drei Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipBH*$_6$, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipPH*$_6$ und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipSH*$_6$ (LipB, LipP und LipS) von Überexpressionen bei 37 °C vor IPTG Induktion der Überexpression (0h), zwei, vier und sechs Stunden nach IPTG Induktion (2 h, 4 h, 6 h). Die Absorption wurde bei 410 nm nach 5 Min gemessen, eingesetzt wurde 5µl des jeweiligen GZE (OD_{580nm}= 10) und 200µl Substrat-Lösung (0,2 mM *para*-Nitrophenol-Butyrat).

Die in Abbildung 3.6 dargestellten Ergebnisse zeigen mit Ausnahme von $LipS_{H6}$ einen beträchtlichen Anstieg der Aktivität der GZE nach Induktion mit IPTG, aber keine Zunahme der Aktivitäten nach mehr als zwei Stunden nach Induktion. Dies veranschaulicht die Selektivität und Effizienz des T7-Expressionssystem. Die GZE-Proben aus dem *lipSH*$_6$-Expressionsstamm hingegen wiesen keinerlei Aktivität auf. Dies lässt darauf zurückschließen, dass entweder die Menge an nativem $LipS_{H6}$ nicht ausreichend war, um dessen Aktivität messen zu können oder kein geeignetes Substrat gewählt wurde. Die Verwendung längerkettiger Substrate in Aktivitätstest dieses GZE zeigte ebenfalls keine Aktivität (Ergebnisse nicht dargestellt).

Diese Tatsache veranlasste zu einer Untersuchung der einzelnen Fraktionen des GZE des Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipSH*$_6$. Hierzu wurden der GZE in lösliche und unlösliche Fraktionen aufgetrennt (2.12.2) und diese einzelnen Fraktionen erneut durch SDS-PAGE-Analyse untersucht. So konnte die markante zusätzliche Proteinbande des exprimierten $LipS_{H6}$ in der unlöslichen Fraktion detektiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Verwendung des T7-Expressionssystem kann durch Bildung inkorrekt gefalteter Zielproteine, so genannter *inclusion bodies*, limitiert sein. Dabei führt die starke Expression zu einer Aggregation des Zielproteins innerhalb der Zelle und somit zum Aktivitätsverlust der Enzyme.

Es sollten nun Expressionsbedingungen geschaffen werden, durch die eine verbesserte Expressionskontrolle sowie ein verbessertes Proteinproduktionsniveau erzeugt werden könnten. Eine Möglichkeit der Bildung von *inclusion bodies* entgegenzuwirken, ist die Schwächung der *de novo* Protein-Synthese während der Expression durch Reduktion der Induktionsstärke (Margreiter *et al.*, 2008a; Margreiter *et al.*, 2008b). Ein Mittel hierzu bietet das Autoinduktionsmedium, das die Zugabe von IPTG zum Initiieren der Expression ersetzt. Die Induktion der T7-RNA-Polymerase erfolgte durch im Medium vorhandene Laktose nach Verbrauch der Glukose. Über das Verhältnis von Glucose zu Laktose wird der Induktionszeitpunkt in die exponentielle Wachstumsphase mit einer möglichst hohen Zelldichte gelegt. Zusätzlich enthält dieses Medium Phosphatpuffer, welcher den pH-Wert im Verlauf der Kultivierung konstant hält (Studier, 2005).

Ein weiterer Faktor, durch den die Löslichkeit rekombinanter Proteine gesteigert werden kann, ist das Vermindern der Expressionstemperatur (Graslund *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2007). Niedrigere Temperaturen bewirken eine Reduzierung der hydrophoben Interaktion von Proteinen, so dass diese ein größeres Zeitfenster haben, um in ihre native Konformation überzugehen (Baldwin, 1986). In mehreren Arbeiten wurde die Senkung der Expressionstemperatur zur Reduzierung der Aggregation rekombinanter Proteine beschrieben (Kim *et al.*, 2012; Schein, 1991; Strandberg & Enfors, 1991; Vera *et al.*, 2006). Der Temperaturabsenkung sind allerdings durch die niedrigsten Wachstumstemperaturen der Wirtsbakterien Grenzen gesetzt, so dass sich auch Expressionssysteme psychrophiler Organismen etabliert haben (Miyake *et al.*, 2007).

Zur Untersuchung des Einflusses dieser beiden Faktoren (Induktion und Temperatur) wurden die Expressionsstämme inklusive des Negativkontrollstamms sowohl bei 15 °C (48 h) als auch bei 37 °C (16 h) in Autoinduktionsmedium kultiviert. Die untere Temperaturgrenze für das Wachstum von *E. coli* liegt bei ca. 7 °C und ergab eine Teilungsrate von ca. 45 Min, sodass die Dauer der Expression bei 15 °C auf 48 h verlängert wurde (Jones *et al.*, 2004).

Im analysierten GZE der drei Expressionsstämme (*E. coli* BL21(DE3)- pET28a-*lipBH$_6$, E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipPH$_6$* und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipSH$_6$*) wurde im Vergleich zum GZE der Negativkontrolle (*E. coli* BL21(DE3)-pET28a) bei einer SDS-PAGE Analyse bei ca. 35 kDa eine zusätzliche Proteinbande detektiert, die den Molekulargewichten von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ entspricht (Ergebnisse nicht dargestellt). In Abbildung 3.7 sind die Ergebnisse der Esteraseaktivitätsmessung mit denselben GZE- Proben im Vergleich mit der vorigen Expression bei 37 °C und IPTG-Induktion darstellt.

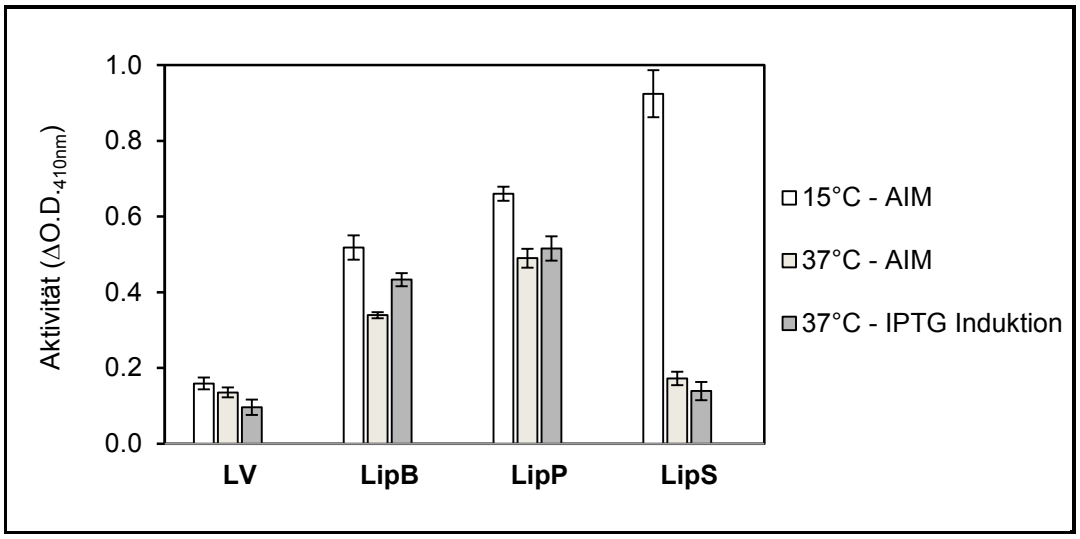

Abb.3.7: Esterase Aktivität von GZE bei Expressionen von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ unter verschieden Temperatur- und Induktionsbedingungen. Dargestellt sind die Ergebnisse von Messungen der GZE des Negativkontrollstammes *E. coli* BL21(DE3)-pET28a (LV) und der drei Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)- pET28a-*lipBH*$_6$, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipPH*$_6$ und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipSH*$_6$ (LipB, LipP und LipS) nach Überexpression bei 37 °C zwei Stunden nach IPTG-Induktion, bei 37 °C in Autoinduktionsmedium (37 °C - AIM) nach 16 Stunden und bei 15 °C in Autoinduktionsmedium (15 °C - AIM) nach 48 Stunden. Die Absorption wurde bei 410 nm nach 5 Min gemessen, eingesetzt wurde 5 µl des jeweiligen GZE (OD_{580nm}= 10) und 200 µl Substrat-Lösung (0,2 mM *para*-Nitrophenol-Butyrat).

Sowohl bei 15 °C als auch bei 37 °C Wachstumstemperatur konnte aktives $LipB_{H6}$ und $LipP_{H6}$ exprimiert werden. Aktivität von $LipS_{H6}$ hingegen konnte nur bei einer Expressionstemperatur von 15 °C gemessen werden. Dies verstärkt die Annahme, dass $LipS_{H6}$ bei einer Temperatur von 37 °C nicht stabil genug ist und seine native Struktur verliert. Beim Vergleich der Aktivitäten aller getesteter Expressionsbedingungen werden die optimalen Bedingungen der Enzyme ersichtlich. Die höchsten Aktivitäten der GZE konnten in Überexpressionen bei 15 °C in Autoinduktionsmedium gemessen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Temperatur-bedingte Verringerung der Syntheserate der zu exprimierenden Proteine deren Faltung begünstigt und somit die Aktivität erhöht.

Nach diesen erfolgreichen Überexpressionen galt es nun, die Löslichkeit der Proteine zu überprüfen und sie anschließend zu reinigen. Dazu wurden Proben von bei 15 °C mit Autoinduktionsmedium durchgeführten Expressionen in ihre lösliche und unlösliche Fraktion aufgetrennt und in Aktivitätsmessungen eingesetzt (Abb. 3.8).

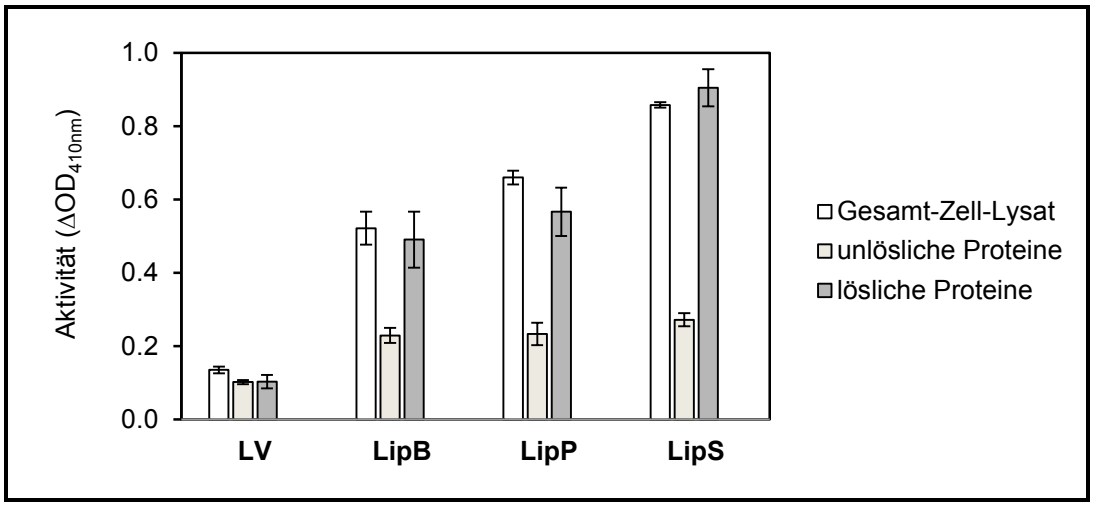

Abb.3.8: Esterase Aktivität von fraktionierten *E. coli*-Extrakten nach Expression bei 15 °C in Autoinduktionsmedium. der Gesamt-Zell-Lysate (GZL), der Fraktion der unlöslichen Proteinen (UF) und der Fraktion der löslichen Proteine (LF) des Negativkontrollstammes *E. coli* BL21(DE3)- pET28a (LV) und der drei Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)- pET28a-*lipBH*$_6$, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipPH*$_6$ und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipSH*$_6$ (LipB, LipP, LipS). Dargestellt sind die Messungen nach Überexpression bei 15 °C in Autoinduktionsmedium (AIM) nach 48 Stunden. Die Absorption wurde bei 410nm nach 5 Min gemessen, eingesetzt wurde 5µl der jeweiligen Probe (OD_{580nm}= 10) und 200µl Substrat-Lösung (0,2 mM *para*-Nitrophenol-Butyrat).

Zudem wurden diese Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.9). Sowohl die SDS-PAGE-Analyse als auch die Aktivitätsmessungen dokumentieren, dass sich die rekombinanten Proteine in der Fraktion der löslichen Proteine befinden.

Um die erwünschte Reinheit der Esterasen zu erreichen, wurden diese mittels immobilisierender Metall-Affinität-Chromatographie (IMAC) aus der löslichen Fraktion der jeweilgen GZE isoliert (2.12.2). Hierbei spielt der N-terminale Affinitätsanhang der Enzyme (His_6-*tag*) eine entscheidende Rolle, da er selektiv an der verwendeten Säulenmatrix bindet und so zur Isolierung des Proteins eingesetzt werden kann (Terpe, 2003). Zur Reinigung der Esterasen $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ wurden die Überexpressionen bei 15 °C in Autoinduktionsmedium durchgeführt und die Fraktionen der löslichen Proteine verwendet. Die Elution der Proteine erfolgte mit steigenden Imidazol-Konzentrationen, um eine Minimierung unspezifischer Bindungen zu erreichen (Hefti *et al.*, 2001). Die SDS-PAGE-Analysen der einzelnen Fraktionen der Reinigung demonstrierten, dass $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ durch einen zugänglichen His_6-*tag* selektiv an der Säulenmatrix gebunden haben (Ergebnisse nicht dargestellt). Dadurch wurde die Elution in elektrophoretisch homogener Form ermöglicht (Abb.3.9). Da die anschließende Konzentrierung und Umpufferung der rekombinanten Proteine (2.12.4) keinen Aktivitätsverlust mit sich brachten (Ergebnisse nicht dargestellt), sind die Produkte der Expressionen und Reinigungen die reinen, aktiven Proteine $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$.

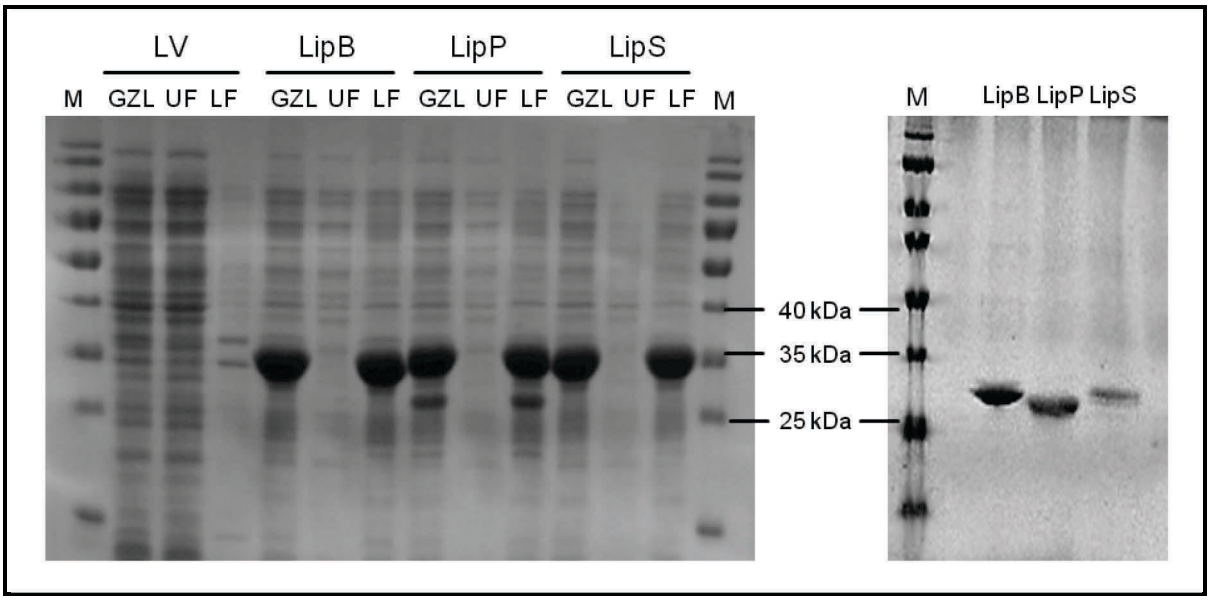

Abb.3.9:SDS-PAGE-Analyse der Überexpressionen von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ bei 15 °C nach Fraktionierung und nach der immobilisierende Metall-Affinität-Chromatographie (IMAC). Dargestellt sind links im Bild das Gesamt-Zell-Lysate (GZL), die Fraktion der unlöslichen Proteine (UF) und der löslichen Proteine (LF) des Negativkontrollstammes *E. coli* BL21(DE3)- pET28a (LV) und der drei Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)- pET28a-*lipB*H_6(LipB), *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipP*H_6 (LipP) und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*lipS*H_6 (LipS). Die Proben wurden nach Überexpression bei 15 °C in Autoinduktionsmedium (AIM) nach 48 Stunden genommen und fraktioniert. Eingesetzt wurde 10 µl der jeweiligen Probe (OD_{580nm}= 10). Zusätzlich sind die Elutionsfraktionen der IMAC der Enzyme $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ aufgetragen (rechtes Bild). Der hier verwendete Größenstandart (M) ist der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas; St. Leon-Rot).

Durch die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assays konnten die gewonnen Proteinmengen bestimmt werden (2.12.5). So konnten aus je einem Liter Kulturvolumen erhebliche Mengen von 146 mg $LipB_{H6}$, 640 mg $LipP_{H6}$ und 176 mg $LipS_{H6}$ gewonnen werden. In einem weiteren Versuch wurden die gereinigten Enzyme $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ immunologisch mittels Western-Blot unter Verwendung eines gegen den His_6-*tag* gerichteten Antikörpers nachgewiesen (2.12.7; Ergebnisse nicht dargestellt). Zusätzlich wurden die rekombinaten Enzyme aus den Proteinbanden der Elutions-Fraktionen aus einem SDS-Gel durch MALDI-TOF-MS-Messungen identifiziert (2.12.8).

3.2.3 Zusammenfassung: Klonierung, Expression und Identifizierung der Est2-Homologen LipB, LipP und LipS

Das Ziel der Überexpression war die Gewinnung der rekombinanten Proteine $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$. Anschließend sollten sie in großen Menge und homogen isoliert werden, so dass sie zu biochemischen Charakterisierung eingesetzt werden können. In Tabelle 3.3 sind die verschiedenen getesteten Expressionsbedingungen aufgelistet. Diese Tabelle verdeutlicht, dass die beste Expressionstemperatur für die Gewinnung der drei rekombinanten Esterasen 15 °C (in Autoinduktionsmedium) ist.

Tab.3.3: Ergebnisse der Überexpression, Reinigung und Identifizierung von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$.

	Überexpression			Ausbeute	Identifizierungsmethode		
	IPTG Aktivität	37 °C AIM Aktivität	15°C AIM Aktivität	mg/L Kultur	SDS-PAGE	Immuno-blot	MALDI-TOF-MS
$LipB_{H6}$	++	++	+++	146	✓	✓	✓
$LipP_{H6}$	++	++	+++	640	✓	✓	✓
$LipS_{H6}$	-	-	+++	176	✓	✓	✓

Keine Aktivität: -, + + und + + + zeigen die Enzymaktivität.

Die Überprüfung der Löslichkeit ergab, dass alle drei Proteine in löslicher und aktiver Form identifiziert werden konnten, so dass aus der löslichen Fraktion die rekombinanten Proteine mittels Metall-Affinität-Chromatographie (IMAC) gereinigt werden konnten. Da der N-terminale His_6-*tag* für das Ni-NTA Material zugänglich war, konnte $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ mittels IMAC erfolgreich aufgereinigt werden (Abb. 3.8). Die Identifizierung dieser Enzyme erfolgte mittels SDS-PAGE, immunologischen Nachweise, Esteraseaktivitätsmessungen und MALDI-TOF-MS (Tab. 3.3).

3.3 Biochemische Charakterisierung der Est2-Homolgen $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$

Durch bioinformatische Analysen wurden gezielt Enzyme mit Homologie zu Est2 identifiziert. Molekularbiologische Methoden ermöglichten die Bereitstellung dieser Enzyme für deren biochemische Charakterisierung. Zur Charakterisierung der homologen Proteine sollten die biochemischen Eigenschaften wie Protein-Stabilität, Aktivität und Substrat-Spezifität untersucht werden. Bei dieser proteinchemischen Charakterisierung stand der Vergleich mit der homologen Esterase Est2 im Vordergrund, woraus einerseits Gemeinsamkeiten Erklärungsansätze für das Vorhandensein der bis zu 47 % identischen Aminosäuren und anderseits Differenzen Aufschluss über die Mechanismen der Temperatur-Adaption abgeleitet werden sollten. Die hier durchgeführten biochemischen Charakterisierungen wurden mit den gereingten, einen His_6-*tag* tragenden Enzymen durchgeführt.

3.3.1 $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ zeigen vergleichbare Esterase-Substratspezifitäten

Zur Klassifizierung der lipolytischen homologen Enzyme wurden Substratspektren aufgenommen. Die Substratspezifitäten von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ wurden spektroskopisch mit *para*-Nitrophenyl-Estern unterschiedlicher Kettenlänge bestimmt (2.13.1).

Abbildung 3.10 zeigt die spezifischen Aktivitäten der Enzyme $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ gegenüber *para*-Nitrophenylestern mit einer Kettenlänge von C2-C18. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Präferenz gegenüber den Substraten der drei Enzyme vergleichbar ist, da sich die Aktivitäten auf kurzkettige *para*-Nitrophenyl-Ester beschränken. Darüber hinaus wird ersichtlich, dass $LipB_{H6}$ ein breiteres Substratspektrum als die beiden anderen Enzyme besitzt. $LipB_{H6}$ zeigt bei den kurzkettigen Substraten die geringste Aktivität gegenüber *para*-Nitrophenyl-Acetat (C2) und maximale Aktivität gegenüber *para*-Nitrophenyl-Butyrat (C4). Die spezifischen Aktivitäten nehmen anschließend mit zunehmender Kettenlänge des Substrates (C6-C12) ab. $LipP_{H6}$ zeigte die höchste spezifische Aktivität gegenüber *para*-Nitrophenyl-Caproat (C6), wobei auch eine deutliche Aktivität gegenüber *para*-Nitrophenylbutyrat (C4) und *para*-Nitrophenyl-Acetat (C2) zu verzeichnen ist. *Para*-Nitrophenyl-Caprylat (C8) stellt das Substrat mit der größten Kettenlänge für dieses Enzym dar. $LipS_{H6}$ zeigt mit spezifischen Aktivitäten gegenüber *para*-Nitrophenylestern mit einer Kettenlänge von C2-C6 das kleinste Substratspektrum, wobei mit *para*-Nitrophenyl-Butyrat (C4) die maximale Aktivität erreicht wurde. Auch hier konnte wie für $LipP_{H6}$ und $LipB_{H6}$ beschrieben keine Aktivität gegenüber längerkettigeren Substraten verzeichnet werden.

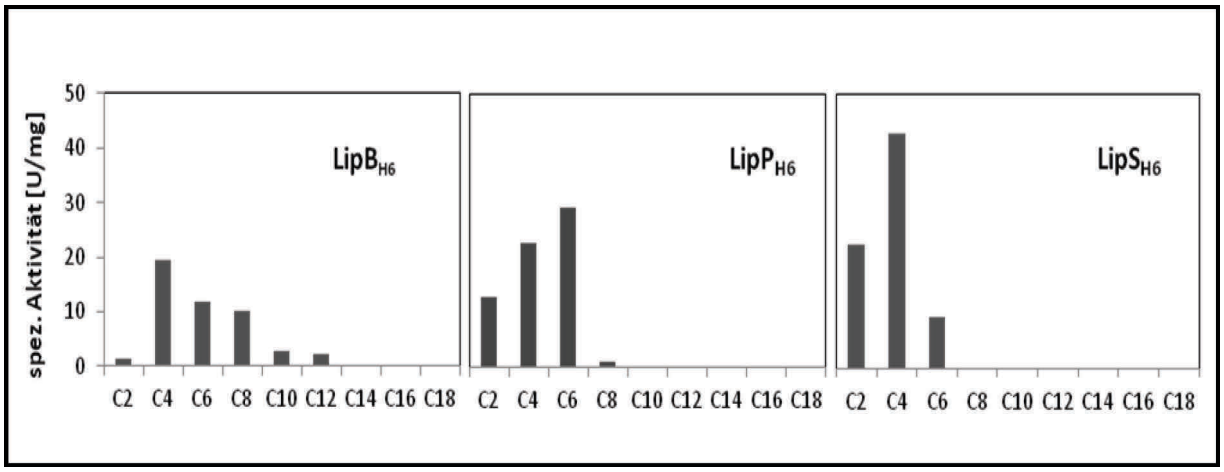

Abb.3.10: Spezifischen Aktivitäten von LipB$_{H6}$, LipP$_{H6}$ und LipS$_{H6}$ gegenüber Nitrophenyl-Ester Substraten unterschiedlicher Kettenlänge. Die Absorption wurde bei 405 nm gemessen, eingesetzt wurde 2 µl der jeweiligen Probe und 200 µl Substrat-Lösung. Die Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 10%.

Die Ergebnisse weisen Ähnlichkeiten zum in der Literatur beschriebenen Substratspektrum von Est2 auf. Hier steigt die Aktivität bis zu *para*-Nitrophenyl-Estern mit einer Kettenlänge von C6. Mit zunehmender Kettenlänge sinkt die spezifische Aktivität von Est2 wieder (Manco *et al.*, 1998). Diese Beobachtungen sind kongruent zu anderen Enzymen der HSL-Familie, welche ebenfalls Präferenzen für kurzkettige *para*-Nitrophenyl-Ester aufweisen (Chahinian *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2009; Virk *et al.*, 2011).

Die Präferenzen für kurzkettige *para*-Nitrophenyl-Ester steht im Zusammenhang mit Interaktionen des Substrates, der hydrophoben Bindetasche und des aktiven Zentrums eines Enzyms. Molekulare Gründe für diese Substratpräferenzen könnten in der dreidimensionalen Struktur der Enzyme liegen. Hierbei könnte die tief im Proteininneren liegende Substratbindetasche die Hydrolyse längerkettiger Substrate sterisch verhindern. Dieser Erklärungsansatz wurde auch für das Substratspektrum von Est2 beschrieben (Manco *et al.*, 1998).

Die Ursache für die differenten Präferenzen der untersuchten Enzyme zu *para*-Nitrophenyl-Estern mit einer Kettenlänge von C4 und C6 könnten durch Mutationsstudien analysiert werden. Diese können physikochemische Eigenschaften eines Proteins verändern, wodurch die räumlichen Distanzen und Wechselwirkungen innerhalb der Substratbindetasche abgewandelt werden können. So konnten beispielsweise Mutationen zweier Aminosäuren nahe des aktiven Zentrums einer HSL Esterase aus *Streptomyces coelicolor* A3 (2) deren Substratspezifität ändern. Obwohl sich das Substratspektrum durch diese Mutationen vergrößerte, zeigten die entsprechenden Varianten dennoch dasselbe Substratoptimum wie das Wildtyp-Enzym. Dies weist auf weitere Faktoren hin, welche in die Substratspezifität dieses Enzyms involviert sind. Für Est2 wurde die Rolle des N-Terminus hinsichtlich der Substratspezifität beschrieben (Mandrich *et al.*, 2005). So könnte der im Vergleich zu

homologen Enzymen verlängerte N-Terminus der Esterase aus *S. coelicolor A3 (2)* zu deren differentem Substratspektrum beitragen (Soror *et al.*, 2009). Bei der Betrachtung des in Abbildung 3.1 dargestellten Aminosäuresequenzvergleichs wird ersichtlich, dass auch hier, zumindest für $LipB_{H6}$, die Ursache der differenten Präferenz gegenüber *para*-Nitrophenyl-Butyrat im verlängerten N-Terminus gefunden werden könnte.

Anhand ihres Substratspektrums werden lipolytische Enzyme unter anderem in Esterasen (EC 3.1.1.1.) und Lipasen (EC 3.1.1.3.) unterteilt. Lipasen hydrolysieren die Ester von langkettigen Fettsauren (C > 10 Kohlenstoffatome), wohingegen Esterasen kurzkettige Ester spalten (C < 10 Kohlenstoffatome) (Arpigny & Jaeger, 1999). Nach dieser Definition zeigen die Substratspektren von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$, dass diese zu den Esterasen (EC 3.1.1.1.) zu zählen sind.

