

**Die Rolle des Chaperons LipH bei der
Produktion aktiver Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa*:
Struktur- und Funktionsuntersuchung mit Methoden der
„Directed Evolution“**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Stefan Sadtler

aus
Essen

Düsseldorf, Mai 2007



meiner Frau

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: Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jäger
Korreferent: Herr Prof. Dr. Joachim F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 