3.3.2 $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ haben verschiedene Temperatur-Optima

Die Temperatur ist für die Enzymaktivität ein wichtiger Faktor. Jedes Enzym besitzt ein Temperaturoptimum, bei dem seine Reaktionsrate am höchsten ist. Zur Ermittlung des Temperaturspektrums von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$, wurde die Esteraseaktivität unter Verwendung von *para*-Nitrophenyl-Butyrat (C4) bei verschiedenen Temperaturen (5-75 °C) gemessen. Es wurde bei verschiedenen Substratkonzentrationen die jeweilige Enzymaktivität bestimmt und die kinetische Konstante k_{cat} ermittelt (2.13.2). Die Wechselzahl k_{cat} gibt an, wie viele Substratmoleküle bei vollständiger Sättigung des Enzyms pro Zeiteinheit umgesetzt werden.

Es zeigte sich bei allen drei Esterasen Aktivität über einen relativ weiten Temperaturbereich, wobei das Aktivitätsmaximum für $LipB_{H6}$ bei 40 °C, für $LipP_{H6}$ bei 35 °C und $LipS_{H6}$ bei 30 °C bestimmt wurde (Abb. 3.11). Interessanterweise spiegeln die unterschiedlichen Temperaturoptima in der Tendenz von kalt nach warm auch die Temperatur-Klassifikationen der jeweiligen Wirtsorganismen wider. Durch den Vergleich mit dem Temperaturoptimum von Est2 wird diese Tendenz stärker verdeutlicht. Das Enzym, welches aus dem Bakterium *A. acidocaldarius* mit dem wärmsten Temperatur-Habitat isoliert wurde, hat mit 70 °C das höchste Temperaturoptimum (Manco *et al.*, 1998). Diese Daten wurden mit Est2 ohne einen Affinitäts-Anhang generiert. In einer anderen Arbeit mit diesem Enzym konnte nachgewiesen werden, dass Est2 mit einem N-terminalen His_6-*tag* keinen Unterschied in der Aktivität gegenüber verschiedenen Temperaturen aufwies (Alawieh, 2012). Am anderen Ende der Temperaturskala steht der psychrophile Stamm *S. halifaxensis*, aus welchem das in diesem

Vergleich betrachtete Enzym mit dem niedrigsten Temperaturoptimum (30 °C) identifiziert wurde.

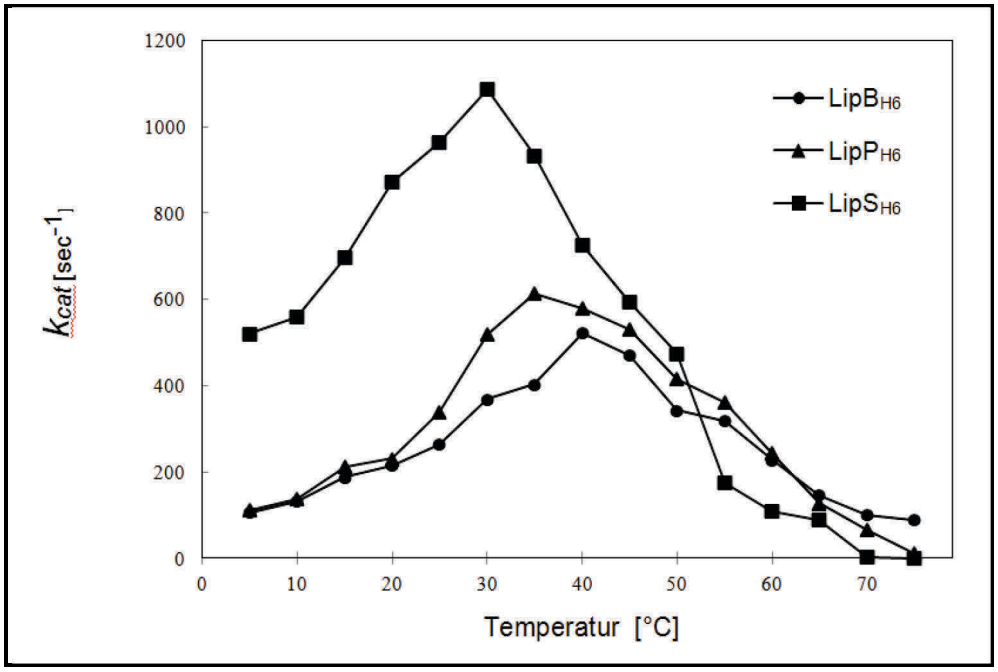

Abb.3.11: Temperatur-Optima von LipB$_{H6}$, LipP$_{H6}$ und LipS$_{H6}$. Graphische Darstellung der k_{cat}-Werte der untersuchten Temperaturen. Die Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 10%. Die Absorption wurde bei 405 nm gemessen, eingesetzt wurde 2 µl der jeweiligen Probe und 200 µl Substrat-Lösung.

Weiterhin verdeutlichen die Ergebnisse der Messungen einen typischen Verlauf von Temperaturspektren von Enzymen. Bei niedrigen Temperaturen (5 °C) nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit bis zum so genannten Optimum (Aktivitäts-Maximum) zu, weil die Substratmoleküle bei höherer Molekülbewegung öfter mit den aktiven Zentren zusammenstoßen. Diese Tendenz zeigt sich bis zur optimalen Temperatur eines Enzyms, an dem die größte Anzahl an Interaktionen zwischen dem Substrat und den Enzymen möglich ist. Jenseits des Temperaturoptimums fällt die Reaktivität der Esterasen mit zunehmender Temperatur. Dabei stört die Wärmeenergie die Wasserstoffbrücken und andere nicht kovalente Wechselwirkungen, welche die native Konformation der Enzyme stabilisieren, wodurch das Protein denaturieren kann. So zeigt Abbildung 3.11, dass die k_{cat}-Werte aller drei Esterasen mit steigender Temperatur jenseits desTemperaturoptimum deutlich fallen.

Bei Temperaturen über 50 °C ist bei LipS$_{H6}$ ein rapider Abfall der Aktivität festzustellen, welcher darauf zurückzuführen ist, dass viele *Shewanella*-Stämme als psychrophil beschrieben sind. So produzieren einige Shewanella-Stämme Esterasen, die bis zu 30 °C aktiv sind, wie die Esterase aus *Shewanella* sp. Ke75, welche wie LipS$_{H6}$ aus *S. halifaxensis* ein Temperaturoptimum von 30 °C aufweist (Kim *et al.*, 2013). Die vergleichend hohen k_{cat}-Werte bei niedrigeren Temperaturen, definieren LipS$_{H6}$ als eine psychrophiles Esterase. Psychrophile Enzyme weisen erhebliche Aktivitäten bei Temperaturen von 0-25 °C auf, bei

mesophilen Temperaturen von 25-45 °C können sie jedoch schon anfällig für thermische Denaturierung sein (Arpigny *et al.*, 1993; Guillaume *et al.*, 2012; Rashid *et al.*, 2001; Roh & Villatte, 2008). Ein weiterer Aspekt der Ergebnisse ist, dass die k_{cat}-Werte für $LipS_{H6}$ deutlich höher waren als die der beiden vergleichend betrachteten Enzyme. Die für das Temperaturoptimum von $LipS_{H6}$ ermittelte Wechselzahl liegt bei 1087 s^{-1}, wohingegen LipB mit 522 s^{-1} und LipP mit 614 s^{-1} eine deutlich reduzierte Wechselzahl aufweisen.

Verglichen mit ihren mesophilen Gegenstücken zeigen viele Kälte-adaptierte Enzyme höhere k_{cat}-Werte bei niedrigeren Temperaturen (Choo *et al.*, 1998). Dies befähigt psychrophile Enzyme zur verbesserten katalytischen Effizienz bei niedrigen Temperaturen, indem sie die Flexibilität ihrer Struktur erhöhen um die gefrierenden Effekte der kalten Habitate zu kompensieren (D'Amico *et al.*, 2006). So kann die Stärke der Bindung zum Substrat verringert werden, wodurch die benötigte Aktivierungsenergie für diesen Prozess reduziert wird. Dies führt schließlich zu einer erhöhten Geschwindigkeit der Reaktion, das durch die erhöhten k_{cat}-Werte von $LipS_{H6}$ ersichtlich wird (Feller & Gerday, 1997; Gianese *et al.*, 2002; Johns & Somero, 2004). Dies verdeutlicht die Bedeutung der Beziehungen zwischen Aktivität, Stabilität und Flexibilität in der Temperatur-Adaption.

Kürzlich wurde eine neue Esterase aus dem marinen Stamm *Pseudoalteromonas arctica* isoliert und charakterisiert. Die Esterase besitzt ein Temperaturoptimum von 25 °C und zeigt bei Temperaturen um den Gefrierpunkt von Wasser, vergleichend zu $LipS_{H6}$, Restaktivitäten von bis zu 50 % (Al Khudary *et al.*, 2010).

Das Enzym $LipP_{H6}$ aus dem psychrotoleranten Stamm *Pseudomonas* sp. B11-1 hat seine maximale Aktivität bei 35 °C. Widersprüche zu den Ergebnissen von Choo *et al*. (1998), welche ein Temperaturoptimum von 45 °C beschrieben, könnten auf Ungenauigkeiten der Messungen und Zeitabläufe zurückzuführen sein. Die Unterschiede können auch durch verschiedene pH-Werte der genutzten Puffer entstanden sein. Auch die Methoden zur Bestimmung des Temperaturoptimums unterscheiden sich, da bei Choo *et al.* (1998) Endpunktmessungen durchgeführt wurden. Allerdings konnte im Vergleich zu anderen Esterasen aus psychrotoleranten Organismen ein ähnliches Temperatur-Optimum gefunden werden (Cieśliński *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2003).
Für die Esterase $LipB_{H6}$ aus dem Stamm *B. thailandensis* wurde der höchste k_{cat}-Wert bei einer Temperatur von 40 °C ermittelt. Das ermittelte Temperatur-Optimum stimmt mit der Temperatur der optimalen Wachstumsrate von 37 °C für *B. thailandensis* annähernd überein (Brett *et al*., 1998) und deutet auf mesophiles Verhalten hin. Im Vergleich zu anderen charakterisierten mesophilen Esterasen konnte ein ähnliches Temperatur-Optimum gefunden werden (Khalameyzer *et al.*, 1999; Quax & Broekhuizen, 1994; Reiter *et al.*, 2000). Beachtlich ist jedoch hier auch die Restaktivität bei kälteren Temperaturen. Dieses

Temperaturverhalten wurde auch für andere mesophile Esterasen beschrieben (Guillaume *et al.*, 2012; Soror *et al.*, 2007).

Die Beziehung zwischen Temperatur und Aktivität der thermophilen Esterase Est2 wurde durch Manco *et al.* (1998) im Bereich von 5 °C bis 85 °C ermittelt. Est2 hat mit einem k_{cat}-Wert von ungefähr 7000 s^{-1} sein Aktivitätsmaximum bei 70 °C. Dies ist vergleichend zu den anderen drei homologen Enzymen sowohl die höchste Wechselzahl, als auch mit deutlichem Abstand das höchste Temperaturoptimum.

Mit der charakterisierten Esterase Est2 am warmen Ende der Temperaturskala und den hier beschriebenen homologen Esterasen konnte so ein interessantes Set von vier Enzymen mit Temperaturoptima aus allen Bereichen erstellt werden.

3.3.3 Unterschiede der Temperaturstabilität der Est2-Homologen $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$

Der irreversible Einfluss thermischer Einwirkung auf die Enzymstruktur der drei homologen Esterasen wurde durch Stabilitätsmessungen nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (5-75 °C) untersucht. Hierbei wurde eine Zeitspanne von drei Stunden gewählt, in welcher in Intervallen von 20 Min die Restaktivitäten photometrisch bestimmt wurden (2.13.3). Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse sind nur die Aktivitäten nach einer und drei Stunden in Abbildung 3.12 dargestellt.

Die Messungen ergaben für alle drei Enzyme unterschiedliche Temperaturstabilitäten. Bei Inkubationstemperaturen von 5 °C bis 15 °C war für $LipB_{H6}$ nahezu kein Aktivitätsverlust zu verzeichnen. Erst mit steigenden Temperaturen kam es zu einer Inaktivierung des Enzyms, so dass bei 45 °C nach einer Stunde nur noch 28 % Restaktivität und nach drei Stunden, keine Aktivität gemessen werden konnte. Dies scheint zunächst untypisch für ein mesophiles Enzym, da es bei den mesophilen Temperaturen seines Wirtsorganismus weniger stabil ist. Allerdings ist dieses Temperaturverhalten auch bei anderen mesophilen Esterasen beschrieben worden (Khalameyzer *et al.*, 1999).

Das $LipP_{H6}$-Protein zeigte von 5 °C bis 20 °C absolute Stabilität über eine und drei Stunden hinweg. Bei höheren Temperaturen sank die gemessene Aktivität. Sowohl Esterasen anderer psychrotoleranter Stämme, als auch PsEst1, ebenfalls eine Esterase aus dem Stamm *Pseudomonas* sp. B11-1, weisen vergleichende Temperaturstabilitäten auf (Suzuki *et al.*, 2003). Dies lässt schlussfolgern, dass $LipP_{H6}$ eine psychrotolerante Temperaturstabilität besitzt.

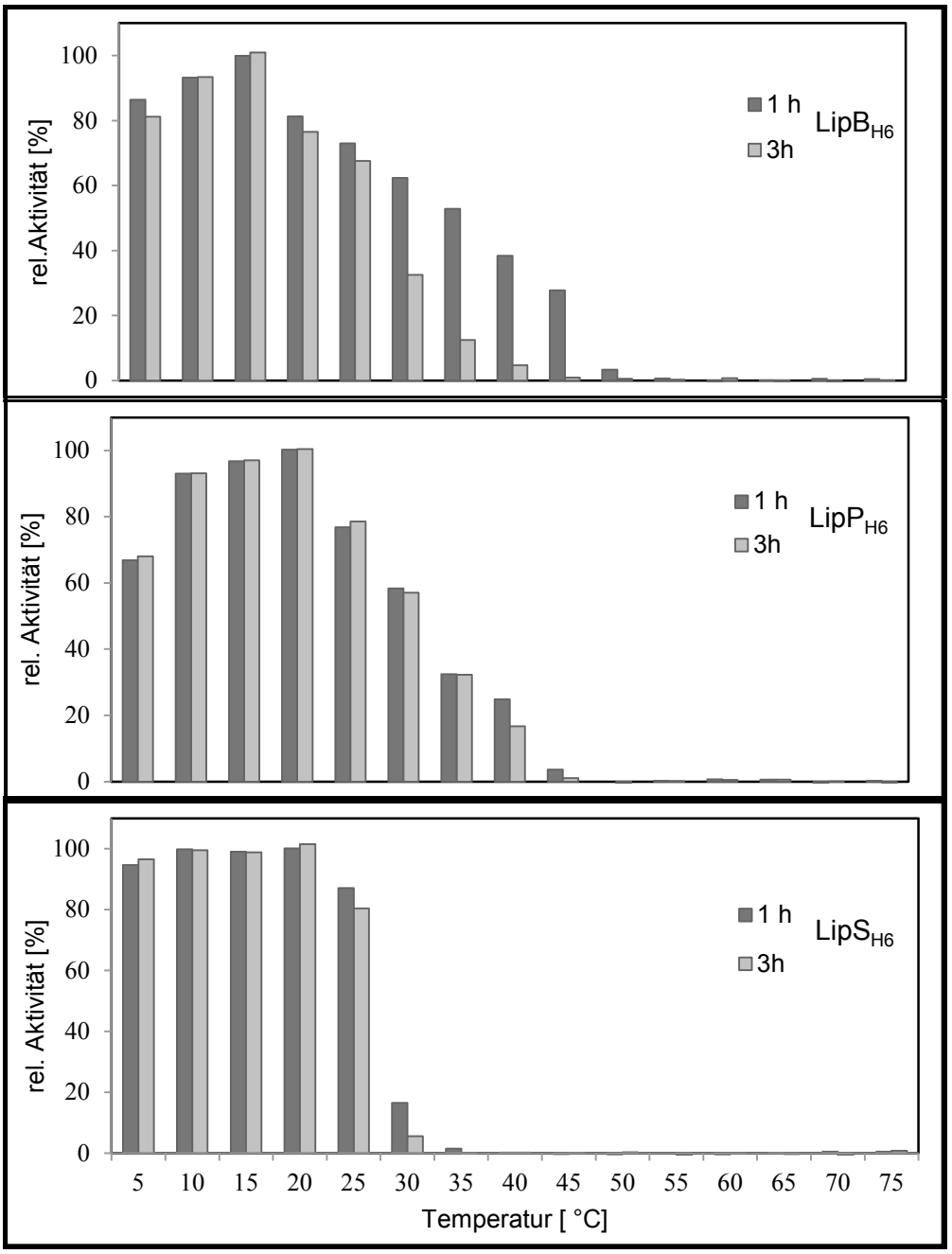

Abb.3.12: Temperaturstabilitäten der Enzyme LipB$_{H6}$, LipP$_{H6}$ und LipS$_{H6}$. Die Enzyme wurden über 3 h bei Temperaturen von 5-75 °C inkubiert. Nach 1 bzw. 3 h wurden bei den Temperaturoptima der jeweiligen Esterasen unter Verwendung von 0,2 mM *para*-Nitrophenyl-Butyrat als Substrat Aktivitätsmessungen durchgeführt. Als 100 % wurde die Aktivität zum Zeitpunkt t0 der Inkubation definiert. Die Absorption wurde bei 405 nm nach 10 Min gemessen, eingesetzt wurde 2µl der jeweiligen Probe und 200 µl Substrat-Lösung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 10 %.

Vergleichend zu LipP$_{H6}$, war LipS$_{H6}$ ebenfalls bei Inkubationstemperaturen bis 20 °C stabil. Bei der Reaktionstemperatur, bei der die höchste Enzymaktivität vorliegt (30 °C), verliert das Enzym in einer Stunde 83 % seiner Aktivität. Bei Inkubationstemperaturen von 40 °C und höher war bereits nach 20 Min keine Aktivität zu verzeichnen. Obwohl beide Enzyme LipP$_{H6}$

und $LipS_{H6}$ bei 20 °C Inkubationstemperatur 100°% Stabilität aufweisen, ist jedoch ein entscheidender Unterschied sichtbar. $LipS_{H6}$ hat bei Temperaturen von 5-20 °C stets eine Aktivität von 100 %, während $LipP_{H6}$ und auch $LipB_{H6}$ bei diesen Temperaturen geringere Stabilitäten aufweisen. Auch die Abnahme der Stabilität bei höheren Temperaturen erfolgt bei $LipS_{H6}$ vergleichend zu $LipP_{H6}$ und $LipB_{H6}$ viel schneller. So braucht es einen Temperaturunterschied von nur 10 °C (20→30 °C) um für $LipS_{H6}$ einen Aktivitätsfall von 100 % auf 17 % zu bewirken. Bei $LipP_{H6}$ und $LipB_{H6}$ hingegen spielt sich dieser Abfall in einem weniger steilen Verlauf im Bereich von 20 °C bis 45 °C ab. Die Halbwertszeit für beide Enzyme lag bei 30 °C noch bei einer Stunde, wohingegen diese für $LipS_{H6}$ bereits nach 20 Min erreicht war. Diese Ergebnisse veranschaulichen den eindeutigen psychrophilen und thermolabilen Charakter von $LipS_{H6}$. Hier findet sich auch die Erklärung für das Expressionsverhalten von $LipS_{H6}$: Das rekombinante Enzyme konnte bei 37 °C Expressionstemperatur nicht aktiv exprimiert werden, was nun durch seine thermolabilen Eigenschaften bei diesen Temperaturen erklärt werden kann.

Untersuchungen der Temperaturstabilität von Est2 machten den thermophilen Charakter dieser Esterase deutlich (Manco *et al.*, 1998). So konnten Manco und Mitarbeiter nachweisen, dass Est2 bei 70 °C Inkubationstemperatur nach 14 Stunden keinen Aktivitätsverlust aufwies. Sogar bei Temperaturen von 80 °C konnte noch eine Halbwertszeit von 30 Min detektiert werden.

Sowohl die ermittelten Temperatur-Optima für die Enzymaktivitäten als auch die Stabilitäten demonstrieren das biotechnologische Potential der Esterasen. Die Implementierung der Kälte-adaptierten Enzyme LipP und LipS in biotechnologische Prozesse ermöglicht viele Vorteile. Der Einsatz Kälte-liebender Enzyme in der Industrie kann zu Energieeinsparungen, Kontaminationsverminderungen oder verbesserter schneller Inaktivierung der Enzyme beitragen. So werden beispielsweise psychrophile lipolytische Enzyme in der Waschmittelindustrie eingesetzt, um Energieverbrauch und Verschleiß der Textilien zu mindern (Gerday *et al.*, 2000).

3.3.4 Zusammenfassung: Biochemische Charakterisierung der Est2-Homologen $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$

Bei der biochemischen Charakterisierung von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ wurden die Substrat-Spezifität, Temperatur-Optimum und Temperaturstabilität dieser Enzyme untersucht (Tab. 3.4).

Tab.3.4: Biochemische Charakteristika von $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$, $LipS_{H6}$ und Est2

	Substrat-Spezifität Optimum/ Spektrum	Temperatur-Optimum (°C)	Temperatur-Stabilität[2] (°C)
Est2[1]	C6/(C2 - C8)	70	70
LipB	C4/(C2 - C12)	40	10-15
LipP	C6/(C2 - C8)	35	10-20
LipS	C4/(C2 - C6)	30	5-20

[1]Daten zu Est2 wurden von Manco *et al.* (1998) bezogen. [2] Dargestellt sind die Temperatur-Stabilitäten der Bereiche, bei denen das Enzym nach 3 h Inkubation noch 90-100 % Aktivität aufwies.

Anhand der Substrat-Spezifität konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Enzymen $LipB_{H6}$, $LipP_{H6}$ und $LipS_{H6}$ eindeutig um Esterasen handelte (Abb. 3.10). Das ermittelte Temperatur-Optimum bezüglich der Esteraseaktivität des Enzyms $LipB_{H6}$ liegt bei 40 °C, die des Enzyms $LipP_{H6}$ bei 35 °C und $LipS_{H6}$ bei 30 °C. (Abb. 3.11). Dies verdeutlicht, dass das Temperatur-Optimum mit zunehmender Wachstumstemperatur der jeweiligen Wirtsorganismen, ansteigt. Hierbei zeigte $LipS_{H6}$ vergleichend zu $LipP_{H6}$ und $LipB_{H6}$ die größten k_{cat}-Werte, was durch dessen psychrophile Natur zu erklären ist. Die Temperaturstabilität der drei Esterasen wurde durch Inkubation bei Temperaturen von 5 bis 75 °C ermittelt. Es zeigte sich, dass $LipP_{H6}$ und $LipB_{H6}$ ein insgesamt thermostabileres Verhalten als $LipS_{H6}$ aufwiesen (Abb.3.12).

Die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung zeigten, dass sich trotz ihrer Struktur- und Sequenzähnlichkeit die Enzyme in ihren physikochemischen Charakteristika unterscheiden, was als evolutionäre Anpassung der Enzyme an die Lebensumstände der Organismen gedeutet werden kann. Dies ist eine gute Voraussetzung zur Analyse der molekularen Gründe dieser Unterschiede.

Diese Arbeit stellt den ersten Vergleich der enzymatischen biochemischen Charakteristika von homologen Esterasen aus vier verschiedenen Temperaturbereichen dar. Eine weitere Neuerung stellt die Isolierung und Charakterisierung von LipB und LipS dar, da aus beiden Wirtsorganismen zuvor noch kein Enzym beschrieben wurde. Ein besonderer Erfolg stellt

hier die Gewinnung von LipS dar, da die Anzahl der beschriebenen Kälte-adaptierten Esterasen minimal ist (Tutino *et al.*, 2009). Dies und die interessanten biochemischen Eigenschaften machen diese Enzyme zu interessanten Objekten für die Biotechnologie.

Die Isolation und Charakterisierung dieser Esterasen soll zur Analyse der Temperatur-Adaption beitragen, so dass auch molekulare Gründe für das Temperaturverhalten in denfolgenden Kapiteln erörtern werden sollen.

3.4 In silico Analyse thermisch relevanter Molekül-Eigenschaften von Est2, LipB, LipP und LipS

Extreme Temperaturen führen üblicherweise zur Denaturierung von Proteinen. Die Fähigkeit von Enzymen bei eben solchen Bedingungen Aktivität aufzuweisen, lässt schlussfolgern, dass diese über spezielle molekulare Mechanismen verfügen, welche ihre katalytische Funktion in extremer Umgebung bewahren. Diese Mechanismen der Temperatur-Adaption sind bei weitem noch nicht verstanden, bestimmte Prinzipien und Tendenzen konnten jedoch mittels Vergleich homologer Enzyme aus Organismen verschiedener Temperaturklassifikationen erörtert werden. Diese Studien decken meist nicht den gesamten Temperaturbereich ab und sind durch die Auswahl von nur einzelnen Enzymklassen begrenzt (Bae & Phillips, 2004; Georlette *et al.*, 2003). Dies führt dazu, dass sich diese Tendenzen und Prinzipien nicht für jedes Extremozym generalisieren lassen.

Die Isolierung und biochemische Charakterisierung von LipB, LipP und LipS zeigte interessante Aspekte ihrer Stabilität und Aktivität gegenüber unterschiedlichen Temperaturen. Zusammen mit der thermophilen Esterase Est2 ist dieses Set homologer Enzyme ideal geeignet für einen komparativen Ansatz, um das Temperaturverhalten der Enzyme auf molekularer Ebene zu analysieren. In Kapitel 1.2.2 wurden die zahlreichen möglichen Mechanismen der Adaption erläutert, so dass im Folgenden nur die zutreffenden und unterschiedlichen molekularen Gründe der Adaptionen erläutert werden.

3.4.1 Komparative Analyse der Zusammensetzung und Interaktionen der Aminosäuren von Est2, LipB, LipP und LipS

Psychrophile Enzyme weisen hohe Aktivitäten bei niedrigen Temperaturen auf, zugleich besitzen sie jedoch geringe oder keine Stabilität bei moderaten oder höheren Temperaturen (Georlette *et al.*, 2004; Gerday *et al.*, 2000). Dies war auch für LipS und LipP zu beobachten.

Diese Eigenschaften gehen mit der Stabilitäts-Flexibilitäts-Beziehungen Kälte-adaptierter Enzyme einher. Dabei wird die Struktur durch molekulare Veränderungen flexibler, wodurch sich die Aktivierungsenergie senkt (D'Amico *et al.*, 2003; Feller & Gerday, 2003). Mögliche Erklärungen für die Gewährleistung von erhöhter Flexibilität können in der Variation der Aminosäure-Zusammensetzung und Verminderung von Interaktionen innerhalb des Enzyms liegen (Sælensminde *et al.*, 2009). Tabelle 3.5 zeigt die Aminosäur-Zusammensetzung der hier betrachteten Enzyme im Vergleich.

Tab.3.5: Aminosäuren-Zusammensetzung von Est2, LipB, LipP und LipS.

Aminosäure	Est2		LipB		LipP		LipS	
Ala (A)	37	11.9 %	56	17.1 %	46	14.9 %	31	9.%
Arg (R)	16	5.2 %	25	7.6 %	20	6.5 %	14	4.%
Asn (N)	6	1.9 %	3	0.9 %	8	2.6 %	9	2.%
Asp (D)	21	6.8 %	25	7.6 %	22	7.1 %	23	7.%
Cys (C)	1	0.3 %	3	0.9 %	7	2.3 %	4	1.%
Gln (Q)	12	3.9 %	8	2.4 %	18	5.8 %	15	4.8 %
Glu (E)	20	6.5 %	15	4.6 %	18	5.8 %	17	5.4 %
Gly (G)	21	6.8 %	25	7.6 %	20	6.5 %	21	6.7 %
His (H)	8	2.6 %	12	3.7 %	6	1.9 %	9	2.9 %
Ile (I)	10	3.2 %	9	2.8 %	7	2.3 %	19	6.1 %
Leu (L)	35	11.3 %	32	9.8 %	39	12.7 %	34	10.9 %
Lys (K)	12	3.9 %	7	2.1 %	2	0.6 %	12	3.8 %
Met (M)	6	1.9 %	7	2.1 %	7	2.3 %	6	1.9 %
Phe (F)	12	3.9 %	15	4.6 %	15	4.9 %	10	3.2 %
Pro (P)	**28**	**9.0 %**	**21**	**6.4 %**	**19**	**6.2 %**	**20**	**6.4 %**
Ser (S)	14	4.5 %	13	4.0 %	14	4.5 %	17	5.4 %
Thr (T)	8	2.6 %	14	4.3 %	10	3.2 %	14	4.5 %
Trp (W)	4	1.3 %	4	1.2 %	3	1.0 %	4	1.3 %
Tyr (Y)	16	5.2 %	12	3.7 %	10	3.2 %	17	5.4 %
Val (V)	23	7.4 %	21	6.4 %	17	5.5 %	16	5.1 %

Die Zusammensetzung der Aminosäuren wurde anhand der entsprechenden Sequenzen nach UniprotKB berechnet. Angegeben sind die absolute Anzahl der im Protein vorkommenden Aminosäure und deren prozentualer Anteil. Die Rigidität- vermittelnde Aminosäure Prolin ist fett hervorgehoben.

Beim Vergleich der Verteilung der Aminosäuren fällt der höhere Gehalt an Prolin im thermophilen Enzym Est2 auf. Prolin beeinflusst wegen der vorhandenen Ringstruktur, wodurch diese Aminosäure in ihrer Konformation stärker eingeschränkt ist als andere Aminosäuren, die Proteinarchitektur stark. Dadurch kommt es zur Reduktion der Entropie der Hauptkette und somit auch der Flexibilität des Proteins (Deber & Brodsky, 2001). Diese zusätzliche Rigidität trägt effektiv zur Stabilisierung des Proteins bei, wenn sie in Loop-Regionen lokalisiert ist, welche durch ihre Lokalisation an der Oberfläche des Proteins charakterisiert sind. Weiterhin trägt Prolin einen eher hydrophoben Aminosäurerest, wodurch es zu Wechselwirkungen mit anderen hydrophoben Resten befähigt ist. In einem umfangreichen Vergleich von Aminosäuresequenzen und Strukturen von Enzymen

unterschiedlicher Temperaturherkunft konnte beobachtet werden, dass in thermophilen Enzymen vermehrt Interaktionen zwischen Prolin und hydrophoben Resten, sowohl im Proteininneren als auch an der Oberfläche ausgebildet werden (Sælensminde *et al.*, 2009).

Die Betrachtung der Anzahl der hydrophoben Wechselwirkungen in LipS und Est2 (Tab. 3.6) verdeutlicht eben diese Tendenz, da LipS 16 hydrophobe Interaktionen weniger als Est2 aufweist. Diese Art der Wechselwirkung ist von zentraler Bedeutung im Faltungsprozess und für die thermodynamische Stabilität von Proteinen (Dill, 1990; Pace *et al.*, 2011; Schellman, 1997).

Tab.3.6: **Anzahl der Wechselwirkungen innerhalb von Est2, LipB, LipP und LipS**

Interaktion	Est2	LipB	LipP	LipS
hydrophobe	196	183	194	180
ionische	23	21	13	12
aromatische	18	15	17	16
H-Brücken	587	563	560	541
Summe	824	782	784	749

Die Wechselwirkungen wurden mit dem *Protein Interactions Calculator* (PIC) ermittelt (Tina *et al.*, 2007).

Tabelle 3.6 verdeutlicht außerdem die erhöhte Anzahl von aromatischen und ionischen Interaktionen im thermophilen Enzym Est2. Dies spiegelt sich in Teilen einer erhöhten Anzahl aromatischer und geladener Aminosäuren wider. So sind hier mehr Glutamat- und Lysin-Reste vorhanden als in LipB, LipP und LipS. Phenylalanin- und Tyrosin-Reste dagegen sind teils häufiger und teils weniger häufig vertreten.

Die Flexibilität und Rigidität der Konformation von an Kälte bzw. Wärme angepassten Enzymen werden unter anderem durch die Schwäche bzw. Stärke der vorhandenen Interaktionen bestimmt. So besitzt Est2 im Vergleich zu LipB, LipP und LipS mit insgesamt 824 die meisten Wechselwirkungen innerhalb seiner Struktur. Umgekehrt kann die Reduzierung der Interaktionen innerhalb eines Enzyms zur Verminderung der kompakten Beschaffenheit des Proteininneren führen und die Flexibilität des Enzyms steigern (Gerday *et al.*, 1997; Goldstein, 2007).

Disulfidbrücken sind im Bezug auf die Thermostabilität ebenfalls von entscheidender Bedeutung (Liebeton *et al.*, 2001; Siddiqui *et al.*, 2005; Urban *et al.*, 2001), mögliche Erklärungen diesbezüglich kommen hier jedoch nicht in Betracht. Obwohl mehr Cysteine in der Sequenz der mesophilen und Kälte-adaptierten Esterasen vorhanden sind, konnten in bioinformatischen Analysen in keinem der untersuchten Enzyme Disulfidbrücken nachgewiesen werden.

3.4.2 Identifizierung thermisch relevanter Sekundärstrukturelemente

Durch die Betrachtung der Komposition und Wechselwirkungen der Aminosäuren der Esterasen konnten interessante Unterschiede festgestellt werden. Eine genauere Betrachtung der Lokalisation dieser Differenzen innerhalb der Tertiärstruktur kann weiteren Aufschluss über die Bedeutung dieser in der Thermostabilität bringen. Während die Aminosäuresequenz die Abfolge der, durch Peptidbindungen verknüpften, Aminosäuren darstellt, sind Sekundärstrukturelemente Strukturen, die sich durch Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren und Peptidbindungen bilden. Diese bestehen aus α-Helices, β-Strängen und Schleifen, den so genannten Loops, die α-Helices und β-Faltblätter eines Proteins verbinden und vermehrt an Oberflächen positioniert sind (Choi *et al.*, 2013). Da sich die Oberflächen-nahen Bereiche extremophiler Enzyme von ihren mesophilen Homologen unterscheiden können (Vieille & Zeikus, 2001), werden im Folgenden insbesondere die Sekundärstrukturelemente der Proteinoberfläche hier näher betrachtet.

Beim Vergleich der Sekundärstrukturelemente (Abb. 3.13) wird deutlich, dass die geringste Konservierung der Aminosäuresequenz in zwei Loop-Bereichen zu erkennen ist (Loop 2 und Loop 12). Zudem verdeutlicht der Vergleich der Sekundärstrukturen, dass die Supersekundärstruktur des α/β Hydrolase Faltungsmotivs, welche aus einer definierte Kombination von α-Helix und β-Faltblatt besteht, ein besonders konserviertes Faltungselement zu sein scheinen.

Die Andersartigkeiten von Loop 2 und Loop 12 werden bei Überlagerung der 3D-Struktur von Est2 und den drei Homologiemodellen besonders deutlich (Abb. 3.14). Diese Loops zeigen eine auffallende Diversität in der Länge, Sequenz und Konfiguration. Loop 2 von LipS setzt sich aus 19 Aminosäuren zusammen, wohingegen der Loop 2 von Est2 nur aus 14 Aminosäuren besteht. Auch der Loop 2 von LipB besteht aus 18 Aminosäuren. Loop2 von LipP hingegen besteht aus zwei Aminosäuren weniger als der homologe Loop von Est2. Dieser Loop ist in der *Cap*-Region der Enzyme lokalisiert. Da diese Region in Korrelation mit der Thermostabilität gesetzt wird (Mandrich *et al.*, 2005), könnte hier ein struktureller Unterschied gefunden worden sein, welcher in die Temperatur-Adaption der Enzyme involviert ist. Loop 12 der vier Esterasen weist ebenfalls unterschiedliche Längen auf. Während dieser Loop von Est2 aus 25 und von LipP sowie von LipS aus 24 Aminosäuren gebildet wird, lässt Loop 12 von LipB eine Insertion von vier Aminosäuren erkennen (28 Aminosäuren).

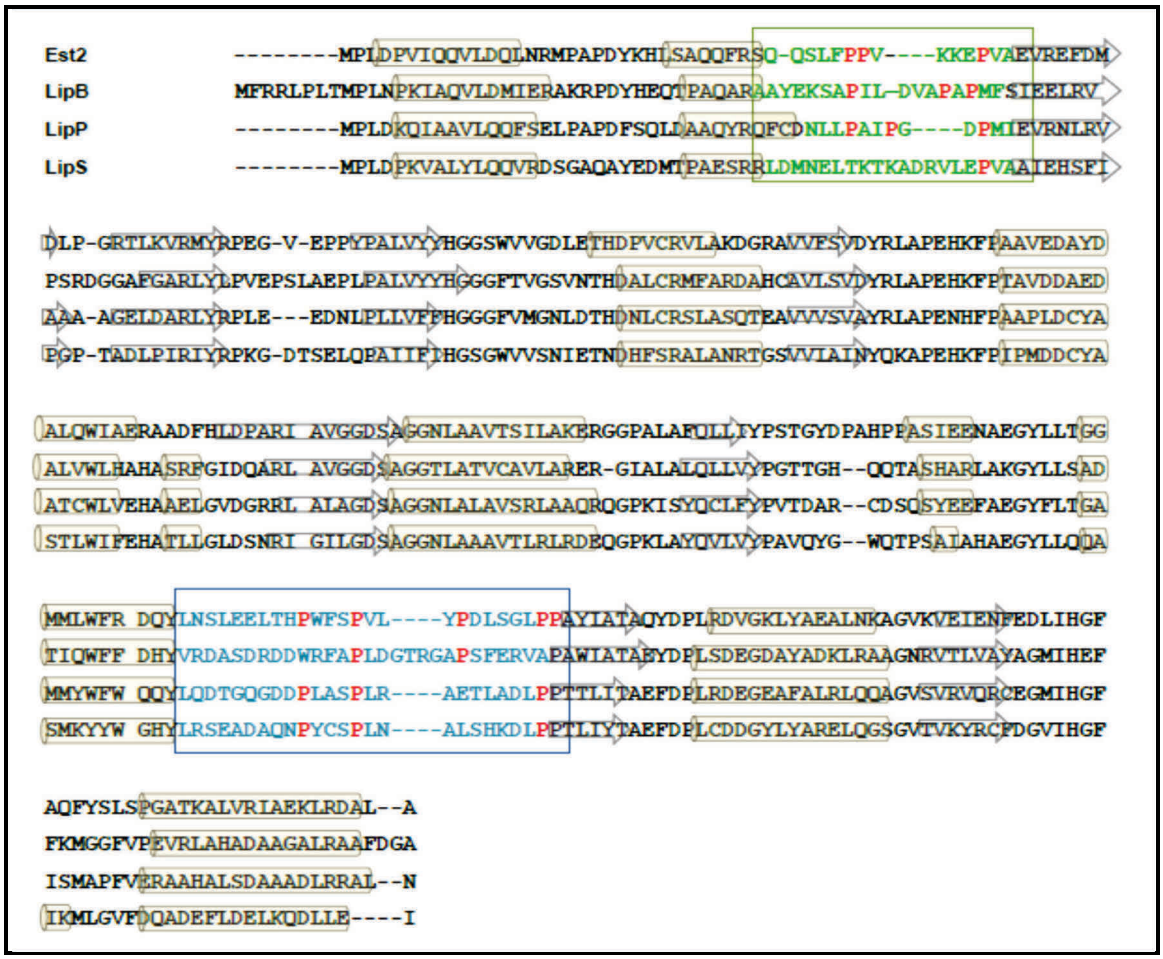

Abb.3.13: Vergleich der Sekundärstrukturelemente von Est2 und dessen Homologen LipB, LipP und LipS. Der Vergleich wurde auf Basis der 3D-Strukturen der Homologiemodelle von LipB, LipP und LipS und der Kristallstruktur von Est2 erstellt. Die grün markierten Aminosäuren stellen Loop 2 dar. Die hellblau markierten Aminosäuren spiegeln die Loop 12 Struktur wider. Die Aminosäure Prolin ist in Loop 2 und Loop 12 rot markiert. Die Sekundärstrukturelemente α-Helices werden zylindrisch und β-Stränge als Pfeile dargestellt. Positionen von Loop 2: Est2 (Gln33-Ala46), LipB (Ala41-Ser59), LipP (Asn36-Ile47), LipS (Leu33-Ala51) und Loop 12: Est2 (Leu219-Pro243), LipB (Val230-Ala257), LipP (Leu217-Pro240), LipS (Leu223-Pro246).

Wie die Oberfläche eines Proteins in die Stabilität und Faltung eines Proteins involviert sind, wurde eingehend studiert (Collinet *et al.*, 2001; Pal & Dasgupta, 2003; Urfer & Kirschner, 1992). Der Vergleich kompletter Genome von Organismen unterschiedlichen Temperatur-Ursprungs zeigte, dass thermophile Proteine eine Verkürzung ihrer Aminosäuresequenzen aufwiesen (Thompson & Eisenberg, 1999). Diese Deletionen zeigten sich vermehrt an den Oberflächen der Proteine, so dass sie wahrscheinlich ein Indiz für verstärkte Thermostabilität sind.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Sekundärstrukturen fällt weiterhin die Verteilung des Prolin auf. Die meisten Proline befinden sich in den Loops, während sie in den α-Helices und β-Strängen nur selten zu finden sind. Dies ist mit der Struktur dieser Aminosäure zu begründen. Im Unterschied zu den anderen Aminosäuren ist die Seitenkette mit dem α-Kohlenstoffatom und dem Stickstoffatom verbunden, wodurch eine beschränkte Ringstruktur

entsteht. Diese Eigenschaften beeinflussen die Protein-Architektur und machen Prolin zu einer Aminosäure, welche die Rigidität eines Proteins steigern kann. Häufig ist Prolin in Loops zu finden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Aminosäure eine freie Amidgruppe fehlt und sie deshalb nicht die für eine α-Helix und ein β-Faltblatt nötigen Wasserstoff-Brücken ausbilden kann. Hier kommt Prolin entsprechend selten vor (Prajapati *et al.*, 2007).

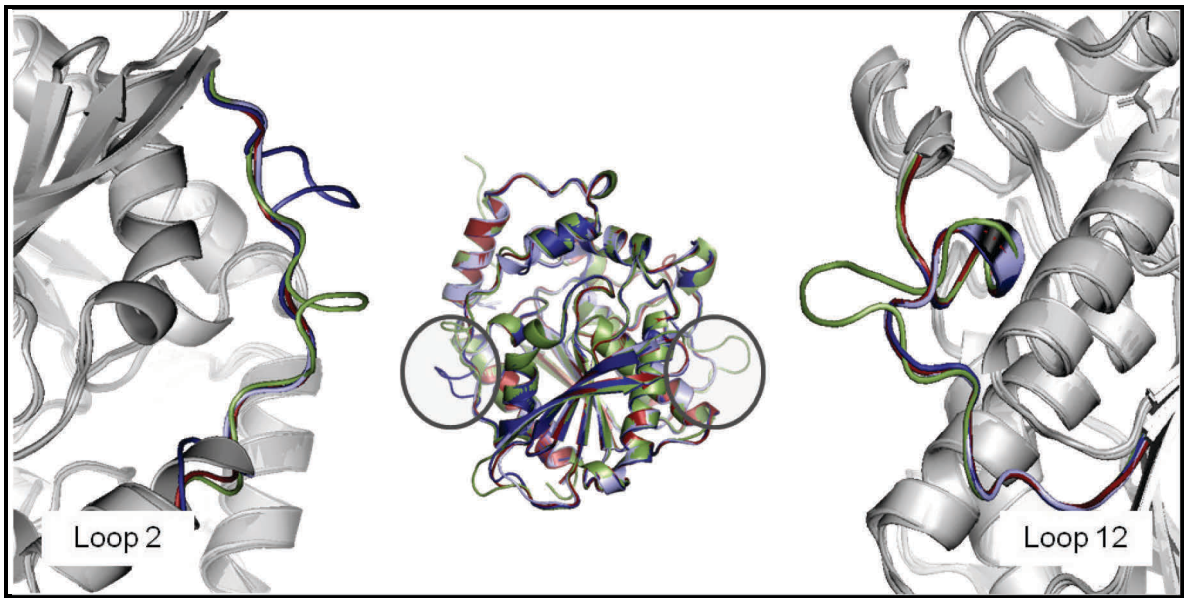

Abb.3.14: Detaildarstellungen der Überlagerungen von Loop 2 und Loop 12 von Est2 und dessen Homologen LipB, LipP und LipS. Die einzelnen Strukturen sind zur Unterscheidung in verschiedenen Farben dargestellt: hellblau: LipS, dunkelblau: LipP; grün: LipB und Est2 in rot.

So scheint es nur plausibel, dass in Loop 2 und 12 von Est2 vergleichend zu dessen Homologen mehr Prolin vorhanden ist. Die Insertion von bis zu zwei Prolinen in Loop 2 und bis zu drei Prolinen in Loop 12 kann so die Flexibilität dieser Loop-Strukturen verringern. Dies wiederum lässt diese Loops weniger anfällig für die Entfaltung sein, da Loops häufig eine so genannte kritische Region beim Entfaltungsprozess darstellen können (Eijsink *et al.*, 1995; Gåseidnes *et al.*, 2003).

Ein Beispiel bildet hier die an Kälte-adaptierte Lipase von *Pseudomonas fragi*, bei welcher ebenfalls vergleichend zu mesophilen Enzymen weniger Prolin in den Loop-Strukturen an der Oberfläche des Enzyms vorkommt (Alquati *et al.*, 2002). Bei einer anderen Kälte-adaptierten Esterase von *Psychrobacter sp.* Ant 300 führte die gezielte Substitution von Glycin zu Prolin zu einer erhöhten Thermostabilität (Kulakova *et al.*, 2004).

3.4.3 Untersuchung der Flexibilität von Est2, LipB, LipP und LipS durch molekular-dynamische Simulationen

Die vergleichende Analyse der Sekundärstrukturelemente verdeutlichte markante Unterschiede in der Länge, Komposition und Konformation zweier Loop-Strukturen. In den letzten Jahren wurde der Erforschung der Bedeutung von flexiblen Loop-Strukturen in der Thermostabilität viel Aufmerksamkeit gewidmet (Jang *et al.*, 2002; Khemakhem *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2011; Vieille & Zeikus, 1996). Diese Studien zeigten, dass thermophile Enzyme sich durch eine geringe Flexibilität auszeichnen (Joseph *et al.*, 2008; Sterner & Liebl, 2001).

Neben der Sequenz und Struktur trägt die Dynamik von Proteinen zu ihrer Funktion bei (Bahar *et al.*, 2010). Die generellen Bewegungscharakteristika von Proteinen sind durch ihre strukturellen Eigenschaften charakterisiert. Das Vorhandensein der beweglichen Freiheit impliziert die Tatsache, dass ein natives Enzym eine Reihe von Konformationen einnehmen kann. Diese Fluktuationen können eine signifikante Bedeutung in der Funktion eines Enzyms einnehmen (Karplus & McCammon, 2002). Dabei können bestimmte Regionen flexibler sein, als andere. Grundsätzlich kann dabei beobachtet werden, dass die Magnitude der Fluktuationen vom Proteininneren in Richtung der Oberfläche des Proteins ansteigt (Kocher *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 2003). Mit Hilfe der Methode der molekulardynamischen Simulationen können diese Dynamiken untersucht werden (Karplus & Kuriyan, 2005).

Bei der Erörterung der Differenzen der vier homologen Esterasen in Bezug auf deren Primär- und Sekundärstruktur wurde eine Korrelation der jeweiligen Protein-Struktur und der darin begründeten Flexibilität der jeweiligen Temperatur-Klassifizierung der Enzyme in Betracht gezogen. Durch molekular-dynamische Simulationen (2.14) sollte die Flexibilität und Dynamik, insbesondere der differenten Loop-Strukturen, untersucht werden.

Für die Simulationen wurden die dreidimensionale Struktur von Est2 und die in 3.1.3.1 beschriebenen Homologiemodelle von LipB, LipP und LipS genutzt. Es wurden Simulationen bei verschiedenen Temperaturen betrachtet. Hierbei wurden für jedes Enzym mindestens die Temperaturen von 30 und 50 °C und das jeweilige Temperaturoptimum (Est2: 70 °C, LipB: 40 °C, LipP: 35 °C und LipS: 30 °C) gewählt. Die Dauer der Simulationen betrug 100 ns. Die Amplitude der hier gemessen Fluktuationen können durch Kalkulationen des *root-mean-square-deviation* (RMSD) beschrieben werden. Der RMSD-Wert sagt aus, wie weit sich die Position von Cα-Atomen während der Simulation geändert hat (Kabsch, 1976, 1978).

Der Verlauf der Bewegungen der Cα-Atome des Proteinrückgrats beschreibt die Veränderung innerhalb des Proteins während einer Simulation und gibt so Aufschluss über den Punkt, an dem das Protein äquilibriert ist. Der Punkt der Äquilibrierung entspricht dem

Zustand, bei dem das Simulationssytem zu einem nativen Gleichgewicht bei der vorgegebenen Temperatur gekommen ist (Walton & Vanvliet, 2006).

Die RMSD-Werte als Funktion der Zeit sind in Abbildung 3.15 für alle vier Enzyme exemplarisch für die Simulation bei 30 °C dargestellt. Daraus erschließt sich, dass die Proteine während der Simulation ihre Referenzstruktur erreichen, da der RMSD-Wert einem Grenzwert zustrebt. Die thermischen Fluktuationen relaxieren sich innerhalb der Simulationszeit, so dass die Bedingungen zum Startpunkt keine Wirksamkeit mehr haben. Der erreichte RMSD-Wert von ungefähr 2,6 Å (0,26 nm) für Est2 entspricht der Auflösung der Kristallstruktur von Est2, die bei 2,6 Å liegt (Carugo, 2003). Auch bei den Simulationen mit anderen Temperaturen wurden die Referenzstrukturen erreicht (Ergebnisse nicht dargestellt).

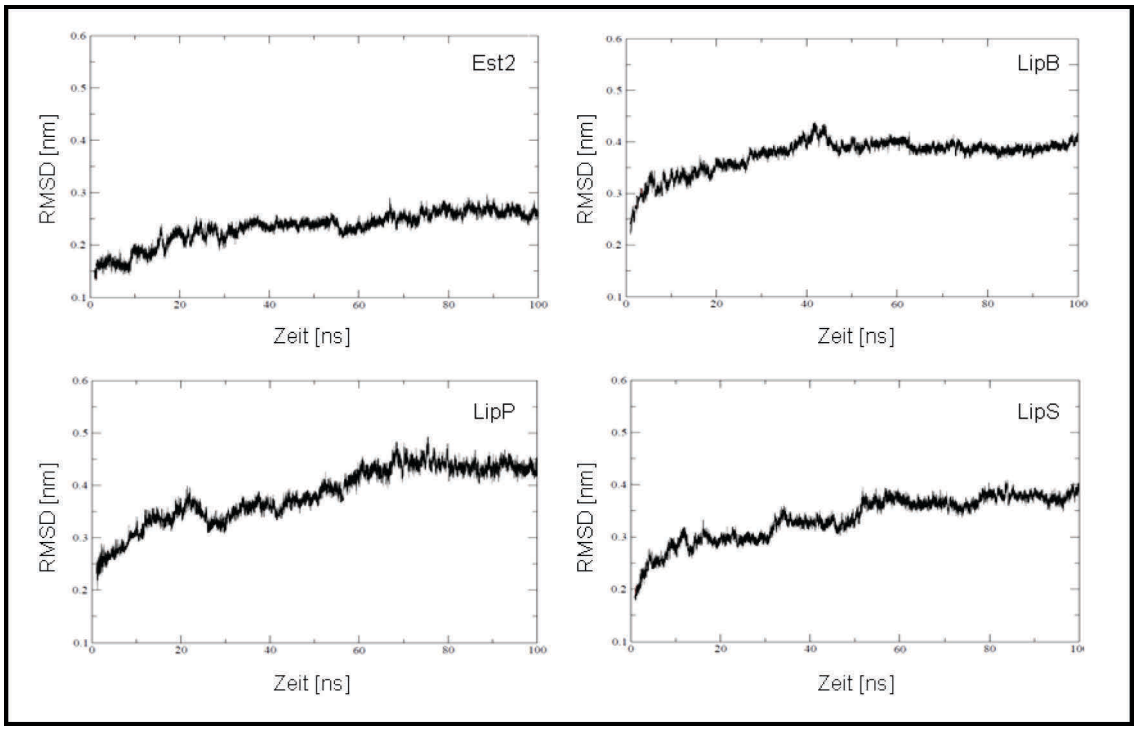

Abb.3.15: RMSD-Werte der Cα-Atome als Funktion der Zeit für MD Simulation von Est2, LipB, LipP und LipS bei 30 °C

Abbildung 3.16 hingegen zeigt den durchschnittlichen RMSD-Wert der Cα-Atome für jede einzelne Aminosäure der Polypeptidkette der Enzyme bei Simulationen verschiedener Temperaturen. Wie im Verlauf dieser mittleren Abweichungen zu erkennen ist, gibt es innerhalb der Proteine Bereiche die stärkere Abweichungen zeigen. Diese größten Veränderungen spielen sich in den Loop-Regionen ab. Insbesondere die Loop-Regionen der N-Termini und der Bereich zwischen β6 und β7 zeigen größere Veränderungen im Verlauf der Simulation. Die Lösungsmittel-exponierten Loopregion befinden sich an der Oberfläche

der Enzyme und können in ihrer Position relativ variabel sein. Insbesondere der Loop 2, welcher im N-Terminus lokalisiert ist, und der Loop 12, welcher in dem stark variablen Bereich zwischen β6 und β7 ist, stechen hervor.

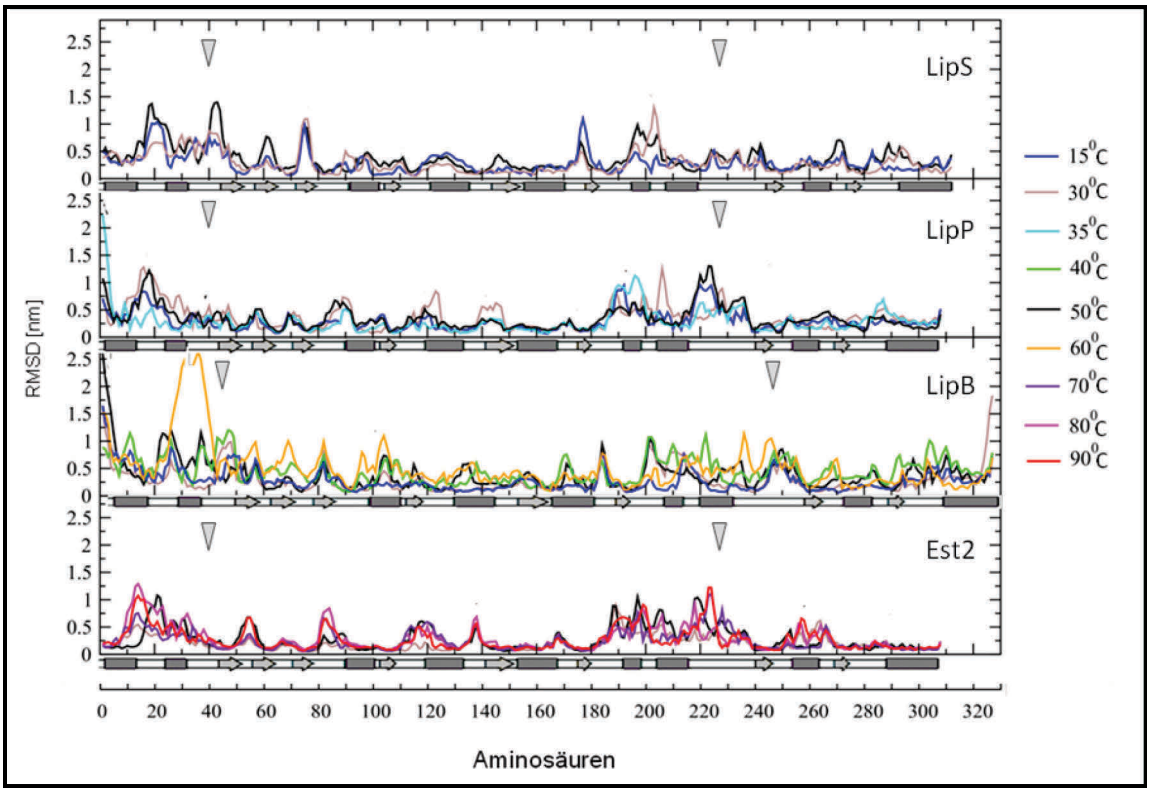

Abb.3.16: RMSD-Werte der Cα-Atome aller Aminosäuren nach MD Simulation von Est2, LipB, LipP und LipS bei verschiedenen Temperaturen. Die Lokalisation von Loop 2 und Loop 12 ist durch graue Dreiecke verdeutlicht. Die Sekundärstrukturelemente α-Helices werden zylindrisch und β-Stränge als Pfeile dargestellt.

Ausdruck für diese Flexibilität der Loopregion ist die berechnete RMSD-Differenz für diese Regionen, welche im Detail in Tabelle 3.7 dargestellt sind. Beim Vergleich der RMSD-Werte bei den Temperaturoptima der Enzyme werden die tendenziell geringeren Werte für Est2 sichtbar. Der RMSD-Wert des Loop 2 von Est2 beträgt 0,23 nm (70 °C), wohingegen die äquivalenten Loops von LipB (0,69 nm bei 40 °C), LipP (0,29 nm bei 35 °C) und LipS (0,58 nm bei 30 °C) verstärkte Abweichungen aufweisen. Die RMSD-Werte des Oberflächenloops 12 zeigen gleiche Tendenzen (Est2 = 0,41 nm; LipB = 0,51 nm und LipP = 0,44nm). Eine Ausnahme bildet hier der RMSD-Wert für LipS (0,28 nm). Für die anschließenden Fragmente, die Sekundärstrukturen enthalten, verringert sich dieser Wert.

Diese Beobachtungen lassen sich gut mit den Längen der Loops korrelieren. Im Bezug auf Loop 2, haben LipB (18 Aminosäuren) und LipS (19 Aminosäuren) die längsten Loop 2 und zugleich die höchsten RMSD-Werte. Loop 12 von LipB, welcher den höchsten RMSD-Wert hat, setzt sich aus 28 Aminosäuren zusammen. Diese Zusammenhänge zeigen die Bedeutung der beiden Oberflächenloops in der Temperatur–Adaption auf. Ein größerer

RMSD-Wert bedeutet mehr Bewegung des Loops. Die längeren Loops sind exponierter und dadurch beweglicher. Diese Annahme verstärkt sich durch den erhöhten Prolin-Gehalt in den Loops des thermophilen Enzyms.

Tab.3.7: Vergleich der RMSD-Werte der Loop-Strukturen 2 und 12 der Proteine Est2, LipB, LipP und LipS

Loop2				Temperatur	Loop12			
Est2	LipB	LipP	LipS		Est2	LipB	LipP	LipS
-	0,47	0,27	0,49	**15 °C**	-	0,3	0,52	0,28
0,17	0,55	0,41	**0,58**	**30 °C**	0,22	0,3	0,44	**0,32**
-	-	**0,29**	-	**35 °C**	-	-	**0,44**	-
-	**0,69**	-	-	**40 °C**	-	**0,51**	-	-
0,24	0,44	0,34	0,71	**50 °C**	0,35	0,42	0,37	0,39
-	0,66	-	-	**60 °C**	-	0,68	-	-
0,23	-	-	-	**70 °C**	**0,41**	-	-	-
0,31	-	-	-	**80 °C**	0,25	-	-	-
0,25	-	-	-	**90 °C**	0,28	-	-	-

Die RMSD-Werte bei den entsprechenden Temperaturoptima der Enzyme sind fett dargestellt.

Eine weitere Darstellung der MD-Simulationen ist der RMSF-Wert (*root-mean-square-fluctuation)*. Dieser gibt über die Simulationszeit gemittelten Abweichungen von der Referenzstruktur für jedes Cα-Atom an. Hiermit lässt sich die Flexibilität der Enzyme beschreiben.

Die in Abbildung 3.17 dargestellten RMSF-Werte der einzelnen Aminosäuren in der jeweiligen Polypeptidkette ergeben dasselbe Bild, welches durch Betrachtung der RMSD-Werte gewonnen werden konnte. Die Bereiche mit erhöhter Flexibilität werden durch diese Darstellung verstärkt verdeutlicht. Interessanterweise entsprechen diese Bereiche der *Cap*-Region der Enzyme. Der zur *Cap*-Region zählende N-Terminus von Est2 wurde durch Mutationsstudien analysiert. Die Deletion der ersten 35 Aminosäuren führte zur Reduzierung der Thermostabilität und des Temperaturoptimums von Est2 (Foglia *et al.*, 2007; Mandrich *et al.*, 2005). Zusammen mit diesen Studien verdeutlicht die unterschiedliche Flexibilität, der hier untersuchten Enzyme an dieser Region die Bedeutung der *Cap*-Region in der Temperatur-Adaption der HSL-Enzyme. Hinzu kommt, dass Loop 2 in diesem Bereich lokalisiert ist.

Der Vergleich der RMSF-Werte der verschieden Simulationen lässt das Phänomen der Denaturierung insbesondere an diesen Bereichen erkennen. In Simulationen bei

Temperaturen, bei denen die Enzyme in experimentellen Versuchen keine Stabilität aufwiesen, erhöhten sich die RMSF-Werte stark. So ist dies bei LipS und LipP ab 50 °C, bei LipB ab 60 °C und bei der thermostabilen Esterase Est2 ab 80 °C zu erkennen.

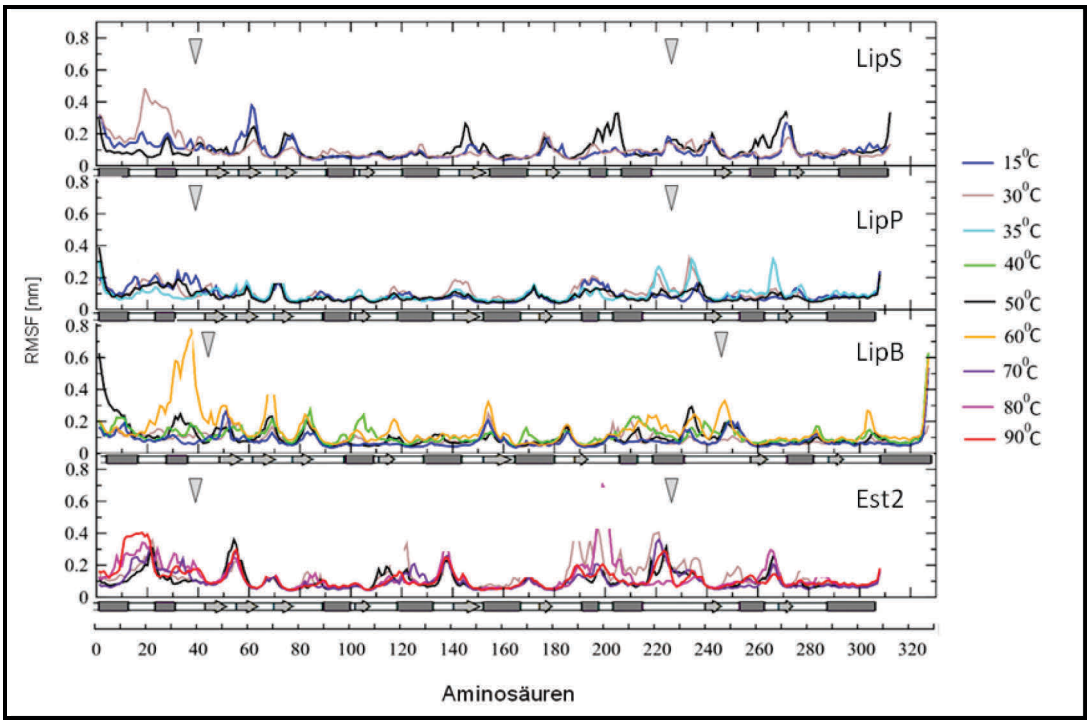

Abb.3.17: RMSF-Werte der Cα-Atome aller Aminosäuren der MD Simulationen von Est2, LipB, LipP und LipS bei verschiedenen Temperaturen. Die Lokalisation von Loop 2 und Loop 12 ist durch graue Dreiecke verdeutlicht. Die Sekundärstrukturelemente α-Helices werden zylindrisch und β-Stränge als Pfeile dargestellt.

.

Diese Daten gehen einher mit der ermittelten Temperaturstabilität der Enzyme, die mit dem jeweilgen Temperatur-Ursprung der Enzyme korreliert. Auch wird die Tatsache deutlich, dass Flexibilität einerseits für die Funktion eines Enzyms wichtig ist, anderseits aber wiederum zur Instabilität führen kann. Die flexiblen Loops können so die Punkte innerhalb der Struktur darstellen, an denen die partielle und thermische Entfaltung beginnt.

3.4.4 Zusammenfassung: *In silico* Analyse thermisch relevanter Molekül-Eigenschaften von Est2, LipB, LipP und LipS

Die Untersuchung der molekularen Gründe für die Anpassungen der homologen Enzyme an verschiedene Temperaturen, brachte interessante Aspekte hervor. Die vergleichende Betrachtung der Aminosäuren-Zusammensetzung verdeutlichte den unterschiedlichen Prolin-Gehalt. Ein erhöhter Gehalt dieser Aminosäure in der thermophilen Esterase könnte ein Indiz für deren thermostabile Natur sein. Eine Schwächung der Interaktionen hingegen wurde bei den Kälte-liebenden Enzymen LipP und LipS beobachtet, was den Enzymen eine größere Flexibilität vermittelt. Die Sekundärstrukturanalysen verdeutlichen die stärkste

Konservierung in den α-Helices und β-Strängen, wohingegen die Loops in ihrer Zusammensetzung und Länge differierten. Der zuvor erwähnte erhöhte Prolin-Gehalt in Est2 ist überwiegend in den Oberflächen-Loops dieses Enzyms lokalisiert.

Um die Dynamik, insbesondere im Hinblick auf diese beiden Loops zu charakterisieren und deren Einfluss auf die Flexibilität der Strukturen zu verstehen, wurden MD-Simulationen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die größten Veränderungen während der Simulationen zeigten sich insbesondere in der *Cap*-Region. Die erhöhte Flexibilität dieser Region, zu der auch Loop 2 zählt, lässt die Funktion dieses Strukturbereiches für die thermische Stabilität und Aktivität erahnen. Die Verkürzung der Loops durch Aminosäuren-Deletionen und die verminderte Zahl an Konformationen durch den erhöhten Prolin-Gehalt können für Est2 Rigidität erzeugen, wohingegen das Gegenteil für die Kälte-adaptierten Enzyme zu beobachten ist. Die in Abbildung 3.18 zusammengefassten Ergebnisse der Analyse der molekularen Gründe für die Temperatur-Adaption verdeutlichen explizit die Bedeutsamkeit der Rigidität-Flexibilitäts-Korrelation in der Temperatur angepassten Aktivität und Stabilität.

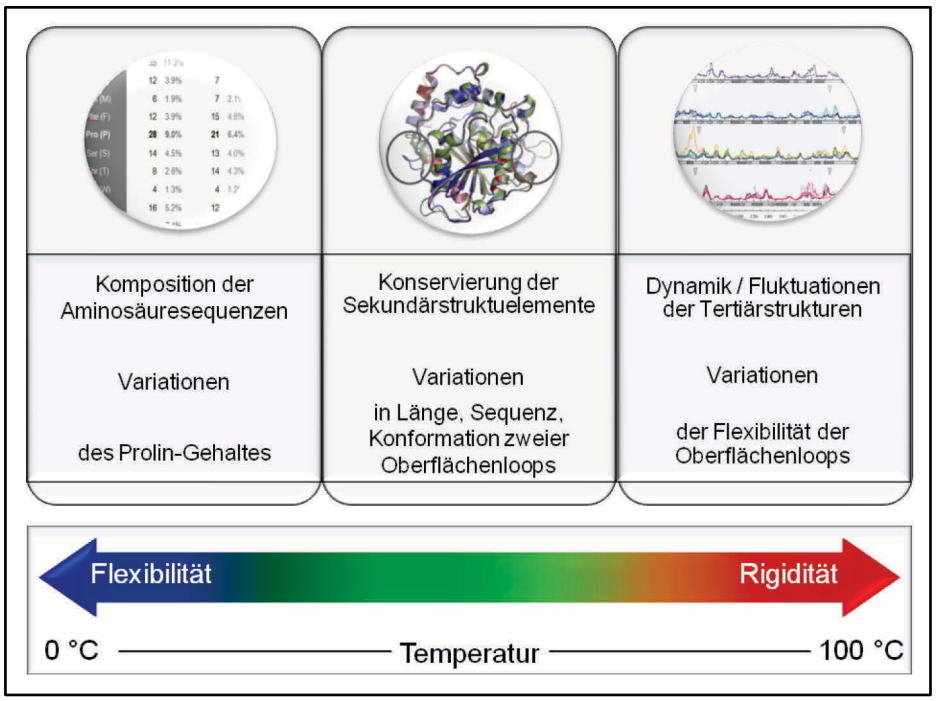

Abb.3.18: Zusammenfassende Darstellung der Untersuchung der molekularen Gründe für die Temperatur-Adaption.

Molekulare Gründe für die Temperatur-Adaption der Esterasen könnten Prolin-reiche/Prolin-arme, flexible/rigide und verlängerte/verkürzte Loops 2 und 12 sein. Bemerkenswert ist, dass es in allen Analysen Bereiche mit hoher Konservierung gab, weshalb diese Bereiche nicht an den Mechanismen der Temperatur-Adaption beteiligt sein können. Durch die intensive Recherche zur Auswahl der vier Enzyme sollte eben dies bewirkt werden, da so die differenten und interessanten Bereiche der Enzyme besser fokussiert werden können.

3.5 Untersuchung der molekularen Mechanismen der Temperatur-Adaption durch rationales Proteindesign

Durch den Vergleich der molekularen Gründe der unterschiedlichen Temperatur Adaptionen der vier Esterasen konnten zwei Loops an der Proteinoberfläche identifiziert werden, welche vermutlich einen direkten Einfluss auf die thermische Aktivität und Stabilität der Enzyme haben. Um diese Eigenschaften und deren Bedeutung in der Temperatur-Adaption zu überprüfen, wurden zielgerichtete Mutationen in diesen Oberflächen-Loops eingeführt und deren Einfluss untersucht.

Homologe Enzyme weisen bei den physiologischen Temperaturen ihrer Wirtsorganismen meistens ähnliche Stabilitäten und Aktivitäten auf, um die Katalyse bei ihren physiologisch relevanten Temperaturen zu ermöglichen (Somero, 1995). Dies bedeutet umgekehrt, dass ein thermophiles Enzym in mesophiler oder sogar psychrophiler Umgebung durch seine mangelnde flexible Konformation abgeschwächte oder keine Aktivität besitzt (Jaenicke, 2000). Im Rahmen der folgenden Mutationsstudien wurde diese Hypothese untersucht. Hierzu wurde geprüft, ob es möglich ist, durch Austausche der Loops 2 und Loops 12 die Temperatur-Stabilitäten oder Aktivitäten von LipS zu steigern und von Est2 zu senken.

Zu diesem Zweck wurde die Methode des *protein engineering* genutzt. Bei dieser Methode werden die Primärsequenzen durch rekombinante DNA-Technologie abgewandelt, wodurch die daraus resultierenden Enzyme veränderte Eigenschaften aufweisen können (Leisola & Turunen, 2007; Woycechowsky *et al.*, 2007). Im Hinblick auf die Thermostabilität wurden bereits zahlreiche Optimierungen von Enzymen aus verschiedenen Klassen erreicht (Eijsink *et al.*, 2005; Nixon & Firestine, 2000; van den Burg & Eijsink, 2002). In den folgenden Kapiteln werden die Erzeugung und Untersuchung der Varianten näher erläutert.

3.5.1 Strategie zur Erzeugung der Est2- und LipS-Loop-Varianten

Die Auswahl der experimentell zu untersuchenden Bereiche fokussierte sich auf die Oberflächenloops 2 und 12. Diese zeigten durch Abweichungen von bis zu vier Aminosäuren Unterschiede in ihrer Größe. Neben dem Größenunterschied wiesen diese auch deutliche Differenzen in ihrer Aminosäure-Zusammensetzung auf.

Um die Funktion dieser beiden Sekundärstrukturelemente in der Temperatur-Adaption zu untersuchen, sollten Austausche dieser Loops zwischen den hier untersuchten Proteinen vorgenommen werden. Hierfür wurden als Basis-Proteingerüst die Enzyme LipS und Est2 gewählt, da sie die gegensätzlichsten Charakteristika aufweisen. So sollten in das Gen von Est2 die Sequenzen des Loop 2 und Loop 12 von LipB und LipS integriert werden. LipS-Varianten wurden durch den Einbau der Loop 2 und Loop 12 Sequenzen von Est2 und LipB erzeugt.

Hierbei wurde auf den Austausch durch die Loops von LipP verzichtet, da dieser die geringsten markanten Unterschiede in der Größe der Loops zeigte. In der Abbildung 3.19 sind die jeweils vier Varianten von Est2 und LipS aufgeführt.

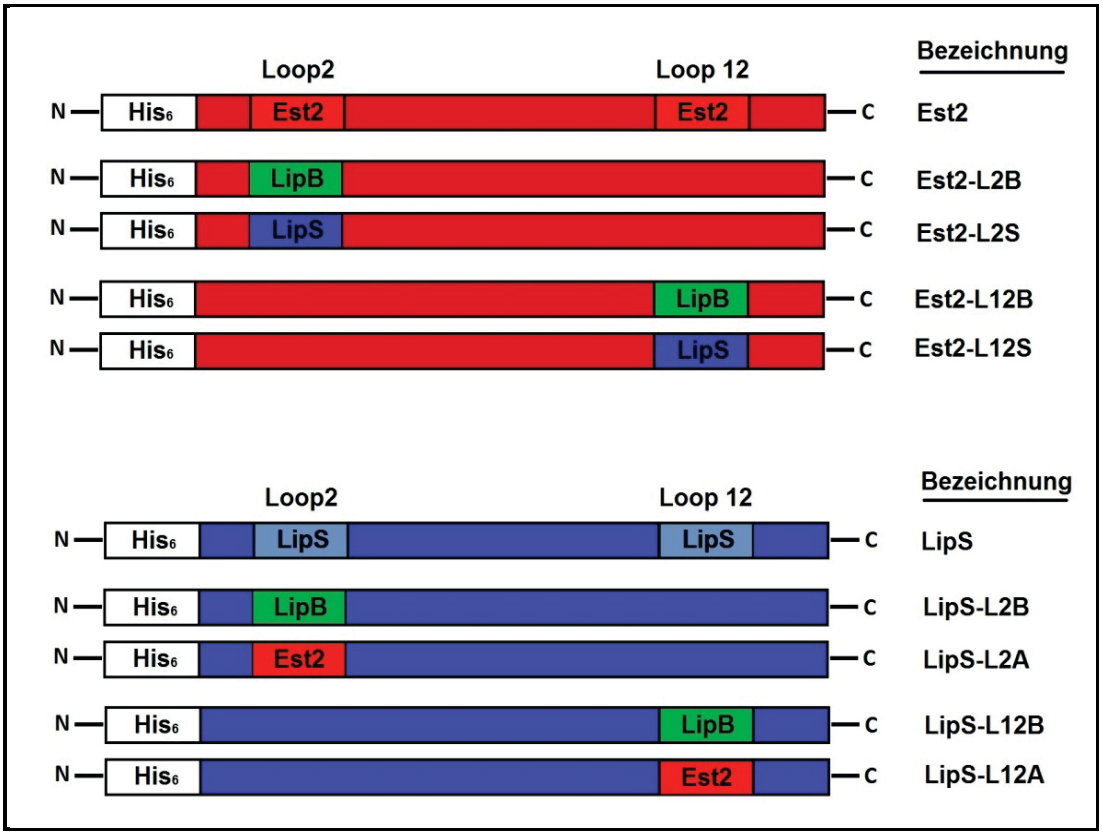

Abb.3. 19: Schematische Darstellung von Est2- und LipS-Loop-Varianten. Dargestellt sind die Konstrukte der jeweiligen Varianten. Der N-Terminus wird als „N“, der C-Terminus als „C“ beschrieben. Der Affinitätsanhang ist als „His_6“ angegeben. In den Schemata ist der jeweilige Ursprung der Loop-Regionen angeben.

Die Bezeichnung der Mutanten erklärt, welcher Loop in das korrespondierende Enzym eingebaut wurde. Es wird die Zahl, um welchen Loop es sich handelt und der Organismus, dessen Loop inseriert wurde, bezeichnet. Die ausgewählten Loops liegen außerhalb des aktiven Zentrums, so dass der Einfluss auf die Wechselwirkung mit dem Substrat minimal beeinflusst werden sollte.

3.5.2 Konstruktion der Est2- und LipS-Loop-Varianten mittels OE-PCR

Der Austausch der Loop-Sequenzen erfolgte durch eine zweistufige *overlap extension* PCR (2.11.5). Im ersten Schritt wurden mit so genannten Megaprimern zunächst zwei einzelne PCR durchgeführt. Diese enthielten sowohl Teile der Sequenzen des einzuführenden Loops, aber auch mit der übrigen Sequenz überlappenden Bereiche. Als Matrize dienten die Expressionsvektoren pET28a-lipSH6 und pET28a-est2H_6. Im zweiten Schritt wurde wiederrum mittels PCR das vollständige genetische Produkt mit dem gewünschten Austausch generiert. Hierfür wurden die im ersten Schritt gewonnen DNA-Fragmente als Matrize genutzt. Abbildung 3.20 verdeutlicht das Prinzip der *overlap extension* PCR.

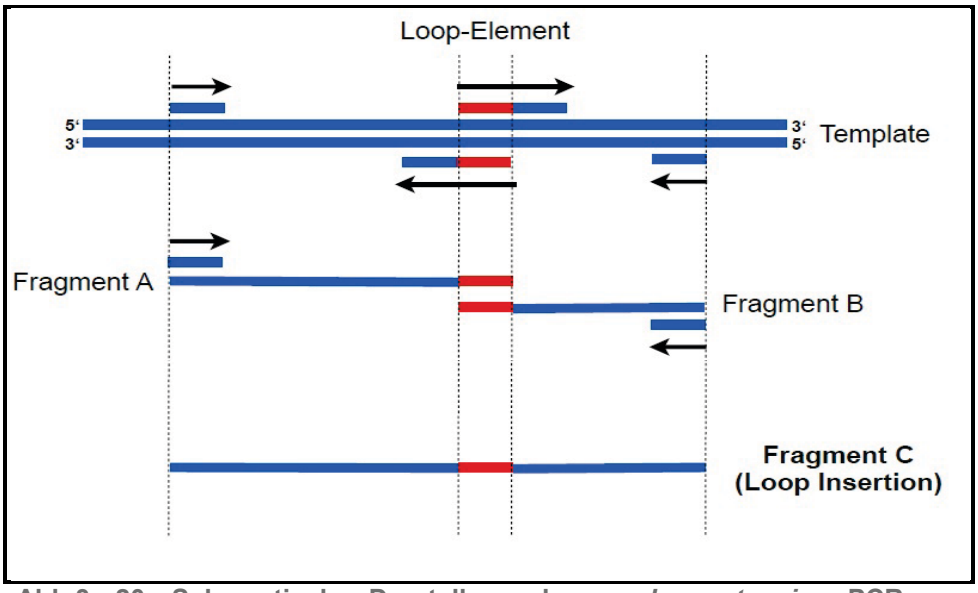

Abb.3. 20: Schematische Darstellung der *overlap extension* PCR zur Erzeugung von Loop-Varianten von *est2* und *lipS.* Die verwendeten Oligonukleotide sind mit Pfeilen markiert. Das Template beschreibt hier die Expressionsvektoren pET28a-lipSH6 und pET28a-est2H_6.

Zusätzlich wurde eine *NdeI*-Erkennungssequenz am 5`-Ende, und eine *Xho*I-Erkennungssequenz am 3`-Ende der jeweiligen Varianten von LipS eingefügt. Die Sequenzen der Est2-Varianten und des Est2 Wildtyp-Enzym enthielten am 3`-Ende eine *SacI*-Erkennungssequenz. Diese Schnittstelle diente zum Einfügen der Gene in das Expressionsplasmid pET28a. Hierfür wurden die zuvor beschriebenen Schritte angewandt (3.2.1). Die aus dieser Klonierungsstrategie resultierenden Expressionsplasmide pET28a-*Est2-L2B*H_6, pET28a-*Est2-L2S*H_6, pET28a-*Est2-L12B*H_6, pET28a-*Est2-L2S*H_6 (Est2-L2B, Est2-L2S, Est2-L12B, Est2-L12S) und pET28a-*LipS-L2B*H_6, pET28a-*LipS-L2A*H_6, pET28a-*LipS-L12B*H_6, pET28a-*LipS-L12A*H_6 (LipS-L2B, LipS-L2A, LipS-L12B und LipS-L12A) enthalten am N-Terminus einen His_6-*tag*, durch den eine Reinigung der Proteine ermöglicht werden sollte.

3.5.3 Expression und Reinigung der Est2- und LipS-Loop-Varianten

Die rekombinanten Enzyme der Loop 2-Mutanten sollten überexprimiert, isoliert und auf ihre Thermostabilität hin überprüft werden. Zum Vergleich wurden ebenfalls die nativen Formen der LipS und der Est2 exprimiert. Zur Überexpression von Est2 und LipS und deren Varianten im heterologen Wirt wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transformiert (2.11.7). Als Negativkontrollstamm wurde ein *E. coli* BL21 (DE3) Stamm mit dem Leervektor mitgeführt.

Die Überexpression von Est2 und dessen Loop-Mutanten Est2-L2B, Est2-L2S, Est2-L12B und Est2-L12S wurde bei 37 °C in Autoinduktionsmedium durchgeführt und die Ergebnisse mit SDS-PAGE-Analysen und Aktivitätsmessungen nach 16 Stunden Inkubationszeit geprüft. Zur Analyse des Löslichkeitsverhaltens wurde der GZE in Fraktionen von löslichem und unlöslichem Protein getrennt und diese durch SDS-PAGE- Analyse untersucht (Abb. 3.21).

Wie aus Abbildung 3.21 hervorgeht, konnte im Gegensatz zum Negativkontrollstamm eine deutlich ausgeprägte Überexpressionsbande verzeichnet werden. Diese zusätzliche Bande konnte verstärkt in der löslichen Fraktion, jedoch auch in der unlöslichen Fraktion detektiert werden. Der Vergleich der Molekulargewichte von Est2 und deren Loop-Mutanten ergab eine gute Übereinstimmung mit den aus den Gensequenzen abgeleiteten theoretischen Molekulargewichten (~35 kDa).

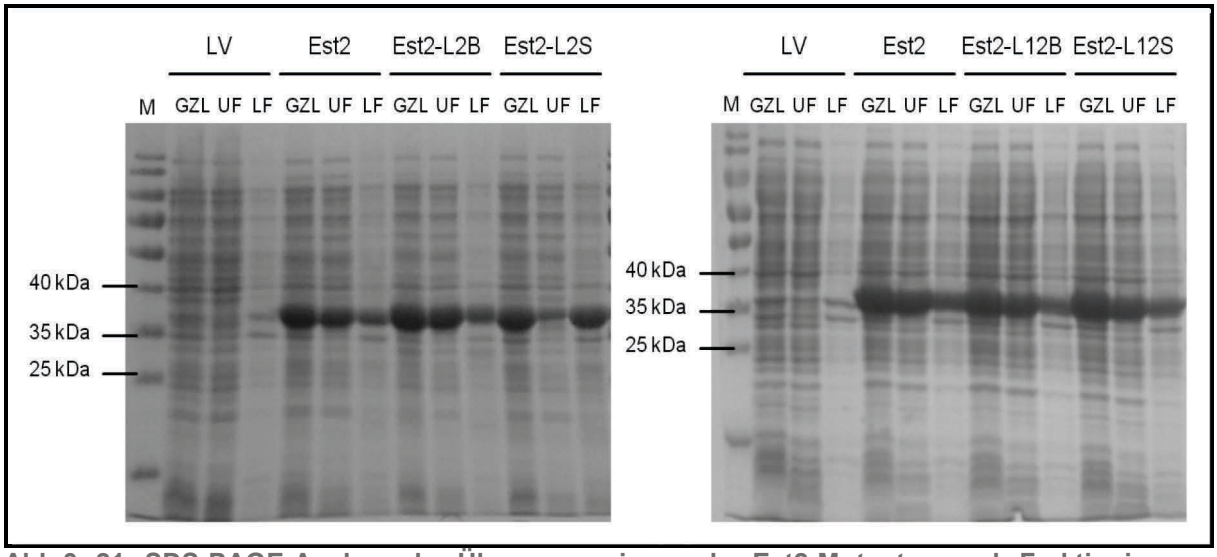

Abb.3. 21: SDS-PAGE-Analyse der Überexpressionen der Est2-Mutanten nach Fraktionierung. Dargestellt sind das Gesamt-Zell-Lysate (GZL), die Fraktion der unlöslichen Proteinen (UF) und die Fraktion der löslichen Proteine (LF) des Negativkontrollstammes *E. coli* BL21(DE3)- pET28a (LV) und der Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)- pET28a-est2H_6, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*Est2-L2B*H_6 und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*Est2-L2S*H_6, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*Est2-L12B*H_6 *und E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*Est2-L2S*H_6 (Est2, Est2-L2B, Est2-L2S, Est2-L12B, Est2-L12S). Die Proben wurden nach Überexpression bei 37 °C in Autoinduktionsmedium (AIM) nach 16 Stunden fraktioniert. Eingesetzt wurde 10µl der jeweiligen Probe (OD_{580nm}= 10). Der hier verwendete Größenstandart (M) ist der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas; St. Leon-Rot).

Um die Aktivität der exprimierten Proteine zu überprüfen, wurden mit den einzelnen Fraktionen Esteraseaktivitätsmessungen durchgeführt (Abb. 3.22). Dabei konnte im Vergleich zur Negativkontrolle eine hohe esterolytische Aktivität im GZL und der löslichen-Fraktion detektiert werden, während in der unlöslichen Fraktion eine abgeschwächte Aktivität identifiziert werden konnte. Beim Vergleich der Aktivitäten der Loop-Mutanten mit dem Wildtyp-Enzym Est2 weisen die Loop 12-Mutanten vergleichbar hohe Aktivitäten auf. Die Aktivitäten der Loop 2-Mutanten hingegen, besonders die Est2-L2S-Mutante, zeigten verringerte Aktivitäten. Aus diesem Grund wurden die Bedingungen der Expressionen variiert. Durch die Reduzierung der Temperatur und Dauer, aber auch die Induktion der Expression durch IPTG konnten keine anderen Ergebnisse erzielt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

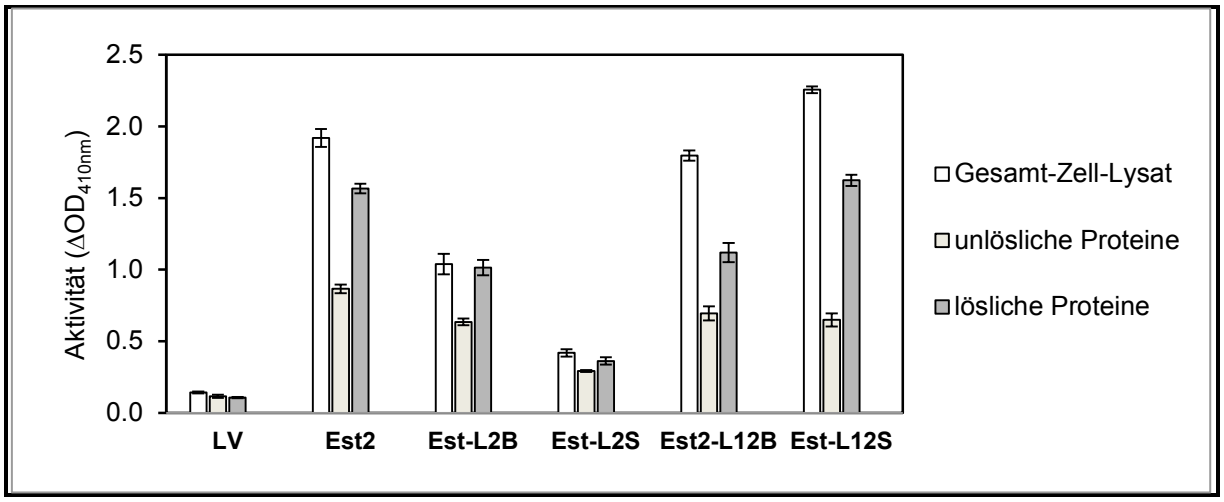

Abb.3.22: Esterase Aktivität von fraktionierten *E. coli*-Extrakten der Est2-Mutanten. Esterase Aktivitätsmessungen der Gesamt-Zell-Lysate (GZL), der Fraktion der unlöslichen Proteinen (UF) und der Fraktion der löslichen Proteine (LF) des Negativkontrollstammes *E. coli* BL21(DE3)- pET28a (LV) und und der Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)- pET28a-Est2H_6, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*Est2-L2B*H_6 und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*Est2-L2S*H_6, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*Est2-L12B*H_6 *und E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*Est2-L2S*H_6 (Est2, Est2-L2B, Est2-L2S, Est2-L12B, Est2-L12S). Dargestellt sind die Messungen nach Überexpression bei 37 °C in Autoinduktionsmedium (AIM) nach 16 Stunden. Die Absorption wurde bei 410 nm nach 5 Min gemessen, eingesetzt wurde 5 µl der jeweiligen Probe (OD_{580nm}= 10) und 200 µl Substrat-Lösung (0,2 mM *para*-Nitrophenyl-Caproat).

Zur Charakterisierung der Loop-Mutanten sollten diese zunächst in homogene reine Form gebracht werden. Dazu wurde zunächst eine Reinigung durch eine immobilisierende Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) durchgeführt. Für diese Reinigungsmethode wurde der N-terminale His_6-*tag,* mit welchem die Loop-Mutanten fusioniert wurden, genutzt. Zur Reinigung wurden die löslichen Fraktionen der Überexpression verwendet.

Die SDS-PAGE-Analyse des Reinigungsverlaufs mittels IMAC ist in Abbildung 3.23 dargestellt. Das Bandenmuster der SDS-PAGE lässt erkennen, dass sowohl Est2 als auch die Loop-Mutanten selektiv an der Säulenmatrix gebunden haben, und in reiner Form eluiert werden konnten. Die Elutionsfraktionen wurden auf ihre esterolytische Aktivität hin

untersucht, so dass der Erfolg der Reinigung bestätigt werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt).

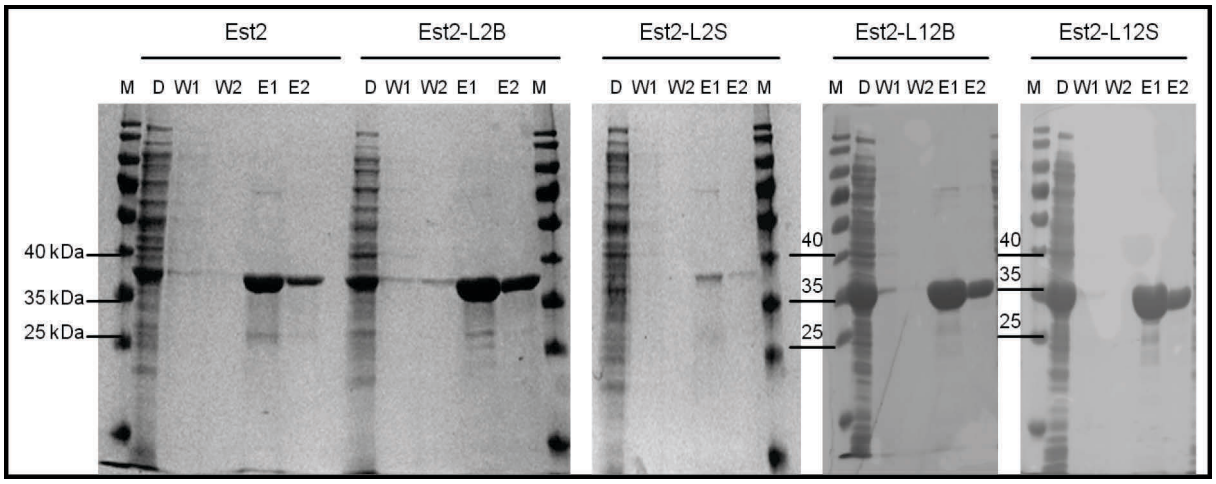

Abb.3.23: Reinigung der Est2-Mutanten durch IMAC. Dargestellt ist die SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von Est2, Est2-L2B, Est2-L2S, Est2-L12B, Est2-L12S durch eine immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC). Folgende Proben der Reinigungsschritte sind aufgetragen: D: Durchlauf, W1 & W2: Waschfraktionen, E1 & E2: Elutionsfraktionen. Der hier verwendete Größenstandart (M) ist der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas; St. Leon-Rot).

Sowohl die SDS-PAGE-Analyse, als auch die Überprüfung der Aktivität zeigten, dass sämtliche Proteine in substantiellen Mengen gewonnen werden konnten. Dabei produzierte Est2-L2S das schwächste Signal. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Aktivität nach Überexpression dieser Mutante überein (Abb.3.22). Durch Veränderungen der Reinigungsbedingungen konnte die Proteinkonzentration nicht verbessert werden.

Die Überprüfung der Proteinmengen (2.12.5) zeigte, dass Est2-L2S Elution mit 120 mg pro Liter Kulturvolumen die geringste Proteinmenge ergab, welche zur Charakterisierung des Enzyms jedoch ausreichend ist. Aus einem Liter Kulturvolumen konnten etwa 610 mg Est2, 520 mg Est2-L2B, 920 mg Est2-L12B und 760 mg Est2-L12S gewonnen werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Enzyme nach Austausch der Sekundärstrukturelemente weiterhin zu katalytischer Aktivität befähigt sind.

Die Expression des Wildtyp-Enzyms LipS und deren Loop-Mutanten wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt, bei welchen LipS erfolgreich exprimiert werden konnte (AIM, 15 °C, 48 h). Auch hier wurde die Negativkontrolle mitgeführt. Nach erfolgter Überexpression wurde das GZL auch hier in Fraktionen von löslichem und unlöslichem Protein getrennt. Die anschließende Überprüfung der Löslichkeit der rekombinanten Proteinen wurde durch SDS-PAGE-Analysen bewerkstelligt (Abb.3.24).

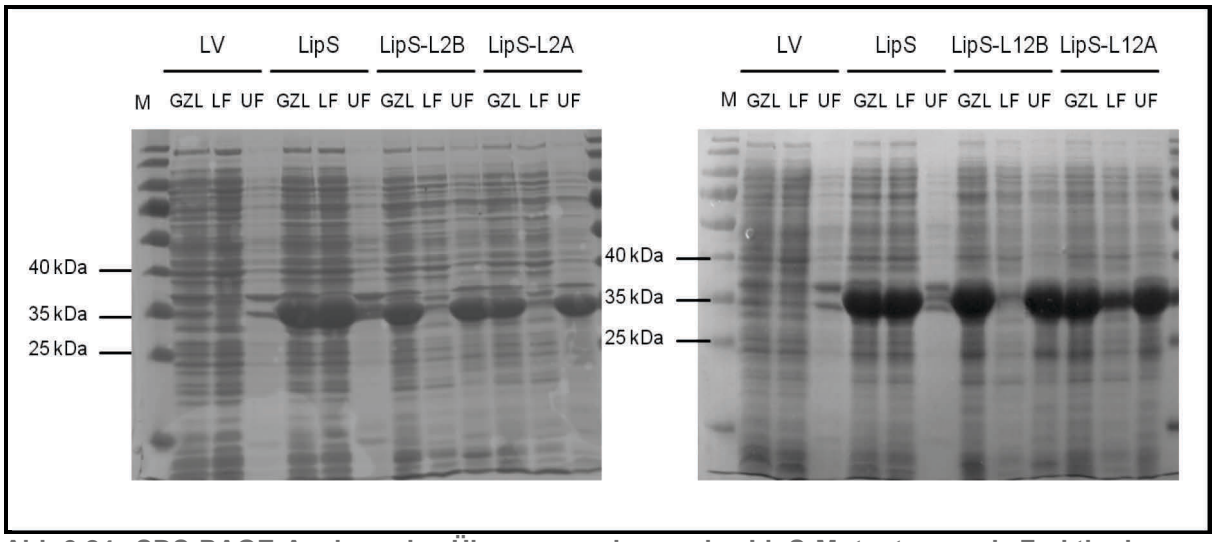

Abb.3.24: SDS-PAGE-Analyse der Überexpressionen der LipS-Mutanten nach Fraktionierung. Dargestellt sind das Gesamt-Zell-Lysate (GZL), die Fraktion der unlöslichen Proteinen (UF) und die Fraktion der löslichen Proteine (LF) des Negativkontrollstammes *E. coli* BL21(DE3)- pET28a (LV) und der Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)- pET28a-*LipSH*$_6$, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*LipSH*$_6$ und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*LipS-L2BH*$_6$, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*LipS-L2AH*$_6$, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*LipS-L12BH*$_6$, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*LipS-L12AH*$_6$ (LipS, LipS-L2B, LipS-L2A, LipS-L12B und LipS-L12A). Die Proben wurden nach Überexpression bei 15 °C in Autoinduktionsmedium (AIM) nach 48 Stunden fraktioniert. Eingesetzt wurde 10 µl der jeweiligen Probe (OD_{580nm}= 10). Der hier verwendete Größenstandart (M) ist der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas; St. Leon-Rot).

Die SDS-PAGE-Analyse ergab, dass die Loop-Mutanten von LipS in der unlöslichen Fraktion lokalisiert sind, und womöglich in Form unlöslicher *inclusion bodies* akkumulieren. Im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym LipS konnte in der Fraktion der löslichen Proteine keine Proteinbande detektiert werden. Die Bestimmung der Aktivitäten dieser Proben bestätigte dies (Abb. 3.25).

In allen drei Fraktionen (GZL, UF und LF) konnte vergleichend zur Negativkontrolle keine zusätzliche Aktivität verzeichnet werden. Das Wildtyp-Enzym hingegen zeigte deutliche Aktivität in der Fraktion der löslichen Proteine. Auch die Verwendung anderer Substrate erbrachte keine Aktivität (Ergebnisse nicht dargestellt).

Wie schon für LipS beschrieben (3.2.2), können die Expressionsbedingungen einen großen Einfluss auf die Proteinproduktion haben. Auf Grund dessen wurden die Expressionsbedingungen variiert. Es wurde der Einfluss der Parameter wie Temperatur, Dauer und Induktion der Expressionen untersucht. Durch diese Veränderungen sollten die Akkumulationen der rekombinanten Proteine in der Zelle minimiert werden, so dass weniger Proteinaggregate entstehen. Die veränderten Expressionsbedingungen führten jedoch nicht zum gewünschten Ergebnis.

Die vermutlich gebildeten *inclusion bodies* enthalten fehlgefaltetes Protein, so dass mittels *in vitro*-Rückfaltung (2.12.3) versucht wurde die Enzyme in ihre aktive Form zu überführen (Clark, 2001; Rudolph & Lilie, 1996). Auch hierdurch konnten die rekombinanten Proteine nicht in ihre katalytisch aktive Form gebracht werden.

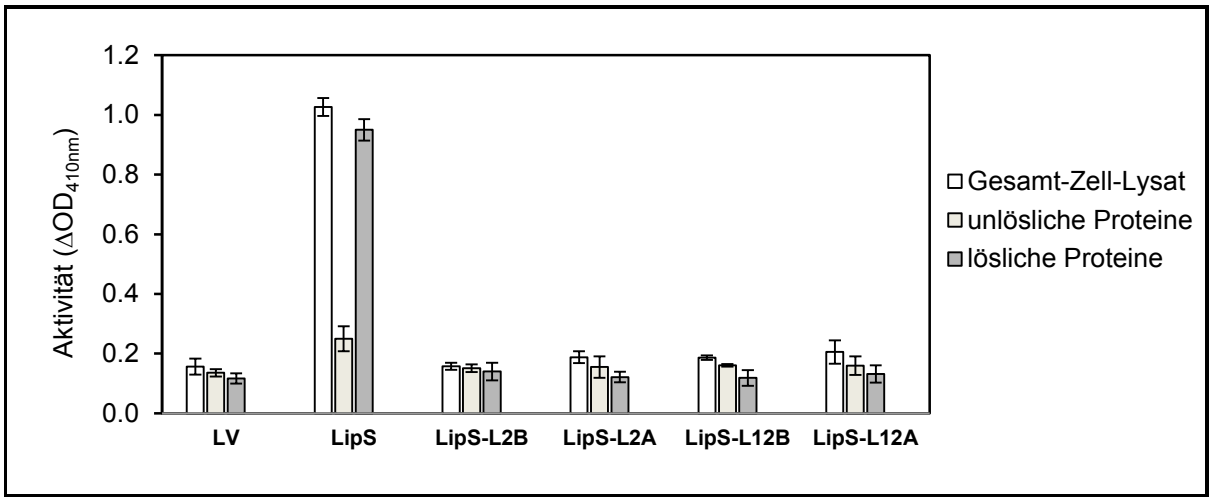

Abb.3.25: Esterase-Aktivität von fraktionierten *E. coli*-Extrakten der LipS-Mutanten. Esterase Aktivitätsmessungen der Gesamt-Zell-Lysate (GZL), der Fraktion der unlöslichen Proteinen (UF) und der Fraktion der löslichen Proteine (LF) des Negativkontrollstammes *E. coli* BL21(DE3)- pET28a (LV) und der Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)- pET28a-*LipSH*$_6$, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*LipSH*$_6$ und *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*LipS-L2BH*$_6$, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*LipS-L2AH*$_6$, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*LipS-L12BH*$_6$, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-*LipS-L12AH*$_6$ (LipS, LipS-L2B, LipS-L2A, LipS-L12B und LipS-L12A). Dargestellt sind die Messungen nach Überexpression bei 15 °C in Autoinduktionsmedium (AIM) nach 48 Stunden. Die Absorption wurde bei 410 nm nach 5 Min gemessen, eingesetzt wurde 5 µl der jeweiligen Probe (OD_{580nm}= 10) und 200µl Substrat-Lösung (0,2 mM *para*-Nitrophenol-Butyrat).

In einem dritten Lösungsansatz wurden molekulare Faltungshelfer, so genannte Chaperone eingesetzt um die Aggregation fehlgefalteter Proteine zu verhindern (Hartl *et al.*, 2011). Diese können die Faltung durch den Aufbau einer geschützten Umgebung, in welcher die Proteinfaltung individueller Proteine durchgeführt werden kann, regulieren. Sie können eine korrekte Faltung auch durch Bindung von freiliegenden Regionen ungefaltener oder partiell gefalteter Proteinketten begünstigen (Frydman, 2001; Lund, 2001). Der Einsatz dieser molekularen Faltungshelfer konnte nicht zur Produktion von aktiven Loop-Mutanten von LipS beitragen.

Die erfolglose Anwendung verschiedener Methoden und Bedingungen während der Expression zur Verhinderung der *inclusion bodies* Bildung legt die Vermutung nahe, dass es nicht die Aggregation der Proteine ist, welche zum Aktivitätsverlust der Loop-Mutanten führt. Eine mögliche Erklärung ist die durch den Austausch der Oberflächenloops erzeugte gestörte Gesamtstabilität der Proteine. Dies kann zum Verlust der eigentlichen Faltung der Proteine führen.

Grundsätzlich ist die Faltung von Proteinen ein linearer Prozess. Dies wurde erstmals durch Experimente der Rückfaltung von Anfinsen beschrieben wurde (Anfinsen *et al.*, 1961). Dabei ist die Information für die Faltung von Proteinen durch ihre Aminosäuresequenz festgelegt. Dies wurde auch durch zahlreiche weitere Versuche beschrieben, welche aus entfaltetenen Proteinen wieder funktionsfähige Proteine generierten (Eiberle & Jungbauer, 2010; Jungbauer & Kaar, 2007; Wetlaufer, 1973).

Ein aufgefaltetes Protein in Lösung bildet viele Interaktionen mit dem Lösungsmittel aus. Hierbei bestimmen die hydrophoben Aminosäuren, welche die Exposition mit dem Lösungsmittel meiden wollen, wesentlich die ersten Schritte der Proteinfaltung. Die hydrophoben Aminosäuren lagern sich so im Inneren des Proteins an, aus nicht-kovalenten Interaktionen mit dem Lösungsmittel werden intramolekulare Interaktionen und Wasserstoff-Brücken gebildet (Dyson *et al.*, 2006). Diese Prozesse führen letztendlich zu einem Energieminium des gefalteten Zustandes, welcher thermodynamisch stabil ist (Gruebele, 2002).

Ist die Aminosäuresequenz verändert, so kann dies zum Verlust von Wechselwirkungen führen, die für die Faltung notwendig sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch den Austausch der Sekundärstrukturelemente nicht nur eine Aminosäure punktuell verändert, sondern gleich ganze Struktur-Regionen ausgetauscht, wodurch gleich mehrere fehlende oder falsche Wechselwirkungen eine korrekte Faltung unmöglich machen könnten.

Da Proteine korrekt gefaltet sein müssen, um ihre biologische Funktion ausüben zu können und die hier untersuchten Loop-Mutanten von LipS keine Aktivität aufwiesen (Abb. 3.25), ist die fehlende Aktivität dieser Mutanten durch die Störung des Faltungsprozesses zu begründen (Fitzpatrick *et al.*, 2011).

Die Tatsache, dass die hier erzeugten Loop-Mutanten des thermophilen Enzyms Est2 an eben denselben Strukturbereichen Austausche tragen und dennoch Aktivität aufweisen (Abb. 3.22) verdeutlicht, wie empfindlich der Prozess der Faltung eines Proteins sein kann. So können die minimalsten Veränderungen zum Verlust der stabilen Gesamtstruktur führen. Dies wurde auch für andere Enzyme beobachtet (Hynes *et al.*, 2009; Krynetski *et al.*, 1995). Die Tatsache, dass alle Est2-Mutanten in löslicher Form vorliegen, lässt darauf schließen, dass es sich bei diesen Loop-Mutanten um korrekt gefaltetes Protein handelt, welches eine definierte Struktur besitzt. Dies führt zu der Annahme, dass sich Loop 2 und Loop 12 von Est2 austauschen lassen ohne Verluste der für die Katalyse notwendigen Konformation. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass das Gerüst des α/β-Hydrolase-Faltungsmotivs durchaus Insertionen und Deletionen tolerieren kann (Nardini & Dijkstra, 1999). So war durch den Austausch eines Loops der Lipase A von *Bacillus subtilis* lediglich die Enantioselektivität betroffen, nicht aber die Aktivität des Enzyms (Boersma *et al.*, 2008).

3.5.4 Einfluss der Temperatur auf die Stabilität und Aktivität der Est2-Loop-Varianten

Um Aufschluss über die Relevanz von zwei Loop-Strukturen für die thermischen Eigenschaften der hier untersuchten Enzyme zu erhalten, wurden die entsprechenden Loops in Est2 und LipS ausgetauscht. Die Überexpression und Reinigung von jeweils vier Loop-Mutanten von Est2 und LipS war nur im Falle der Est2-Mutanten erfolgreich. Da die Gewinnung der Loop-Mutanten von LipS nicht möglich war, werden im Folgenden nur die Est2-Mutanten analysiert. Dabei werden diese bezüglich ihrer Temperatur-Stabilität und Aktivität untersucht.

Zunächst wurde die Thermostabilität der Loop-Mutanten von Est2 zwischen 10-80 °C untersucht (Abb. 3.26). Der Austausch von Loop 2 und Loop 12 in Est2 hat eine deutliche Veränderung der Temperaturstabilitäten hervorgerufen. Auffallend sind zunächst die Profile dieser Messungen. Während die Temperaturstabilität von Est2 in Richtung des Temperaturoptimums von 70 °C ansteigt, zeigten die Profile der Loop-Mutanten von Est2 die entgegengesetzte Tendenz. Weiterhin wird deutlich, dass alle vier Loop-Mutanten bei 70 °C eine verringerte Temperaturstabilität aufweisen. Est2 hat nach drei Stunden Inkubation bei 70 °C nahezu keinen Aktivitätsverlust zu verzeichnen, wohingegen die Loop 2-Mutanten nach derselben Inkubationsdauer nur noch 60 % (Est2-L2B) und 6 % (Est2-L2S) Restaktivität aufwiesen. Auch die Loop2- Mutanten wiesen nach drei Stunden Inkubation bei 70 °C eine Verringerung der Thermostabilität auf. Im Gegenzug dazu sind alle Mutanten bei 10 °C und 20 °C im Vergleich zum Wildtyp-Enzym verstärkt stabil.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Mutanten untereinander wird eine weitere Tendenz ersichtlich. Est2-L2B und Est2-L12B sind deutlich thermostabiler, als die Est2-L2S und Est2-L12S. Dies ist insoweit interessant, da dies bedeutet, dass die Insertion der Loops aus dem psychrophilen Enzym LipS in das thermophile Enzym Est2 die Thermostabilität mehr herabsenkt als die Insertionen des mesophilen Enzyms LipB.

Somit konnten durch den Austausch von Loop 2 und Loop12 durch die homologen Strukturen von LipS und LipB thermolabilere Varianten von Est2 erzeugt werden.

Um den gesamten Zusammenhang der Auswirkungen der Austausche der Loops zu verstehen, wurden auch die Temperaturoptima der Est2-Loop-Mutanten ermittelt. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den Temperaturstabilitäten konnten hier jedoch keine markante Veränderung verzeichnet werden. Alle Loop-Mutanten wiesen wie Est2 ein Temperaturoptimum bei 70 °C auf. Die Werte dieser Messungen wichen nur geringfügig von den Werten von Est2 ab (<10 %), so dass hier auf die detaillierte Beschreibung und Darstellung der Daten verzichtet wird.

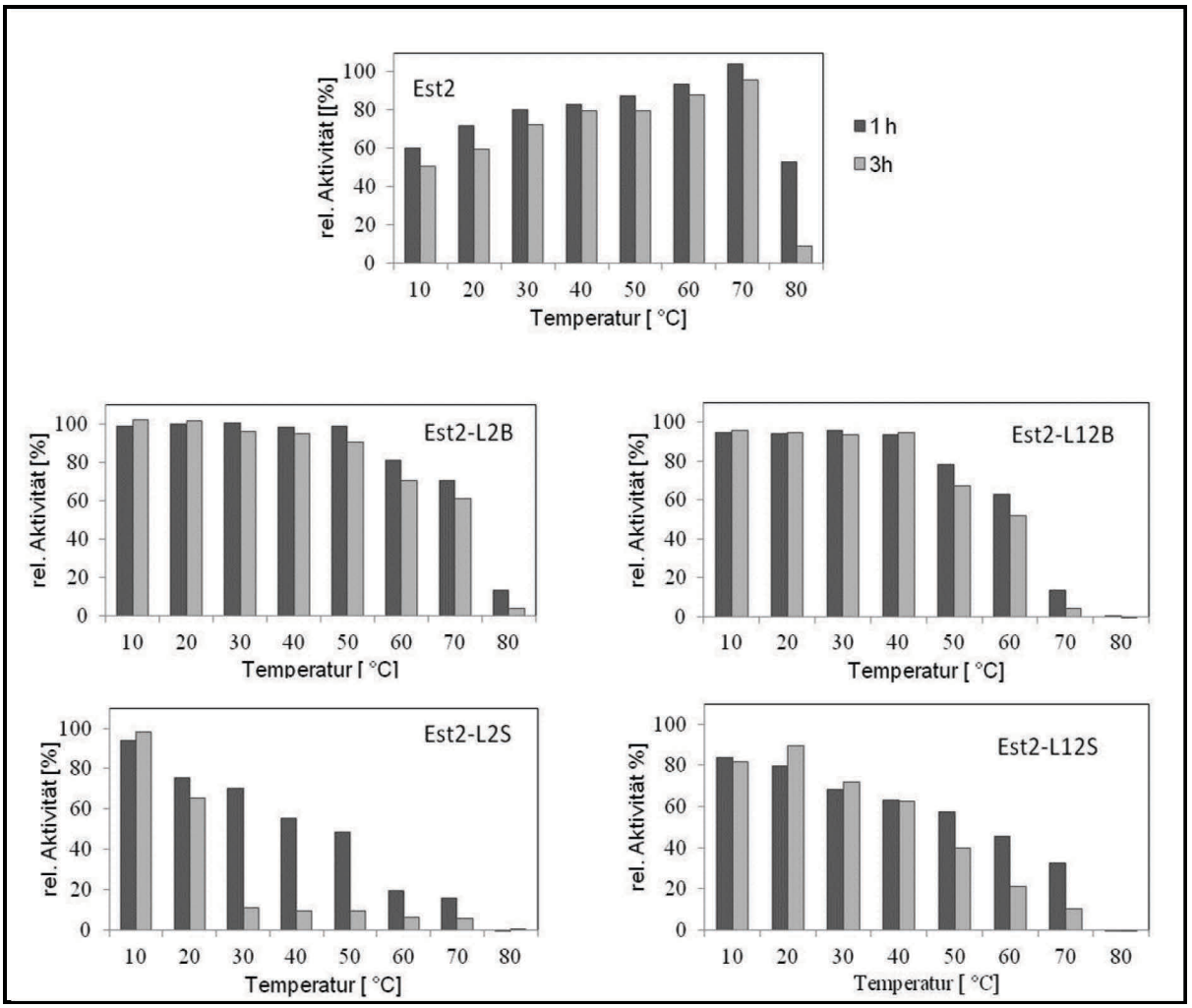

Abb.3. 26: Temperaturstabilitäten von Est2 und dessen Loop-Mutanten. Die Enzyme wurden über 3 h bei Temperaturen von 10-80 °C inkubiert. Nach 1 bzw. 3 h wurden unter Verwendung von 0,2 mM *para*-Nitrophenyl-Caproat als Substrat Aktivitätsmessungen durchgeführt. Als 100 % wurde die Aktivität zum Zeitpunkt t=0 der Inkubation definiert. Die Absorption wurde bei 405 nm nach 10 Min gemessen. Eingesetzt wurde 2 µl der jeweiligen Probe und 200 µl Substrat-Lösung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 5 %.

Eine Veränderung der Temperaturstabilität ohne gleichzeitig markante Änderung der Temperaturaktivität ist durchaus möglich. Da die Loop-Mutanten bei 70 °C Restaktivitäten aufwiesen, ist hier auch eine enzymatische Katalyse möglich.

Aminosäuren, die zur Katalyse beitragen, sind nicht zwingend mit der Protein-Stabilität verbunden. Diese Stabilitäts-Funktion Hypothese impliziert, dass die Entfernung von Aminosäuren, welche zur Thermostabilität beitragen, die Aktivitäten des Enzyms nicht beeinflussen müssen. Dies demonstrierten auch Versuche mittels gerichteter Evolution und rationalem Proteindesign. Durch zufällige Mutagenese der *Bacillus subtilis* p-Nitrobenzyl Esterase konnte die Thermostabilität dieses Enzyms erhöht werden ohne die katalytische Aktivität bei 30 °C zu beeinflussen (Giver *et al.*, 1998). Dies belegt, dass spezifische Aktivität und Thermostabilität unabhängige Eigenschaften sind. Dies kann dadurch begründet werden, dass Aminosäurereste, die für die Katalyse (aktives Zentrum) und die korrekte

Faltung des Proteins zuständig sind, stärker konserviert sind, als solche, die an der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind (Lehmann *et al.*, 2002). Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, dass besonders Modifikationen an der Proteinoberfläche Einfluss auf dessen Thermostabilität haben (Spiller *et al.*, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Loops 2 und 12 von Est2 ein wichtiger struktureller Faktor sind, um höheren Temperaturen standzuhalten.

Durch die Insertion des Loops 2 von LipB wurde dieser Loop in Est2 um vier Aminosäuren verlängert, die Insertion des Loops 2 von LipS vergrößerte diesen sogar um fünf Aminosäuren. Bei Austausch von Loop 12 durch den entsprechenden Loop von LipB weist dieser drei zusätzliche Aminosäuren auf, wohingegen Loop 12 von LipS keine Verlängerung bedeutet.

Der Effekt der Länge von Oberflächenloops auf die Stabilität eines Proteins ist eine wichtige Betrachtung, welche bislang noch nicht systematisch untersucht wurde. Die Verkürzung langer Loops kann in Protein-Destabilisation resultieren, da Loops und deren Längen wichtige Elemente sind, die den totalen Wert der Entropie der Polypeptidkette beeinflussen (Nagi & Regan, 1997; Zhou, 2004). Wie auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Mutationsstudien gezeigt, sinkt die Thermostabilität mit zunehmender Länge der Loops. Statistische Erhebungen von Proteinen mit bekannter dreidimensionaler Struktur zeigten, dass lange Loops (> 10 Aminosäuren) in Proteinen eine verringerte Häufigkeit aufweisen und meist direkt in die Funktion der Proteine involviert sind (Martin *et al.*, 1995; Thornton *et al.*, 1988). So kommt es auch für die Est2-Mutanten in Frage, dass Loop 2 und Loop 12 zur Funktion der Thermostabilität in Est2 beitragen. Nagi und Regan (1997) nutzen das *four-helix-bundle*-Protein Rop als Modellsystem, um die Bedeutung der Länge von Loops für Protein-Stabilität und Faltung zu erklären. Ein aus zwei Aminosäuren bestehender Loop wurde durch eine Serie von unnatürlichen Loops, bestehend aus einem bis zehn Glycinen, ersetzt. Daraus resultierte die Beobachtung, dass die Länge der Insertion des Loops direkt mit der Thermostabilität korreliert.

Um ein besseres Verständnis von den veränderten Thermostabilitäten der Loop-Mutanten von Est2 zu erhalten, wurde die Komposition der ausgetauschten Loops auf Aminosäurenebene betrachtet (Abb. 3.13). Abbildung 3.13 zeigte vergleichend die Aminosäuresequenzen von Loop 2 und Loop 12 der homologen vier Esterasen. Die hierbei erörterten unterschiedlichen Prolin-Gehalte der Loops könnten ein weiterer Erklärungsansatz der verringerten Thermostabilität der Est2-Mutanten sein. Im Falle von Loop 2 hat Est2-L2B zwar ebenso wie das Wildtyp-Enzym drei Proline, die Sequenz des Loops 2 von Est2-L2S hingegen enthält nur ein Prolin. Der Loop12 von Est2 hat fünf Proline, Est2-L12B enthält drei

und Est2-L12S sogar nur zwei Proline. Est2-L12B besitzt außerdem im Loop 12 zwei zusätzliche Glycine.

Prolin und Glycin haben eine wichtige Bedeutung in der Temperaturstabilität. Eine vermehrte Anzahl an Prolinresten kann durch die Abnahme der Entropie der Entfaltung die Thermostabilität eines Proteins fördern. Im ungefaltenen Zustand ist Glycin durch sein fehlendes β-Kohlenstoffatom der Aminosäurerest mit der höchsten konformativen Entropie. Prolin hingegen hat die geringste konformative Entropie. Dies wird durch die geringeren möglichen Konfigurationen dieser Aminosäure begründet. So kann die Substitution der Proline in den Est2-Mutanten Est2-L2S, ESt2-L12B und Est2-L12S und die Insertion von zwei Glycinen in Est2-L12B zur Erhöhung der konformativen Entropie führen und die Proteine dadurch thermolabiler werden lassen (Matthews *et al.*, 1987; Sriprapundh *et al.*, 2000).

Die Insertion und Deletion von Glycin und Prolin wurde auch in Studien genutzt, um thermodynamische stabile Enzyme zu generieren (Vieille & Zeikus, 2001). Kulakova *et al.* (2004) charakterisierten die Esterase PsyEst aus *Psychrobacter sp. Ant300*, welche zu der HSL-Familie zählt. Die Substitution von Glycin durch Prolin in einem Loop führte in diesem Enzym zu gesteigerter Temperaturstabilität bei 40 °C.

Auch eine Reihe von thermophilen und hyperthermophilen Enzymen nutzt diesen Stabilisierungsmechanismus. Die thermophile *Bacillus thermoglucosidasius* oligo-1,6-Glucosidase verfügt über 22 zusätzliche Proline im Vergleich zum mesophilen Enzym aus *Bacillus cereus*. Diese Proline wurden in die korrespondierenden Stellen des mesophilen Enzyms eingebaut. Dies resultierte in einer erhöhten Thermostabilität, die mit der Anzahl der inserierten Proline stieg (Watanabe *et al.*, 1994). Durch die Insertion von Prolin in die moderat thermophile α-Glucosidase (TtGluA) aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* konnte ebenfalls eine erhöhte Thermostabilität beobachtet werden (Zhou *et al.*, 2010).

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass der Austausch der Oberflächenloops von Est2 durch verwandte Loops des psychrophilen und mesophilen Enzyms eine Erklärung für die Adaption der homologen Enzyme an verschiedene Temperaturen bietet. Dieser Loop-Austausch führte zu einem thermolabileren Charakter dieser Mutanten, wobei sie durchaus ihr Temperaturoptimum von 70 °C nicht verloren haben. In dreien der vier Mutanten wurden durch den Austausch dieser Loops Substitutionen von bis zu fünf Aminosäuren erzeugt. Parallel wurde auch in drei von vier Mutanten der Prolin-Gehalt reduziert.

Daraus lässt sich schließen, dass die Deletion einiger Aminosäuren und die Subsitution von Prolin dieser Loops ein natürlicher Mechanismus in der Schwächung der Stabilität eines Proteins sein könnte. Umgekehrt kann die gezielte Stabilisierung dieser Strukturbereiche durch Insertion von Aminosäuren, bevorzugt Prolin, die Thermostabilität erhöhen, indem sie

die Rigidität der Struktur erhöht und damit die Entfaltung bei höheren Temperaturen verhindert.

Studien zeigten, dass die Modifikation von längeren Oberflächenloops in erhöhter struktureller Flexibilität und verringerter Rigidität resultierten (Feller & Gerday, 2003). Die erhöhte Flexibilität ist eine bekannte Eigenschaft Kälte-adaptierter Enzyme. Die Verlängerung der Loops und die Substitution der rigiden Aminosäure Prolin könnten die Flexibilität erhöhen, wodurch die Stabilität der Mutanten bei niedrigeren Temperaturen gesteigert wird.

3.5.5 Zusammenfassung: Untersuchung der molekularen Mechanismen der Temperatur-Adaption durch rationales Proteindesign

Der Vergleich der Sequenzen und Strukturen der mesophilen und Kälte- bzw. Wärme-adaptierten Esterasen sollte dazu beitragen, die Mechanismen der adaptiven Veränderung an die physiologischen Temperaturen der Organismen zu definieren. Verschiedenste Vergleiche führten zu der Annahme, dass zwei strukturelle Bereiche dieser Enzyme ein zentrales Element in dieser Fragestellung darstellen könnten. Diese Bereiche bestehen aus zwei Loops an der Proteinoberfläche, welche sich in Komposition und Anzahl der Aminosäuren, Konformation und Dynamik unterschieden.

Um die Bedeutung dieser Strukturbereiche in der Temperatur-Adaption näher zu betrachten, wurde hier die Methode des rationalen Proteindesigns verwendet. Hierzu sollten ausgewählte Enzymeigenschaften, welche mit der Temperatur korrelieren, durch Modifikation dieser Strukturbereiche, verändert werden. Diese Veränderungen sollten folglich den experimentellen Nachweis erbringen, dass diese Strukturbereiche eine Schlüsselrolle in der Temperatur-Adaption spielen.

Das Konzept hierfür beruht auf dem Austausch von Loop 2 und Loop 12. Die Manipulation dieser bezog sich nicht auf einzelne Aminosäuren, sondern sollte die gesamte Länge der Loops betreffen. Die gegensätzlichsten Enzyme Est2 und LipS wurden gewählt, um deren Loops untereinander und durch die Loops des mesophilen Enzyms LipB zu tauschen.

Zur Insertion dieser Sekundärstrukturelemente wurden rekombinante DNA-Techniken angewandt. Durch eine zweistufige *overlap extension* PCR konnten so je vier Loop-Mutanten (Est2-L2B, Est2-L2S, Est2-L12B, Est2-L12S und LipS-L2B, LipS-L2A, LipS-L12B, LipS-L12A) von Est2 und LipS generiert werden.

Die Expression aller Mutanten und deren Wildtyp-Enzymen erfolgt in *E. coli* BL21(DE3) mit den entsprechenden Bedingungen, welche auch die Expression und Reinigung der Wildtyp-Enzyme ermöglichten. Die Loop-Mutanten von Est2 ließen sich erfolgreich exprimieren und

in ausreichenden Mengen reinigen, um diese weiterhin charakterisieren zu können. Im Gegensatz dazu konnten alle vier LipS-Mutanten weder löslich noch aktiv exprimiert werden. Da auch die Anwendung von Methoden zur *in vitro* Renaturierung, der Einsatz von Chaperonen und die Veränderung der Expressionsbedingungen erfolglos blieb, kann dies auf fehlerhafte Faltungsprozesse, bedingt durch die manipulierte Aminosäuresequenz, zurückgeführt werden. Dies wiederum spiegelt die Bedeutung der Loop 2 und 12 in der Stabilität der Proteine wider.

Nach der erfolgreichen Expression und Reinigung der Est2-Mutanten wurden diese bezüglich ihrer Temperaturstabilität und Aktivität analysiert.

Alle vier Loop-Mutanten zeigten eine verringerte Thermostabilität. Dabei konnten bei allen Loop-Mutanten eine Reststabilität bei 70 °C beobachtet werden. Gleichzeitig zeigten die Stabilitätsprofile eine verbesserte Stabilität bei kälteren Temperaturen an. Interessanterweise zeigten die Mutanten, welche die Loop-Insertionen des psychrophilen Enzyms LipS trugen, die thermolabilsten Eigenschaften. Eine schematische Darstellung der erzeugten Est2-Mutanten und der Auswirkungen des Austauschs von Loop 2 und 12 auf die Thermostabilität ist in Abbildung 3.27 verdeutlicht.

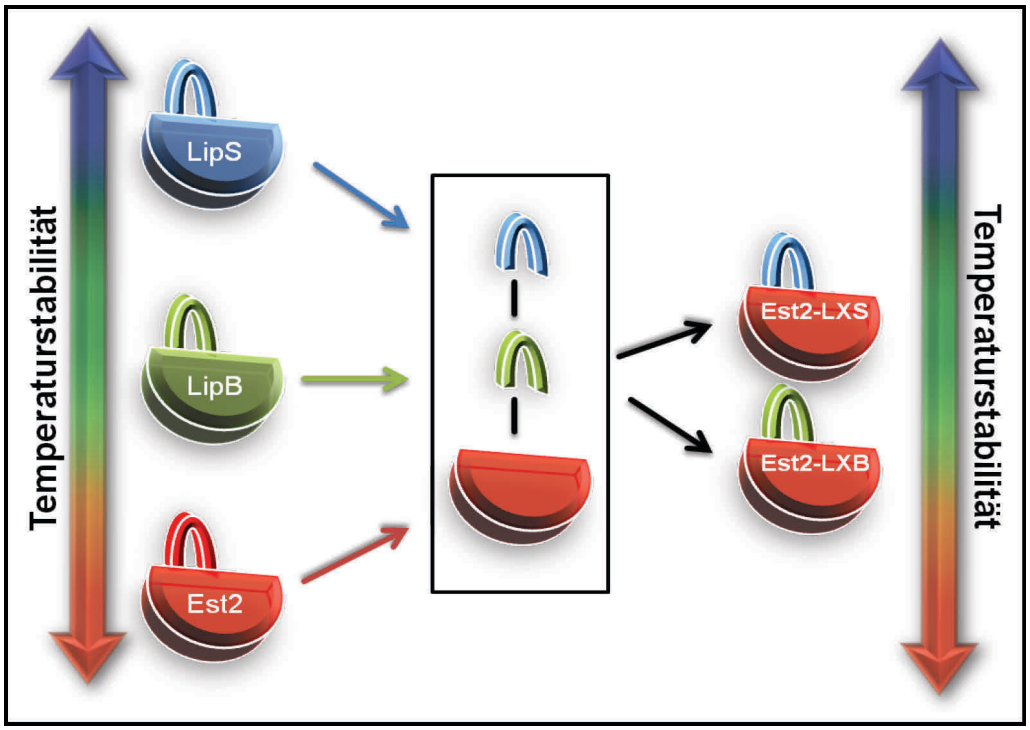

Abb. 3.27: Schematische Darstellung der erzeugten Est2-Loop-Mutanten und der Auswirkungen des Austauschs von Loop 2 und 12 auf die Thermostabilität. Dargestellt wird Thermostabilität bei hohen Temperaturen durch die Farbe Rot, bei niedrigen Temperaturen durch die Farbe Blau, moderate Thermostabilitäten werden in Grün dargestellt. X bezeichnet den jeweiligen Austausch von Loop2 oder Loop12.

Weiterhin wurde die Aktivität der Loop-Mutanten bei verschiedenen Temperaturen ermittelt. Der Austausch der Loops hatte keinerlei Einfluss auf die spezifische Aktivität; die Mutanten zeigten wie Est2 ein Temperaturoptimum von 70 °C.
Molekulare Gründe für die Reduzierung der Thermostabilität könnten in den unterschiedlichen Längen der jeweiligen inserierten Loops liegen. Durch den Austausch der Loops von Est2 wurden diese um bis zu fünf Aminosäuren verlängert, wodurch deren Thermodynamik und Flexibilität beeinflusst werden kann. Ein weiterer Aspekt ist die durch die Austausche bewirkte Reduzierung der Anzahl von Prolinen in den Loops. Diese Aminosäure kann eine Erhöhung der konformativen Entropie der Proteine bewirken und diesen so einen thermolabileren Charakter verleihen.
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit Hilfe bioinformatischer Analysen sowie experimenteller Untersuchungen zwei Oberflächenloops identifiziert werden konnten, welche einen Einfluss auf die Temperaturstabilität von Est2 haben.
Die Ergebnisse der vorgelegten experimentellen Daten verdeutlichen die Effektivität des in dieser Arbeit verwendeten Konzeptes zur Analyse adaptiver Veränderung an extreme Temperaturen.

Die sorgfältige und begründete Auswahl eines homologen Sets von Enzymen verschiedenen Temperatur-Ursprungs ist die Basis dieses Konzepts. Hierbei stand die Sicherstellung einer hohen Ähnlichkeit auf Sequenz und Strukturebene der ausgewählten Enzyme im Vordergrund. Diese Ähnlichkeit ermöglichte es, die für die Temperatur-Adaption relevanten Unterschiede zu entdecken. Die Überprüfung der Funktion dieser Unterschiede durch rationale Mutationsstudien konnten schließlich die aufgestellten Hypothesen bekräftigen. Grundsätzlich können sich Wissenschaftler für die Untersuchung der Thermostabilität verschiedenster Strategien bedienen (Lehmann & Wyss, 2001). Diese sind mehr oder weniger aufwendig und führen zu verschiedensten Ergebnissen.

Das Konzept dieser Arbeit demonstriert durch seine gerichtete und einfache Anwendung eine nützliche Herangehensweise an die anspruchsvolle Fragestellung nach den Mechanismen der Temperatur-Adaption von Enzymen. EinVorteil dieses Konzepts ist die Fähigkeit, Thermostabilitäten modifizieren zu können. Dies ist besonders für biotechnologische Fragestellungen mit industriellem Schwerpunkt interessant. Die schlüssigen Ergebnisse dieser Studie unterstreichen die erfolgreiche Umsetzung des hier verwendeten Konzeptes.

4 Zusammenfassung

Psychrophile und thermophile Mikroorganismen produzieren als natürliches Ergebnis der Adaption an ihre Umgebungstemperatur spezifische Biokatalysatoren. Diese funktionieren unter extremen Temperaturen, bei denen ihre mesophilen Gegenstücke nicht bestehen könnten. Ihre außergewöhnlichen thermischen Eigenschaften machen diese Enzyme zu interessanten Objekten für den industriellen und biotechnologischen Einsatz. Daher besteht großes Interesse an der Erforschung der molekularen adaptiven Mechanismen, die sie befähigen, bei extremen Temperaturen ihre Stabilität und katalytische Aktivität aufrecht zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Analyse dieser Fragestellung ein vergleichender bioinformatischer Ansatz mit experimenteller Verifizierung verfolgt. Der Vergleich mehrerer strukturell ähnlicher Enzyme verschiedenen Temperatur-Ursprungs, sollte die jeweilige Temperatur-Adaption der Enzyme aufdecken.

Dazu wurde ein homologes Set an lipolytischen Enzymen generiert, welches aus einem Template-Enzym mit bekannter Struktur und homologen Enzymen unterschiedlichen Temperatur-Ursprungs besteht. Als Template wurde die bereits charakterisierte thermophile Esterase Est2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* festgelegt und deren Homologe, LipS aus dem psychrophilen Stamm *Shewanella halifaxensis*, LipB aus dem mesophilen Stamm *Burkholderia thailandensis* und LipP aus dem psychrotoleranten Stamm *Pseudomonas* sp. B11 -1, gewählt.

Die komparative Analyse der Strukturen auf Basis der Kristallstruktur von Est2 und generierten Modellen der homologen Enzyme zeigte die starke Konservierung des α/β-Hydrolase-Faltungsmotivs und des aktiven Zentrums. Die homologen Enzyme konnten mittels heterologer Expression und anschließender Reinigung für eine biochemische Charakterisierung zur Verfügung gestellt werden. Diese bestätigte, dass trotz ihrer Struktur- und Sequenzähnlichkeit die thermischen Eigenschaften an ihren Temperatur-Ursprung angepasst sind. Die höchste Aktivität zeigten LipS, LipP und LipB bei 30 °C, 35 °C bzw. 40 °C. Die Untersuchung der Stabilität der Enzyme verdeutlichte den thermolabilen Charakter von LipS und LipP. Damit konnten LipB und LipS erstmals charakterisiert werden.

Vergleichende Analysen der Sequenz, Struktur und molekulardynamischer Simulationen konnten spezifische Unterschiede in den Oberflächenloops 2 und 12 der vier Enzyme identifizieren. Die Bedeutung dieser Strukturen für die Temperatur-Adaption wurde durch den gezielten Austausch der Loops zwischen den Enzymen nachgewiesen. Die Insertion von mesophilen und psychrophilen Loops in das thermophile Enzym Est2 bewirkte eine Schwächung der Stabilität von Est2 bei Temperaturen > 50 °C, während die Stabilität < 50 °C deutlich erhöht wurde. Verschiedene Aspekte wie die Länge und Zusammensetzung

der Loops werden als molekulare Gründe für deren Bedeutung für die Temperatur-Adaption diskutiert.

Die hier verfolgte Strategie, bestehend in der spezifischen Auswahl homologer Enzyme und komparativer Untersuchungen, ist nach heutigem Stand die erste vergleichende Analyse einer Serie von vier α/β Hydrolasen, speziell Esterasen, aus dem gesamten Temperaturspektrum.

5 Summary

Psychrophilic and thermophilic microorganisms produce specific biocatalysts, so-called extremozymes, as a natural result of their adaptation to the environmental temperature. They function under extreme temperatures which their mesophilic counterparts cannot stand. Due to their specific thermal properties these biocatalysts have attracted attention for diverse industrial and biotechnological applications. Therefore, there is great interest in understanding molecular adaptive mechanisms that enable them to maintain their stability and catalytic activity at extreme temperatures. In this work, a comparative bioinformatic and computational approach combined with experimental verification has been applied to address this question. The comparison of several structurally related enzymes originating from organisms with different growth temperature optima should reveal details about their temperature adaptation.

A set of four lipolytic enzymes consisting of a template enzyme of known structure, and homologous enzymes with different temperature origin has been defined. As the template enzyme the well studied thermophilic esterase Est2 from the *Alicyclobacillus acidocaldarius* was chosen. As homologous enzymes LipS from psychrophilic *Shewanella halifaxensis,* LipB from mesophilic *Burkholderia thailandensis* and LipP from psychrotolerant *P*seudomonas sp. strain B11-1 were selected. The extensive structural comparisons of Est2 X-ray structure and homology models of the three other homologous enzymes led to the conclusion that the overall structures including conserved α/β-hydrolase-fold and the active sites are similar. To investigate the biochemical properties of these enzymes, recombinant LipS, LipP and LipB were expressed heterologously as soluble and catalytically active enzymes. The enzymes were purified to homogeneity by immobilised metal affinity chromatography. Thus LipB and LipS could be characterized as novel bacterial esterases.

LipS, LipP and LipB showed temperature optima at 30 °C, 35 °C and 40 °C respectively. The investigation of the stability demonstrated the thermolabile character of psycrophilic LipS and psychrotolerant LipP. Therefore we conclude that, despite their structural and sequence similarity, thermal properties of the four studied esterases resemble the growth temperature of their source organisms.

Comparative analysis of the sequence, structure, and molecular dynamics simulations revealed notable differences in surface loops 2 and 12 in all four enzymes. The importance of these loops for temperature adaptation was demonstrated by the exchanging them between here analysed enzymes. The insertion of mesophilic and psychrophilic loops in the thermophilic enzyme Est2 caused a weakening of the stability of Est2 at temperatures > 50° C, while the stability of <50 ° C was significantly increased. Various aspects such as

the length and amino acid composition of the loops are discussed as possible reasons for observed changes in thermal properties of these Est2 loop-variants.

Here presented strategy accompanying selection of enzymes with conserved sequence and structure, but different temperature origin, bioinformatic and computational analyisis as well as experimental-biochemical comparative analysis is to our knowledge for the first applied for study thermal properties of enzymes belonging to the large family of α/β-hydrolases.

6 Literaturverzeichnis

Adekoya, O.A., Helland, R., Willassen, N.P., & Sylte, I. (2006).
Comparative Sequence and Structure Analysis Reveal Features of Cold Adaptation of an Enzyme in the Thermolysin Family. Proteins 62, 435-449.

Agafonov, D.E., Rabe, K.S., Grote, M., Huang, Y., & Sprinzl, M. (2005).
The Esterase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* as a Reporter Enzyme and Affinity Tag for Protein Biosynthesis. FEBS letters 579, 2082-2086.

Akoh, C.C., Lee, G.-C., Liaw, Y.-C., Huang, T.-H., & Shaw, J.-F. (2004).
Gdsl Family of Serine Esterases/Lipases. Progress in lipid research 43, 534-552.

Al Khudary, R., Venkatachalam, R., Katzer, M., Elleuche, S., & Antranikian, G. (2010).
A Cold-Adapted Esterase of a Novel Marine Isolate, *Pseudoalteromonas arctica*: Gene Cloning, Enzyme Purification and Characterization. Extremophiles 14, 273-285.

Alawieh, N. (2012).
Biochemische und genetische Studien mit Wärme- Und Kälte-Adaptierten Bakteriellen Lipasen. Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität.

Alquati, C., De Gioia, L., Santarossa, G., Alberghina, L., Fantucci, P., & Lotti, M. (2002).
The Cold-Active Lipase of *Pseudomonas fragi*. European journal of biochemistry 269, 3321-3328.

Altermark, B., Niiranen, L., Willassen, N.P., Smalas, A.O., & Moe, E. (2007).
Comparative Studies of Endonuclease I from Cold-Adapted *Vibrio salmonicida* and Mesophilic *Vibrio cholerae*. FEBS journal 274, 252-263.

Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. (1990).
Basic Local Alignment Search Tool. Journal of molecular biology 215, 403 - 410.

Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., & White, F.H. (1961).
The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease During Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 47, 1309-1314.

Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K., & Gershenson, A. (2001).
How Enzymes Adapt: Lessons from Directed Evolution. Trends in biochemical science 26, 100-106.

Arpigny, J.L., Feller, G., & Gerday, C. (1993).
Cloning, Sequence and Structural Features of a Lipase from the Antarctic Facultative Psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10. Biochimica et biophysica acta 23, 331-333.

Arpigny, J.L., & Jaeger, K.E. (1999).
Bacterial Lipolytic Enzymes: Classification and Properties. The biochemical journal 343, 177-183.

Arpigny, J.L., Lamotte, J., & Gerday, C. (1997).
Molecular Adaptation to Cold of an Antarctic Bacterial Lipase. Journal of molecular catalysis b: enzymatic 3, 29-35.

Atomi, H., & Imanaka, T. (2004).
Thermostable Carboxylesterases from Hyperthermophiles. Tetrahedron: Asymmetry 15, 2729-2735.

Aurilia, V., Parracino, A., Saviano, M., Rossi, M., & D'Auria, S. (2007).
The Psychrophilic Bacterium Pseudoalteromonas Halosplanktis Tac125 Possesses a Gene Coding for a Cold-Adapted Feruloyl Esterase Activity That Shares Homology with Esterase Enzymes from Gamma-Proteobacteria and Yeast. Gene 397, 51-57.

Bae, E., & Phillips, G.N. (2004).
Structures and Analysis of Highly Homologous Psychrophilic, Mesophilic, and Thermophilic Adenylate Kinases. Journal of biological chemistry 279, 28202-28208.

Bahar, I., Lezon, T.R., Yang, L.W., & Eyal, E. (2010).
Global Dynamics of Proteins: Bridging between Structure and Function. Annual reviews of biophysics 39, 23-42.

Balasco, N., Esposito, L., De Simone, A., & Vitagliano, L. (2013).
Role of Loops Connecting Secondary Structure Elements in the Stabilization of Proteins Isolated from Thermophilic Organisms. Protein science 22, 1016-1023.

Baldwin, R.L. (1986).
Temperature Dependence of the Hydrophobic Interaction in Protein Folding. Proceedings of the National Academy of Sciences 83, 8069-8072.

Barth, S., Fischer, M., Schmid, R.D., & Pleiss, J. (2004a).
The Database of Epoxide Hydrolases and Haloalkane Dehalogenases: One Structure, Many Functions. Bioinformatics 20, 2845-2847.

Barth, S., Fischer, M., Schmid, R.D., & Pleiss, J. (2004b).
Sequence and Structure of Epoxide Hydrolases: A Systematic Analysis. Proteins 55, 846-855.

Basu, S., & Sen, S. (2009).
Turning a Mesophilic Protein into a Thermophilic One: A Computational Approach Based on 3d Structural Features. Journal of chemical information and modelling 49, 1741-1750.

Bell, G.S., Russell, R.J.M., Connaris, H., Hough, D.W., Danson, M.J., & Taylor, G.L. (2002).
Stepwise Adaptations of Citrate Synthase to Survival at Life's Extremes. European journal of biochemistry 269, 6250-6260.

Benkert, P., Kunzli, M., & Schwede, T. (2009).
Qmean Server for Protein Model Quality Estimation. Nucleic acids research 37, 8.

Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., & Bourne, P.E. (2000).
The Protein Data Bank. Nucleic acids research 28, 235-242.

Boersma, Y.L., Pijning, T., Bosma, M.S., van der Sloot, A.M., Godinho, L.F., Droge, M.J., Winter, R.T., van Pouderoyen, G., Dijkstra, B.W., & Quax, W.J. (2008).
Loop Grafting of *Bacillus subtilis* Lipase A: Inversion of Enantioselectivity. Chemistry and biology 15, 782-789.

Bornscheuer, U.T. (2002).
Microbial Carboxyl Esterases: Classification, Properties and Application in Biocatalysis. FEMS Microbiology reviews 26, 73-81.

Bornscheuer, U.T., & Kazlauskas, R.J. (2006).
Lipases and Esterases: Sections 5.3 - 5.4. In Hydrolases in Organic Synthesis (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 141-183.

Bradford, M.M. (1976).
A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical biochemistry 72, 248-254.

Breezee, J., Cady, N., & Staley, J.T. (2004).
Subfreezing Growth of the Sea Ice Bacterium "*Psychromonas ingrahamii*". Microbial ecology 47, 300-304.

Brett, P.J., DeShazer, D., & Woods, D.E. (1998).
Note: *Burkholderia thailandensis* Sp. Nov., a Burkholderia Pseudomallei-Like Species. International journal of systematic bacteriology 48, 317-320.

Brock, T.D., & Freeze, H. (1969). Thermus Aquaticus Gen. N. And Sp. N., a Nonsporulating Extreme Thermophile. Journal of bacteriology 98, 289-297.

Bruins, M.E., Janssen, A.E., & Boom, R.M. (2001).
Thermozymes and Their Applications: A Review of Recent Literature and Patents. Applied biochemistry and biotechnology 90, 155-186.

Bugg, T.D. (2004).
Diverse Catalytic Activities in the Alphabeta-Hydrolase Family of Enzymes: Activation of H2o, Hcn, H2o2, and O2. Bioorganic chemistry 32, 367-375.

Caetano-Anolles, G., Wang, M., Caetano-Anolles, D., & Mittenthal, J.E. (2009).
The Origin, Evolution and Structure of the Protein World. The biochemical journal 417, 621-637.

Carugo, O. (2003).
How Root-Mean-Square Distance (R.M.S.D.) Values Depend on the Resolution of Protein Structures That Are Compared. Journal of applied crystallography 36, 125-128.

Casanueva, A., Tuffin, M., Cary, C., & Cowan, D.A. (2010).
Molecular Adaptations to Psychrophily: The Impact of 'Omic' Technologies. Trends in microbiology 18, 374-381.

Cavicchioli, R. (2002).
Extremophiles and the Search for Extraterrestrial Life. Astrobiology 2, 281-292.

Cavicchioli, R., Siddiqui, K.S., Andrews, D., & Sowers, K.R. (2002).
Low-Temperature Extremophiles and Their Applications. Current opinion in biotechnology 13, 253-261.

Chahinian, H., Ali, Y.B., Abousalham, A., Petry, S., Mandrich, L., Manco, G., Canaan, S., & Sarda, L. (2005).
Substrate Specificity and Kinetic Properties of Enzymes Belonging to the Hormone-Sensitive Lipase Family: Comparison with Non-Lipolytic and Lipolytic Carboxylesterases. Biochimica et biophysica acta 1738, 29-36.

Chahinian, H., Nini, L., Boitard, E., Dubès, J.-P., Comeau, L.-C., & Sarda, L. (2002).
Distinction between Esterases and Lipases: A Kinetic Study with Vinyl Esters and Tag. Lipids 37, 653-662.

Chakravorty, D., Parameswaran, S., Dubey, V.K., & Patra, S. (2011).
In Silico Characterization of Thermostable Lipases. Extremophiles 15, 89-103.

Charlier, D., & Droogmans, L. (2005).
Microbial Life at High Temperature, the Challenges, the Strategies. Cellular and molecular life sciences 62, 2974-2984.

Choi, Y., Agarwal, S., & Deane, C.M. (2013).
How Long Is a Piece of Loop? PeerJ 12.

Choo, D.-W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K., & Esaki, N. (1998).
A Cold-Adapted Lipase of an Alaskan Psychrotroph,*Pseudomonas sp*. Strain B11-1: Gene Cloning and Enzyme Purification and Characterization. Applied and environmental microbiology 64, 486-491.

Cieśliński, H., Białkowska, A., Długołęcka, A., Daroch, M., Tkaczuk, K., Kalinowska, H., Kur, J., & Turkiewicz, M. (2007).
A Cold-Adapted Esterase from Psychrotrophic *Pseudoalteromas sp.* Strain 643a. Arch Microbiol 188, 27-36.

Clark, E.D.B. (2001).
Protein Refolding for Industrial Processes. Current opinion in biotechnology 12, 202-207.

Collinet, B., Garcia, P., Minard, P., & Desmadril, M. (2001).
Role of Loops in the Folding and Stability of Yeast Phosphoglycerate Kinase. European journal of biochemistry 268, 5107-5118.

Collins, T., Meuwis, M.A., Gerday, C., & Feller, G. (2003).
Activity, Stability and Flexibility in Glycosidases Adapted to Extreme Thermal Environments. Journal of molecular biology 328, 419-428.

Cowan, D.A. (2004).
The Upper Temperature for Life Where Do We Draw the Line? Trends in microbiology 12, 58-60.

D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G., & Gerday, C. (2006).
Psychrophilic Microorganisms: Challenges for Life. EMBO reports 7, 385-389.

D'Amico, S., Marx, J.-C., Gerday, C., & Feller, G. (2003).
Activity-Stability Relationships in Extremophilic Enzymes. Journal of biological chemistry 278, 7891-7896.

Darland, G., & Brock, T.D. (1971).
Bacillus acidocaldarius sp.nov., an Acidophilic Thermophilic Spore-Forming Bacterium. Journal of general microbiology 67, 9-15.

de los Rios, A., Grube, M., Sancho, L.G., & Ascaso, C. (2007).
Ultrastructural and Genetic Characteristics of Endolithic Cyanobacterial Biofilms Colonizing Antarctic Granite Rocks. FEMS microbiology ecology 59, 386-395.

de Miguel Bouzas, T., Barros-Velazquez, J., & Villa, T.G. (2006).
Industrial Applications of Hyperthermophilic Enzymes: A Review. Protein and peptide letters 13, 645-651.

De Simone, G., Galdiero, S., Manco, G., Lang, D., Rossi, M., & Pedone, C. (2000).
A Snapshot of a Transition State Analogue of a Novel Thermophilic Esterase Belonging to the Subfamily of Mammalian Hormone-Sensitive Lipase. Journal of molecular biology 303, 761-771.

De Simone, G., Menchise, V., Manco, G., Mandrich, L., Sorrentino, N., Lang, D., Rossi, M., & Pedone, C. (2001).
The Crystal Structure of a Hyper-Thermophilic Carboxylesterase from the Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. Journal of molecular biology 314, 507-518.

De Vendittis, E., Castellano, I., Cotugno, R., Ruocco, M.R., Raimo, G., & Masullo, M. (2008).
Adaptation of Model Proteins from Cold to Hot Environments Involves Continuous and Small Adjustments of Average Parameters Related to Amino Acid Composition. Journal of theoretical biology 250, 156-171.

Deber, C.M., & Brodsky, B. (2001).
Proline Residues in Proteins. In Els (John Wiley & Sons, Ltd).

Del Vecchio, P., Graziano, G., Granata, V., Barone, G., Mandrich, L., Manco, G., & Rossi, M. (2001).
Temperature- and Denaturant-Induced Unfolding of Two Thermophilic Esterases. Biochemistry 41, 1364-1371.

Deming, J.W. (2002).
Psychrophiles and Polar Regions. Current opinion in microbiology 5, 301-309.

Demirjian, D.C., Morís-Varas, F., & Cassidy, C.S. (2001).
Enzymes from Extremophiles. Current opinion in chemical biology 5, 144-151.

Dill, K.A. (1990).
Dominant Forces in Protein Folding. Biochemistry 29, 7133-7155.

Divakar, S., & Manohar, B. (2007).
Use of Lipases in the Industrial Production of Esters. In Industrial Enzymes. J. Polaina, and A. MacCabe, eds. (Springer Netherlands), pp. 283-300.

Dyrløv Bendtsen, J., Nielsen, H., von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). I
mproved Prediction of Signal Peptides: Signalp 3.0. Journal of molecular biology 340, 783-795.

Dyson, H.J., Wright, P.E., & Scheraga, H.A. (2006).
The Role of Hydrophobic Interactions in Initiation and Propagation of Protein Folding. Proceedings of the National Academy of Sciences 103, 13057-13061.

Eiberle, M.K., & Jungbauer, A. (2010).
Technical Refolding of Proteins: Do We Have Freedom to Operate? Biotechnology journal 5, 547-559.

Eijsink, V.G., Gaseidnes, S., Borchert, T.V., & van den Burg, B. (2005).
Directed Evolution of Enzyme Stability. Biomolecular engineering 22, 21-30.

Eijsink, V.G., Veltman, O.R., Aukema, W., Vriend, G., & Venema, G. (1995).
Structural Determinants of the Stability of Thermolysin-Like Proteinases. Nature structural biology 2, 374-379.

Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.-y., Pieper, U., & Sali, A. (2001).
Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. In Current Protocols in Protein Science (John Wiley & Sons, Inc.).

Feller, G. (2010).
Protein Stability and Enzyme Activity at Extreme Biological Temperatures. Journal of physics. Condensed matter 22, 8953-8984.

Feller, G. (2013).
Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology. Scientifica 2013, 28.

Feller, G., & Gerday, C. (1997).
Psychrophilic Enzymes: Molecular Basis of Cold Adaptation. Cellular and molecular life sciences 53, 830-841.

Feller, G., & Gerday, C. (2003).
Psychrophilic Enzymes: Hot Topics in Cold Adaptation. Nature reviews. Microbiology 1, 200-208.

Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J.L., Aittaleb, M., Baise, E., Genicot, S., & Gerday, C. (1996).
Enzymes from Psychrophilic Organisms. FEMS microbiology reviews 18, 189-202.

Fernandez-Fuentes, N., Querol, E., Aviles, F.X., Sternberg, M.J.E., & Oliva, B. (2005).
Prediction of the Conformation and Geometry of Loops in Globular Proteins: Testing Archdb, a Structural Classification of Loops. Proteins 60, 746-757.

Fields, P.A., & Somero, G.N. (1998).
Hot Spots in Cold Adaptation: Localized Increases in Conformational Flexibility in Lactate Dehydrogenase A4 Orthologs of Antarctic Notothenioid Fishes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 11476-11481.

Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E.L.L., Eddy, S.R., & Bateman, A. (2010).
The Pfam Protein Families Database. Nucleic acids research 38, D211-D222.

Fitzpatrick, A.W., Knowles, T.P., Waudby, C.A., Vendruscolo, M., & Dobson, C.M. (2011).
Inversion of the Balance between Hydrophobic and Hydrogen Bonding Interactions in Protein Folding and Aggregation. PLoS computational biology 7, 13.

Foglia, F., Mandrich, L., Pezzullo, M., Graziano, G., Barone, G., Rossi, M., Manco, G., & Del Vecchio, P. (2007).
Role of the N-Terminal Region for the Conformational Stability of Esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Biophysical chemistry 127, 113-122.

Frydman, J. (2001).
Folding of Newly Translated Proteins in Vivo: The Role of Molecular Chaperones. Annual review of biochemistry 70, 603-647.

Fucinos, P., Abadin, C.M., Sanroman, A., Longo, M.A., Pastrana, L., & Rua, M.L. (2005).
Identification of Extracellular Lipases/Esterases Produced by *Thermus thermophilus* Hb27: Partial Purification and Preliminary Biochemical Characterisation. Journal of biotechnology 117, 233-241.

Fucinos, P., Gonzalez, R., Atanes, E., Sestelo, A.B., Perez-Guerra, N., Pastrana, L., & Rua, M.L. (2012).
Lipases and Esterases from Extremophiles: Overview and Case Example of the Production and Purification of an Esterase from *Thermus thermophilus* Hb27. Methods in molecular biology 861, 239-266.

Gao, R., Feng, Y., Ishikawa, K., Ishida, H., Ando, S., Kosugi, Y., & Cao, S. (2003).
Cloning, Purification and Properties of a Hyperthermophilic Esterase from Archaeon *Aeropyrum pernix* K1. Journal of molecular catalysis B: enzymatic 24–25, 1-8.

Gåseidnes, S., Synstad, B., Jia, X., Kjellesvik, H., Vriend, G., & Eijsink, V.G.H. (2003).
Stabilization of a Chitinase from *Serratia marcescens* by Gly→Ala and Xxx→Pro Mutations. Protein engineering 16, 841-846.

Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J.C., Sonan, G., Feller, G., & Gerday, C. (2004).
Some Like It Cold: Biocatalysis at Low Temperatures. FEMS microbiology reviews 28, 25-42.

Georlette, D., Damien, B., Blaise, V., Depiereux, E., Uversky, V.N., Gerday, C., & Feller, G. (2003).
Structural and Functional Adaptations to Extreme Temperatures in Psychrophilic, Mesophilic, and Thermophilic DNA Ligases. Journal of biological chemistry 278, 37015-37023.

Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J.L., Baise, E., Chessa, J.-P., Garsoux, G., Petrescu, I., & Feller, G. (1997).
Psychrophilic Enzymes: A Thermodynamic Challenge. Biochimica et biophysica acta 1342, 119-131.

Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georlette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A., & Feller, G. (2000).
Cold-Adapted Enzymes: From Fundamentals to Biotechnology. Trends in biotechnology 18, 103-107.

Gherardini, P.F., & Helmer-Citterich, M. (2008).
Structure-Based Function Prediction: Approaches and Applications. Briefings in functional genomics & proteomics 7, 291-302.

Gianese, G., Bossa, F., & Pascarella, S. (2002).
Comparative Structural Analysis of Psychrophilic and Meso- and Thermophilic Enzymes. Proteins 47, 236-249.

Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P.-O., & Arnold, F.H. (1998).
Directed Evolution of a Thermostable Esterase. Proceedings of the National Academy of Sciences 95, 12809-12813.

Glasner, M.E., Gerlt, J.A., & Babbitt, P.C. (2006).
Evolution of Enzyme Superfamilies. Current opinion in chemical biology 10, 492-497.

Goldstein, R.A. (2007).
Amino-Acid Interactions in Psychrophiles, Mesophiles, Thermophiles, and Hyperthermophiles: Insights from the Quasi-Chemical Approximation. Protein science 16, 1887-1895.

Gomes, J., & Steiner, W. (2004).
The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. Food technology and biotechnology 42, 223–235.

Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B.M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H.W., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., Kim, S.H., Rao, Z., Shi, Y., Terwilliger, T.C., Kim, C.Y., Hung, L.W., Waldo, G.S., Peleg, Y., Albeck, S., Unger, T., Dym, O., Prilusky, J., Sussman, J.L., Stevens, R.C., Lesley, S.A., Wilson, I.A., Joachimiak, A., Collart, F., Dementieva, I., Donnelly, M.I., Eschenfeldt, W.H., Kim, Y., Stols, L., Wu, R., Zhou, M., Burley, S.K., Emtage, J.S., Sauder, J.M., Thompson, D., Bain, K., Luz, J., Gheyi, T., Zhang, F., Atwell, S., Almo, S.C., Bonanno, J.B., Fiser, A., Swaminathan, S., Studier, F.W., Chance, M.R., Sali, A., Acton, T.B., Xiao, R., Zhao, L., Ma, L.C.,Hunt,

J.F., Tong, L., Cunningham, K., Inouye, M., Anderson, S., Janjua, H., Shastry, R., Ho, C.K., Wang, D., Wang, H., Jiang, M., Montelione, G.T., Stuart, D.I., Owens, R.J., Daenke, S., Schutz, A., Heinemann, U., Yokoyama, S., Bussow, K., & Gunsalus, K.C. (2008).
Protein Production and Purification. Nature methods 5, 135-146.

Gruebele, M. (2002).
Protein Folding: The Free Energy Surface. Current opinion in structural biology 12, 161-168.

Guex, N., & Peitsch, M.C. (1997). S
wiss-Model and the Swiss-Pdbviewer: An Environment for Comparative Protein Modeling. Electrophoresis 18, 2714-2723.

Guillaume, B., François, S., Yves, H., François, L., & Nicolas, D. (2012).
Isolation and Characterization of Estc, a New Cold-Active Esterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). PLoS one 7.

Gutteridge, A., & Thornton, J.M. (2005).
Understanding Nature's Catalytic Toolkit. Trends in biochemical sciences 30, 622-629.

Haki, G.D., & Rakshit, S.K. (2003).
Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review. Bioresource technology 89, 17-34.

Hall, T.A. (1999).
Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/Nt. Nucleic acids symposium series 41, 95-98.

Hanahan, D. (1983).
Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. J Mol Biol 166, 557-580.

Hartl, F.U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011).
Molecular Chaperones in Protein Folding and Proteostasis. Nature 475, 324-332.

Hausmann, S., & Jaeger, K.E. (2010).
Lipolytic Enzymes from Bacteria. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. Timmis, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1099-1126.

Hefti, M.H., Van Vugt-Van der Toorn, C.J., Dixon, R., & Vervoort, J. (2001).
A Novel Purification Method for Histidine-Tagged Proteins Containing a Thrombin Cleavage Site. Analytical biochemistry 295, 180-185.

Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C., & Ollis, D.L. (1999).
Of Barn Owls and Bankers: A Lush Variety of A/B Hydrolases. Structure 7, R141-R146.

Hemilae, H., Koivula, T.T., & Palva, I. (1994).
Hormone-Sensitive Lipase Is Closely Related to Several Bacterial Proteins, and Distantly Related to Acetylcholinesterase and Lipoprotein Lipase: Identification of a Superfamily of Esterases and Lipases. Biochimica et biophysica acta 3, 249-253.

Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., & Lindahl, E. (2008a).
Gromacs 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. Journal of chemical theory and computation 4, 435-447.

Hess, M. (2008).
Thermoacidophilic Proteins for Biofuel Production. Trends in microbiology 16, 414-419.

Hills, G. (2003).
Industrial Use of Lipases to Produce Fatty Acid Esters. European journal of lipid science and technology 105, 601-607.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., & Pease, L.R. (1989).
Site-Directed Mutagenesis by Overlap Extension Using the Polymerase Chain Reaction. Gene 77, 51-59.

Holmquist, M. (2000).
Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms. Current protein and peptide science 1, 209-235.

Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H., & Imanaka, T. (2002).
Extremely Stable and Versatile Carboxylesterase from a Hyperthermophilic Archaeon. Applied and environmental microbiology 68, 3925-3931.

Huang, S.-L., Wu, L.-C., Liang, H.-K., Pan, K.-T., Horng, J.-T., & Ko, M.-T. (2004).
Pgtdb: A Database Providing Growth Temperatures of Prokaryotes. Bioinformatics 20, 276-278.

Huang, Y., Humenik, M., & Sprinzl, M. (2007).
Esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* as a Reporter and Affinity Tag for Expression and Single Step Purification of Polypeptides. Protein expression and purification 54, 94-100.

Huber, R., Stotters, P., Cheminee, J.L., Richnow, H.H., & Stetter, K.O. (1990).
Hyperthermophilic Archaebacteria within the Crater and Open-Sea Plume of Erupting Macdonald Seamount. Nature 345, 179-182.

Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., Apweiler, R., Attwood, T.K., Bateman, A., Bernard, T., Binns, D., Bork, P., Burge, S., de Castro, E., Coggill, P., Corbett, M., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R.D., Fraser, M., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Kahn, D., Kelly, E., Letunic, I., Lonsdale, D., Lopez, R., Madera, M., Maslen, J., McAnulla, C., McDowall, J., McMenamin, C., Mi, H., Mutowo-Muellenet, P., Mulder, N., Natale, D., Orengo, C., Pesseat, S., Punta, M., Quinn, A.F., Rivoire, C., Sangrador-Vegas, A., Selengut, J.D., Sigrist, C.J.A., Scheremetjew, M., Tate, J., Thimmajanarthanan, M., Thomas, P.D., Wu, C.H., Yeats, C., & Yong, S.-Y. (2012).
Interpro in 2011: New Developments in the Family and Domain Prediction Database. Nucleic acids research 40, D306-D312.

Huston, A. (2008).
Biotechnological Aspects of Cold-Adapted Enzymes. In Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology. R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, and C. Gerday, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 347-363.

Hynes, W., Johnson, C., & Stokes, M. (2009).
A Single Nucleotide Mutation Results in Loss of Enzymatic Activity in the Hyaluronate Lyase Gene of *Streptococcus pyogenes*. Microbial pathogenesis 47, 308-313.

Ikeda, M., & Clark, D.S. (1998).
Molecular Cloning of Extremely Thermostable Esterase Gene from Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* in Escherichia Coli. Biotechnology and bioengineering 57, 624-629.

Imanaka, T. (2011).
Molecular Bases of Thermophily in Hyperthermophiles. Physical and biological sciences 87, 587-602.

Jaeger, K.-E., & Eggert, T. (2002).
Lipases for Biotechnology. Current opinion in biotechnology 13, 390-397.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., & Reetz, M.T. (1999).
Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. Annual review of microbiology 53, 315-351.

Jaeger, K.E., & Reetz, M.T. (1998).
Microbial Lipases Form Versatile Tools for Biotechnology. Trends in biotechnology 16, 396-403.

Jaenicke, R. (2000).
Do Ultrastable Proteins from Hyperthermophiles Have High or Low Conformational Rigidity? Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 2962-2964.

Jang, H.J., Lee, C.H., Lee, W., & Kim, Y.S. (2002).
Two Flexible Loops in Subtilisin-Like Thermophilic Protease, Thermicin, from *Thermoanaerobacter yonseiensis*. Journal of biochemistry and molecular biology 35, 498-507.

Jaroszewski, L., Godzik, A., & Rychlewski, L. (2000).
Improving the Quality of Twilight-Zone Alignments. Protein Science 9, 1487-1496.

Jaroszewski, L., Li, W., & Godzik, A. (2002).
In Search for More Accurate Alignments in the Twilight Zone. Protein Science 11, 1702-1713.

Jochens, H., Hesseler, M., Stiba, K., Padhi, S.K., Kazlauskas, R.J., & Bornscheuer, U.T. (2011).
Protein Engineering of Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes. European journal of chemical biology 12, 1508-1517.

Johns, G.C., & Somero, G.N. (2004).
Evolutionary Convergence in Adaptation of Proteins to Temperature: A4-Lactate Dehydrogenases of Pacific Damselfishes (*Chromis spp*.). Molecular biology and evolution 21, 314-320.

Jones, T., Gill, C.O., & McMullen, L.M. (2004).
The Behaviour of Log Phase Escherichia Coli at Temperatures That Fluctuate About the Minimum for Growth. Letters in applied microbiology 39, 296-300.

Joseph, B., Ramteke, P.W., & Thomas, G. (2008).
Cold Active Microbial Lipases: Some Hot Issues and Recent Developments. Biotechnology advances 26, 457-470.

Joshi, G.K., Kumar, S., Tripathi, B.N., & Sharma, V. (2006).
Production of Alkaline Lipase by *Corynebacterium paurometabolum*, Mtcc 6841 Isolated from Lake Naukuchiatal, Uttaranchal State, India. Current microbiology 52, 354-358.

Jungbauer, A., & Kaar, W. (2007).
Current Status of Technical Protein Refolding. Journal of biotechnology 128, 587-596.

Kabsch, W. (1976).
A Solution for the Best Rotation to Relate Two Sets of Vectors. Acta crystallographica section A 32, 922-923.

Kabsch, W. (1978).
A Discussion of the Solution for the Best Rotation to Relate Two Sets of Vectors. Acta crystallographica section A 34, 827-828.

Karplus, M., & Kuriyan, J. (2005).
Molecular Dynamics and Protein Function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 6679-6685.

Karplus, M., & McCammon, J.A. (2002).
Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules. Nature structural biology 9, 646-652.

Khalameyzer, V., Fischer, I., Bornscheuer, U.T., & Altenbuchner, J. (1999).
Screening, Nucleotide Sequence, and Biochemical Characterization of an Esterase from *Pseudomonas fluorescens* with High Activity Towards Lactones. Applied and environmental microbiology 65, 477-482.

Khemakhem, B., Ali, M.B., Aghajari, N., Juy, M., Haser, R., & Bejar, S. (2009).
The Importance of an Extra Loop in the B-Domain of an A-Amylase from *B. stearothermophilus* Us100. Biochemical and biophysical research communications 385, 78-83.

Kim, E.-K., Moon, J.C., Lee, J.M., Jeong, M.S., Oh, C., Ahn, S.-M., Yoo, Y.J., & Jang, H.H. (2012).
Large-Scale Production of Soluble Recombinant Amyloid-B Peptide 1–42 Using Cold-Inducible Expression System. Protein expression and purification 86, 53-57.

Kim, Y.-O., Park, I.-S., Kim, H.-K., Nam, B.-H., Kong, H., Kim, W.-J., Kim, D.-G., Kim, B.-S., Jee, Y.-J., Song, J.-H., & Lee, S.-J. (2013).
Shewanella sp. Ke75 Esterase with Specificity for P-Nitorphenyl Butyrate: Gene Cloning and Characterization. J Korean Soc Appl Biol Chem 56, 55-62.

Kocher, J.-P., Prévost, M., Wodak, S.J., & Lee, B. (1996).
Properties of the Protein Matrix Revealed by the Free Energy of Cavity Formation. Structure 4, 1517-1529.

Koonin, E.V., Wolf, Y.I., & Karev, G.P. (2002).
The Structure of the Protein Universe and Genome Evolution. Nature 420, 218-223.

Kourist, R., & Bornscheuer, U.T. (2011).
Biocatalytic Synthesis of Optically Active Tertiary Alcohols. Applied microbiology and biotechnology 91, 505-517.

Krynetski, E.Y., Schuetz, J.D., Galpin, A.J., Pui, C.H., Relling, M.V., & Evans, W.E. (1995).
A Single Point Mutation Leading to Loss of Catalytic Activity in Human Thiopurine S-Methyltransferase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 949-953.

Kulakova, L., Galkin, A., Nakayama, T., Nishino, T., & Esaki, N. (2004).
Cold-Active Esterase *from Psychrobacter sp.* Ant300: Gene Cloning, Characterization, and the Effects of Gly→Pro Substitution near the Active Site on Its Catalytic Activity and Stability. Biochimica et biophysica acta 1696, 59-65.

Kumar, S., Tsai, C.-J., & Nussinov, R. (2000).
Factors Enhancing Protein Thermostability. Protein engineering 13, 179-191.

Laemmli, U.K. (1970).
Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage *T4*. Nature 227, 680-685.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., & Thornton, J.M. (1993).
Procheck: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. Journal of applied crystallography 26, 283-291.

Laurell, H., Contreras, J.A., Castan, I., Langin, D., & Holm, C. (2000).
Analysis of the Psychrotolerant Property of Hormone-Sensitive Lipase through Site-Directed Mutagenesis. Protein engineering 13, 711-717.

Lebedinsky, A.V., Chernyh, N.A., & Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2007).
Phylogenetic Systematics of Microorganisms Inhabiting Thermal Environments. Biochemistry 72, 1299-1312.

Lee, C.K., Daniel, R.M., Shepherd, C., Saul, D., Cary, S.C., Danson, M.J., Eisenthal, R., & Peterson, M.E. (2007).
Eurythermalism and the Temperature Dependence of Enzyme Activity. FASEB journal 21, 1934-1941.

Lehmann, M., Loch, C., Middendorf, A., Studer, D., Lassen, S.F., Pasamontes, L., van Loon, A.P.G.M., & Wyss, M. (2002).
The Consensus Concept for Thermostability Engineering of Proteins: Further Proof of Concept. Protein engineering 15, 403-411.

Lehmann, M., & Wyss, M. (2001).
Engineering Proteins for Thermostability: The Use of Sequence Alignments Versus Rational Design and Directed Evolution. Current opinion in biotechnology 12, 371-375.

Leisola, M., & Turunen, O. (2007).
Protein Engineering: Opportunities and Challenges. Applied microbiology and biotechnology 75, 1225-1232.

Leščić Ašler, I., Ivić, N., Kovačić, F., Schell, S., Knorr, J., Krauss, U., Wilhelm, S., Kojić-Prodić, B., & Jaeger, K.-E. (2010).
Probing Enzyme Promiscuity of Sgnh Hydrolases. European journal of chemical biology 11, 2158-2167.

Levisson, M., Sun, L., Hendriks, S., Swinkels, P., Akveld, T., Bultema, J.B., Barendregt, A., van den Heuvel, R.H., Dijkstra, B.W., van der Oost, J., & Kengen, S.W. (2009a).
Crystal Structure and Biochemical Properties of a Novel Thermostable Esterase Containing an Immunoglobulin-Like Domain. Journal of molecular biology 385, 949-962.

Levisson, M., van der Oost, J., & Kengen, S.W. (2009b).
Carboxylic Ester Hydrolases from Hyperthermophiles. Extremophiles 13, 567-581.

Liebeton, K., Zacharias, A., & Jaeger, K.E. (2001).
Disulfide Bond in *Pseudomonas aeruginosa* Lipase Stabilizes the Structure but Is Not Required for Interaction with Its Foldase. Journal of bacteriology 183, 597-603.

Lund, P.A. (2001).
Microbial Molecular Chaperones. Advances in microbial physiology 44, 93-140.

Luo, Y., Zheng, Y., Jiang, Z., Ma, Y., & Wei, D. (2006).
A Novel Psychrophilic Lipase from *Pseudomonas fluorescens* with Unique Property in Chiral Resolution and Biodiesel Production Via Transesterification. Applied microbiology and biotechnology 73, 349-355.

Madigan, M.T., & Marrs, B.L. (1997).
Extremophiles. Sci Am 276, 82-87.

Mamonova, T.B., Glyakina, A.V., Galzitskaya, O.V., & Kurnikova, M.G. (2013).
Stability and Rigidity/Flexibility-Two Sides of the Same Coin? Biochimica et biophysica acta 5, 854-866.

Manco, G., Adinolfi, E., Pisani, F.M., Ottolina, G., Carrea, G., & Rossi, M. (1998).
Overexpression and Properties of a New Thermophilic and Thermostable Esterase from *Bacillus acidocaldarius* with Sequence Similarity to Hormone-Sensitive Lipase Subfamily. The Biochemical journal 332, 203-212.

Manco, G., Febbraio, F., Adinolfi, E., & Rossi, M. (1999).
Homology Modeling and Active-Site Residues Probing of the Thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* Esterase 2. Protein science 8, 1789-1796.

Manco, G., Giosuè, E., D'Auria, S., Herman, P., Carrea, G., & Rossi, M. (2000).
Cloning, Overexpression, and Properties of a New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to Hormone-Sensitive Lipase Subfamily from the Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. Archives of biochemistry and biophysics 373, 182-192.

Manco, G., Mandrich, L., & Rossi, M. (2001).
Residues at the Active Site of the Esterase 2 From *Alicyclobacillus acidocaldarius* Involved in Substrate Specificity and Catalytic Activity at High Temperature. Journal of biological chemistry 276, 37482-37490.

Mandrich, L., Manco, G., Rossi, M., Floris, E., Jansen-van den Bosch, T., Smit, G., & Wouters, J.A. (2006).
Alicyclobacillus acidocaldarius Thermophilic Esterase Est2's Activity in Milk and Cheese Models. Applied and environmental microbiology 72, 3191-3197.

Mandrich, L., Merone, L., & Manco, G. (2009).
Structural and Kinetic Overview of the Carboxylesterase Est2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius*: A Comparison with the Other Members of the Hsl Family. Protein and peptide letters 16, 1189-1200.

Mandrich, L., Merone, L., Pezzullo, M., Cipolla, L., Nicotra, F., Rossi, M., & Manco, G. (2005).
Role of the N Terminus in Enzyme Activity, Stability and Specificity in Thermophilic Esterases Belonging to the HSL Family. Journal of molecular biology 345, 501-512.

Mandrich, L., Pezzullo, M., Del Vecchio, P., Barone, G., Rossi, M., & Manco, G. (2004).
Analysis of Thermal Adaptation in the HSL Enzyme Family. Journal of molecular biology 335, 357-369.

Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko, M.V., Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C., & Bryant, S.H. (2011).
Cdd: A Conserved Domain Database for the Functional Annotation of Proteins. Nucleic acids research 39, D225-D229.

Margesin, R., & Miteva, V. (2011).
Diversity and Ecology of Psychrophilic Microorganisms. Research in microbiology 162, 346-361.

Margreiter, G., Messner, P., Caldwell, K.D., & Bayer, K. (2008a).
Size Characterization of Inclusion Bodies by Sedimentation Field-Flow Fractionation. Journal of biotechnology 138, 67-73.

Margreiter, G., Schwanninger, M., Bayer, K., & Obinger, C. (2008b).
Impact of Different Cultivation and Induction Regimes on the Structure of Cytosolic Inclusion Bodies of Tem1-B-Lactamase. Biotechnology journal 3, 1245-1255.

Martin, A.C., Toda, K., Stirk, H.J., & Thornton, J.M. (1995).
Long Loops in Proteins. Protein engineering 8, 1093-1101.

Martinez, R., Schwaneberg, U., & Roccatano, D. (2011).
Temperature Effects on Structure and Dynamics of the Psychrophilic Protease Subtilisin S41 and Its Thermostable Mutants in Solution. Protein engineering, design and selection 24, 533-544.

Marx, J.C., Collins, T., D'Amico, S., Feller, G., & Gerday, C. (2007).
Cold-Adapted Enzymes from Marine Antarctic Microorganisms. Marine biotechnology 9, 293-304.

Mathew, S., & Abraham, T.E. (2004).
Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in Its Release and Their Applications. Critical reviews in biotechnology 24, 59-83.

Matthews, B.W., Nicholson, H., & Becktel, W.J. (1987).
Enhanced Protein Thermostability from Site-Directed Mutations That Decrease the Entropy of Unfolding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84, 6663-6667.

Mereghetti, P., Riccardi, L., Brandsdal, B.O., Fantucci, P., De Gioia, L., & Papaleo, E. (2010).
Near Native-State Conformational Landscape of Psychrophilic and Mesophilic Enzymes: Probing the Folding Funnel Model. The journal of physical chemistry. B 114, 7609-7619.

Methe, B.A., Nelson, K.E., Deming, J.W., Momen, B., Melamud, E., Zhang, X., Moult, J., Madupu, R., Nelson, W.C., Dodson, R.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Durkin, A.S., DeBoy, R.T., Kolonay, J.F., Sullivan, S.A., Zhou, L., Davidsen, T.M., Wu, M., Huston, A.L., Lewis, M., Weaver, B., Weidman, J.F., Khouri, H., Utterback, T.R., Feldblyum, T.V., & Fraser, C.M. (2005).
The Psychrophilic Lifestyle as Revealed by the Genome Sequence of Colwellia Psychrerythraea 34h through Genomic and Proteomic Analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 10913-10918.

Metpally, R.P., & Reddy, B.V. (2009).
Comparative Proteome Analysis of Psychrophilic Versus Mesophilic Bacterial Species: Insights into the Molecular Basis of Cold Adaptation of Proteins. BMC Genomics 10, 1471-2164.

Miled, N., Bussetta, C., De caro, A., Rivière, M., Berti, L., & Canaan, S. (2003).
Importance of the Lid and Cap Domains for the Catalytic Activity of Gastric Lipases. Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry and molecular biology 136, 131-138.

Miyake, R., Kawamoto, J., Wei, Y.L., Kitagawa, M., Kato, I., Kurihara, T., & Esaki, N. (2007).
Construction of a Low-Temperature Protein Expression System Using a Cold-Adapted Bacterium, *Shewanella sp.* Strain Ac10, as the Host. Applied and environmental microbiology 73, 4849-4856.

Morita, R.Y. (1975).
Psychrophilic Bacteria. Bacteriological reviews 39, 144-167.

Muslin, E.H., Clark, S.E., & Henson, C.A. (2002).
The Effect of Proline Insertions on the Thermostability of a Barley Alpha-Glucosidase. Protein engineering, design and selection 15, 29-33.

Nagi, A.D., & Regan, L. (1997).
An Inverse Correlation between Loop Length and Stability in a Four-Helix-Bundle Protein. Folding and design 2, 67-75.

Nam, K.H., Kim, M.Y., Kim, S.J., Priyadarshi, A., Lee, W.H., & Hwang, K.Y. (2009).
Structural and Functional Analysis of a Novel Este5 Belonging to the Subfamily of Hormone-Sensitive Lipase. Biochemical and biophysical research communications 379, 553-556.

Nardini, M., & Dijkstra, B.W. (1999).
A/B Hydrolase Fold Enzymes: The Family Keeps Growing. Current opinion in structural biology 9, 732-737.

Nayeem, A., Sitkoff, D., & Krystek, S. (2006).
A Comparative Study of Available Software for High-Accuracy Homology Modeling: From Sequence Alignments to Structural Models. Protein science 15, 808-824.

Nixon, A.E., & Firestine, S.M. (2000).
Rational and "Irrational" Design of Proteins and Their Use in Biotechnology. IUBMB life 49, 181-187.

Ollis, D., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S., Harel, M., Remington, S., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J., Verschueren, K., & Goldman, A. (1992).
The Alpha/Beta Hydrolase Fold. Protein engineering 5, 197 - 211.

Olufsen, M., Smalas, A.O., Moe, E., & Brandsdal, B.O. (2005).
Increased Flexibility as a Strategy for Cold Adaptation: A Comparative Molecular Dynamics Study of Cold- and Warm-Active Uracil DNA Glycosylase. The Journal of biological chemistry 280, 18042-18048.

Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A.E., & van Gunsteren, W.F. (2004).
A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The Gromos Force-Field Parameter Sets 53a5 and 53a6. Journal of computational chemistry 25, 1656-1676.

Pace, C.N., Fu, H., Fryar, K.L., Landua, J., Trevino, S.R., Shirley, B.A., Hendricks, M.M., Iimura, S., Gajiwala, K., Scholtz, J.M., & Grimsley, G.R. (2011).
Contribution of Hydrophobic Interactions to Protein Stability. Journal of molecular biology 408, 514-528.

Pagani, I., Liolios, K., Jansson, J., Chen, I.-M.A., Smirnova, T., Nosrat, B., Markowitz, V.M., & Kyrpides, N.C. (2012).
The Genomes Online Database (Gold) V.4: Status of Genomic and Metagenomic Projects and Their Associated Metadata. Nucleic acids research 40, D571-D579.

Pal, M., & Dasgupta, S. (2003).
The Nature of the Turn in Omega Loops of Proteins. Proteins 51, 591-606.

Paredes, D.I., Watters, K., Pitman, D.J., Bystroff, C., & Dordick, J.S. (2011).
Comparative Void-Volume Analysis of Psychrophilic and Mesophilic Enzymes: Structural Bioinformatics of Psychrophilic Enzymes Reveals Sources of Core Flexibility. BMC structural biology 11, 42.

Pezzullo, M., Del Vecchio, P., Mandrich, L., Nucci, R., Rossi, M., & Manco, G. (2013).
Comprehensive Analysis of Surface Charged Residues Involved in Thermal Stability in *Alicyclobacillus acidocaldarius* Esterase 2. Protein engineering, design and selection 26, 47-58.

Pikuta, E.V., Hoover, R.B., & Tang, J. (2007).
Microbial Extremophiles at the Limits of Life. Critical reviews in microbiology 33, 183-209.

Prajapati, R.S., Das, M., Sreeramulu, S., Sirajuddin, M., Srinivasan, S., Krishnamurthy, V., Ranjani, R., Ramakrishnan, C., & Varadarajan, R. (2007).
Thermodynamic Effects of Proline Introduction on Protein Stability. Proteins 66, 480-491.

Quax, W.J., & Broekhuizen, C.P. (1994).
Development of a New Bacillus Carboxyl Esterase for Use in the Resolution of Chiral Drugs. Applied microbiology and biotechnology 41, 425-431.

Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., & Imanaka, T. (2001).
Low-Temperature Lipase from Psychrotrophic *Pseudomonas sp*. Strain Kb700a. Applied and environmental microbiology 67, 4064-4069.

Ratcliff, K., Corn, J., & Marqusee, S. (2009).
Structure, Stability, and Folding of Ribonuclease H1 from the Moderately Thermophilic *Chlorobium tepidum*: Comparison with Thermophilic and Mesophilic Homologues. Biochemistry 48, 5890-5898.

Reiter, B., Glieder, A., Talker, D., & Schwab, H. (2000).
Cloning and Characterization of EstC from *Burkholderia gladioli*, a Novel-Type Esterase Related to Plant Enzymes. Applied microbiology and biotechnology 54, 778-785.

Roh, C., & Villatte, F. (2008).
Isolation of a Low-Temperature Adapted Lipolytic Enzyme from Uncultivated Micro-Organism. Journal of applied microbiology 105, 116-123.

Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J., & Studier, F.W. (1987).
Vectors for Selective Expression of Cloned Dnas by T7 RNA Polymerase. Gene 56, 125-135.

Rudolph, R., & Lilie, H. (1996).
In Vitro Folding of Inclusion Body Proteins. FASEB journal 10, 49-56.

Russell, R., & Barton, G. (1992).
Multiple Protein-Sequence Alignment from Tertiary Structure Comparison - Assignment of Global and Residue Confidence Levels. Proteins 14, 309 - 323.

Sælensminde, G., Halskau, Ø., Jr., & Jonassen, I. (2009).
Amino Acid Contacts in Proteins Adapted to Different Temperatures: Hydrophobic Interactions and Surface Charges Play a Key Role. Extremophiles 13, 11-20.

Salameh, M., & Wiegel, J. (2007a).
Lipases from Extremophiles and Potential for Industrial Applications. Advances in applied microbiology 61, 253-283.

Salameh, M.A., & Wiegel, J. (2007b).
Purification and Characterization of Two Highly Thermophilic Alkaline Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. Applied and environmental microbiology 73, 7725-7731.

Sambrook, J., F., F.E., & Tom, M. (1989).
Molecular Cloning : A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).

Schein, C.H. (1991).
Optimizing Protein Folding to the Native State in Bacteria. Current opinion in biotechnology 2, 746-750.

Schellman, J.A. (1997).
Temperature, Stability, and the Hydrophobic Interaction. Biophysical journal 73, 2960-2964.

Schmidt-Dannert, C., Rua, M.L., Atomi, H., & Schmid, R.D. (1996).
Thermoalkalophilic Lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular Cloning, Nucleotide Sequence, Purification and Some Properties. Biochimica et biophysica acta 31, 1-2.

Shang, Y.S., Zhang, X.E., Wang, X.D., Guo, Y.C., Zhang, Z.P., & Zhou, Y.F. (2010).
Biochemical Characterization and Mutational Improvement of a Thermophilic Esterase from *Sulfolobus solfataricus* P2. Biotechnology letters 32, 1151-1157.

Siddiqui, K.S., & Cavicchioli, R. (2006).
Cold-Adapted Enzymes. Annual review of biochemistry 75, 403-433.

Siddiqui, K.S., Poljak, A., Guilhaus, M., Feller, G., D'Amico, S., Gerday, C., & Cavicchioli, R. (2005).
Role of Disulfide Bridges in the Activity and Stability of a Cold-Active A-Amylase. Journal of bacteriology 187, 6206-6212.

Singh, S.M., & Panda, A.K. (2005).
Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. Journal of bioscience and bioengineering 99, 303-310.

Sleator, R.D. (2012).
Proteins: Form and Function. Bioengineered 3, 80-85.

Somero, G.N. (1995).
Proteins and Temperature. Annual review of physiology 57, 43-68.

Soror, S., Verma, V., Rao, R., Rasool, S., Koul, S., Qazi, G.N., & Cullum, J. (2007).
A Cold-Active Esterase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): From Genome Sequence to Enzyme Activity. Journal of industrial microbiology and biotechnology 34, 525-531.

Soror, S.H., Rao, R., & Cullum, J. (2009).
Mining the Genome Sequence for Novel Enzyme Activity: Characterisation of an Unusual Member of the Hormone-Sensitive Lipase Family of Esterases from the Genome of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Protein engineering, design and selection 22, 333-339.

Spiller, B., Gershenson, A., Arnold, F.H., & Stevens, R.C. (1999).
A Structural View of Evolutionary Divergence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 12305-12310.

Sriprapundh, D., Vieille, C., & Zeikus, J.G. (2000).
Molecular Determinants of Xylose Isomerase Thermal Stability and Activity: Analysis of Thermozymes by Site-Directed Mutagenesis. Protein engineering 13, 259-265.

Sterner, R., & Liebl, W. (2001).
Thermophilic Adaptation of Proteins. Critical reviews in biochemistry and molecular biology 36, 39-106.

Stetter, K.O. (1999).
Extremophiles and Their Adaptation to Hot Environments. FEBS letters 452, 22-25.

Steven, B., Leveille, R., Pollard, W.H., & Whyte, L.G. (2006).
Microbial Ecology and Biodiversity in Permafrost. Extremophiles 10, 259-267.

Stibal, M., Sabacka, M., & Kastovska, K. (2006).
Microbial Communities on Glacier Surfaces in Svalbard: Impact of Physical and Chemical Properties on Abundance and Structure of Cyanobacteria and Algae. Microbial ecology 52, 644-654.

Strandberg, L., & Enfors, S.O. (1991).
Factors Influencing Inclusion Body Formation in the Production of a Fused Protein in Escherichia Coli. Applied and environmental microbiology 57, 1669-1674.

Strickler, S.S., Gribenko, A.V., Keiffer, T.R., Tomlinson, J., Reihle, T., Loladze, V.V., & Makhatadze, G.I. (2006).
Protein Stability and Surface Electrostatics: A Charged Relationship. Biochemistry 45, 2761-2766.

Studier, F.W. (2005).
Protein Production by Auto-Induction in High Density Shaking Cultures. Protein expression and purification 41, 207-234.

Studier, F.W., & Moffatt, B.A. (1986).
Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. Journal of molecular biology 189, 113-130.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., & Dubendorff, J.W. (1990).
Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. Methods in enzymology 185, 60-89.

Suzuki, T., Nakayama, T., Choo, D.W., Hirano, Y., Kurihara, T., Nishino, T., & Esaki, N. (2003).
Cloning, Heterologous Expression, Renaturation, and Characterization of a Cold-Adapted Esterase with Unique Primary Structure from a Psychrotroph *Pseudomonas sp*. Strain B11-1. Protein expression and purification 30, 171-178.

Svingor, Á., Kardos, J., Hajdú, I., Németh, A., & Závodszky, P. (2001).
A Better Enzyme to Cope with Cold: Comparative Flexibility Studies on Psychrotrophic, Mesophilic, and Thermophilic Ipmdhs. Journal of biological chemistry 276, 28121-28125.

Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., & Horikoshi, K. (2008).
Cell Proliferation at 122°C and Isotopically Heavy Ch4 Production by a Hyperthermophilic Methanogen under High-Pressure Cultivation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 10949-10954.

Takeda-Shitaka, M., Takaya, D., Chiba, C., Tanaka, H., & Umeyama, H. (2004).
Protein Structure Prediction in Structure Based Drug Design. Current medicinal chemistry 11, 551-558.

Tang, M.A., Motoshima, H., & Watanabe, K. (2012).
Fluorescence Studies on the Stability, Flexibility and Substrate-Induced Conformational Changes of Acetate Kinases from Psychrophilic and Mesophilic Bacteria. The protein journal 31, 337-344.

Terpe, K. (2003).
Overview of Tag Protein Fusions: From Molecular and Biochemical Fundamentals to Commercial Systems. Applied microbiology and biotechnology 60, 523-533.

Thompson, M.J., & Eisenberg, D. (1999).
Transproteomic Evidence of a Loop-Deletion Mechanism for Enhancing Protein Thermostability. Journal of molecular biology 290, 595-604.

Thornton, J.M., Sibanda, B.L., Edwards, M.S., & Barlow, D.J. (1988).
Analysis, Design and Modification of Loop Regions in Proteins. BioEssays 8, 63-69.

Tina, K.G., Bhadra, R., & Srinivasan, N. (2007).
PIC: Protein Interactions Calculator. Nucleic acids research 35, W473-W476.

Tipton, K., & Boyce, S. (2000).
History of the Enzyme Nomenclature System. Bioinformatics 16, 34-40.

Turner, P., Mamo, G., & Karlsson, E. (2007).
Potential and Utilization of Thermophiles and Thermostable Enzymes in Biorefining. Microbial cell factories 6, 9.

Tutino, M.L., di Prisco, G., Marino, G., & de Pascale, D. (2009).
Cold-Adapted Esterases and Lipases: From Fundamentals to Application. Protein and peptide letters 16, 1172-1180.

Urban, A., Leipelt, M., Eggert, T., & Jaeger, K.E. (2001).
DsbA and DsbC Affect Extracellular Enzyme Formation in Pseudomonas Aeruginosa. Journal of bacteriology 183, 587-596.

Urfer, R., & Kirschner, K. (1992).
The Importance of Surface Loops for Stabilizing an Eightfold Beta Alpha Barrel Protein. Protein science 1, 31-45.

van den Burg, B. (2003).
Extremophiles as a Source for Novel Enzymes. Current opinion in microbiology 6, 213-218.

van den Burg, B., & Eijsink, V.G. (2002).
Selection of Mutations for Increased Protein Stability. Current opinion in biotechnology 13, 333-337.

van Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.-E., & Dijkstra, B.W. (2001).
The Crystal Structure of Bacillus Subtili Lipase: A Minimal A/B Hydrolase Fold Enzyme. Journal of molecular biology 309, 215-226.

Vera, A., González-Montalbán, N., Arís, A., & Villaverde, A. (2007).
The Conformational Quality of Insoluble Recombinant Proteins Is Enhanced at Low Growth Temperatures. Biotechnology and bioengineering 96, 1101-1106.

Vera, A., Gonzalez-Montalban, N., Garcia-Fruitos, E., Aris, A., & Villaverde, A. (2006).
Low Growth Temperatures Improve the Conformational Quality of Aggregation Prone Recombinant Proteins in Both Soluble and Insoluble *E. coli* Cell Fractions. Microbial cell factories 5, P7.

Vieille, C., & Zeikus, G.J. (1996).
Thermozymes: Identifying Molecular Determinants of Protein Structural and Functional Stability. Trends in biotechnology 14, 183-190.

Vieille, C., & Zeikus, G.J. (2001).
Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. Microbiology and molecular biology reviews 65, 1-43.

Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanpera, J., & Siika-Aho, M. (2007).
Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis. Advances in biochemical engineering/biotechnology 108, 121-145.

Virk, A.P., Sharma, P., & Capalash, N. (2011).
A New Esterase, Belonging to Hormone-Sensitive Lipase Family, Cloned from *Rheinheimera sp.* Isolated from Industrial Effluent. Journal of microbiology and biotechnology 21, 667-674.

Walton, E.B., & Vanvliet, K.J. (2006).
Equilibration of Experimentally Determined Protein Structures for Molecular Dynamics Simulation. Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics 74, 5.

Watanabe, K., Masuda, T., Ohashi, H., Mihara, H., & Suzuki, Y. (1994).
Multiple Proline Substitutions Cumulatively Thermostabilize *Bacillus cereus* Atcc7064 Oligo-1,6-Glucosidase. Irrefragable Proof Supporting the Proline Rule. European journal of biochemistry 226, 277-283.

Wei, Y.-l., Kurihara, T., Suzuki, T., & Esaki, N. (2003).
A Novel Esterase from a Psychrotrophic Bacterium, *Acinetobacter sp*. Strain No. 6, That Belongs to the Amidase Signature Family. Journal of molecular catalysis B: enzymatic 23, 357-365.

Wei, Y., Contreras, J., Sheffield, P., Osterlund, T., Derewenda, U., Kneusel, R., Matern, U., Holm, C., & Derewenda, Z. (1999).
Crystal Structure of Brefeldin a Esterase, a Bacterial Homolog of the Mammalian Hormone-Sensitive Lipase. Nature structural biology 6, 340 - 345.

Wetlaufer, D.B. (1973).
Nucleation, Rapid Folding, and Globular Intrachain Regions in Proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70, 697-701.

Widmann, M., Juhl, P.B., & Pleiss, J. (2010).
Structural Classification by the Lipase Engineering Database: A Case Study of *Candida antarctica* Lipase A. BMC Genomics 11, 123.

Wiederstein, M., & Sippl, M.J. (2007).
Prosa-Web: Interactive Web Service for the Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. Nucleic acids research 35, 21.

Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D., & Hochstrasser, D.F. (1999).
Protein Identification and Analysis Tools in the Expasy Server. Methods in molecular biology 112, 531-552.

Woycechowsky, K.J., Vamvaca, K., & Hilvert, D. (2007).
Novel Enzymes through Design and Evolution. Advances in enzymology and related areas of molecular biology 75, 241-294.

Yu, Y., Li, H., Zeng, Y., & Chen, B. (2009).
Extracellular Enzymes of Cold-Adapted Bacteria from Arctic Sea Ice, Canada Basin. Polar Biol 32, 1539-1547.

Yuan, Z., Zhao, J., & Wang, Z.-X. (2003).
Flexibility Analysis of Enzyme Active Sites by Crystallographic Temperature Factors. Protein engineering 16, 109-114.

Yuen, S.W., Chui, A.H., Wilson, K.J., & Yuan, P.M. (1989).
Microanalysis of SDS-Page Electroblotted Proteins. Biotechniques 7, 74-83.

Zhao, J.-S., Manno, D., Leggiadro, C., O'Neil, D., & Hawari, J. (2006).
Shewanella halifaxensis Sp. Nov., a Novel Obligately Respiratory and Denitrifying Psychrophile. International journal of systematic and evolutionary microbiology 56, 205-212.

Zhou, C., Xue, Y., & Ma, Y. (2010).
Enhancing the Thermostability of A-Glucosidase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* Mb4 by Single Proline Substitution. Journal of bioscience and bioengineering 110, 12-17.

Zhou, H.X. (2004).
Loops, Linkages, Rings, Catenanes, Cages, and Crowders: Entropy-Based Strategies for Stabilizing Proteins. Accounts of chemical research 37, 123-130.

Zimmer, C., Platz, T., Cadez, N., Giffhorn, F., & Kohring, G.-W. (2006).

A Cold Active (2r,3r)-(−)-Di-O-Benzoyl-Tartrate Hydrolyzing Esterase from *Rhodotorula mucilaginosa*. Applied microbiology and biotechnology 73, 132-140.

7 Anhang

Tab.7.1: Homologe lipolytische Enzyme zu Est2 mit differentem Temperatur-Ursprung

Enzym	Wirtsorganismus	Temperatur Klassifikation	UniProt ID[1]	AS[2]	Sequenz Identität (%)[3]
Esterase/Lipase	*Saccharomonospora viridis* DSM43017	thermophil	C7MQQ8	353	49
Putative Lipase	*Symbiobacterium thermophilum* IAM14863	thermophil	Q67MI3	312	47
Putative Esterase/Lipase	*Thermobifida fusca* YX	thermophil	Q47PU6	305	43
α/β-Hydrolase-Faltung Protein	*Clostridium thermocellum* JW20	thermophil	A3DEN9	311	42
α/β-Hydrolase-Faltung Protein	*Rodoferax ferrireducens* T118	pschrotroph	Q21VV3	327	38
α/β-Hydrolase-Faltung Protein	*Shewanella pealeana* ATCC 700345	pschrotroph	A8H9V4	312	38
Esterase/Lipase	*Shewanella piezotolerans* WP3	pschrotroph	B8CV73	313	37
α/β-Hydrolase-Faltung Protein	*Shewanella loihica* PV-4	psychrophil	A3QGD9	320	40
α/β-Hydrolase-Faltung Protein	*Shewanella halifaxensis* HAW –EB4	psychrophil	B0TNQ0	312	38
Esterase	*Pseudomonas sp*. B11-1	pschrotroph	O52270	308	47
Esterase	*Bacillus megaterium* DSM319	mesophil	D5DEE6	310	56
Putative Lipase/Esterase	*Brevibacillus brevis* NBRC 100599	mesophil	C0ZCZ0	312	48
Lipolytisches Protein	*Burkholderia sp*. 383	mesophil	Q397N4	309	46
Esterase	*Burkholderia thailandensis* E264	mesophil	Q2SWM9	327	45

Für jedes Enzym wurde der Zugriffschlüssel der UniprotKB[1] und Anzahl der Aminosäuren[2] angegeben. Die prozentuale Identität[3] bezieht sich auf die Aminosäuresequenz von Est2 .

Lebenslauf

Name: Agathe Mandrysch

Geburtsdatum: 02.02.1986

Geburtsort: Ratibor

Familienstand: ledig

Schulbildung

08/1992 – 06/1996 Gemeinschaftsgrundschule Süchteln

08/1996 – 06/2005 Liebfrauenschule Mühlhausen, Grefrath

Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

10/2005 – 03/2006 Studium der Biologie an der Justus-Liebig Universität Gießen

04/2006 – 11/2009 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

11/2009 Abschluss des Diplomstudiengangs Biologie

Diplomarbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Thema der Diplomarbeit: „Biochemie und Physiologie neuer Hydrolasen aus *Pseudomonas aeruginosa*“

06/2010 – 06/2013 Promotion am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich im Rahmen des DFG geförderten Graduierten-Kollegs „SeleCa - Selectivity in Chemo- and Biocatalysis" der RWTH Aachen

Thema der Dissertation: „Komparative Analyse der adaptiven thermischen Eigenschaften lipolytischer Enzyme mit differentem Temperatur-Ursprung“

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Mönchengladbach, den 05.08.2013

Agathe Mandrysch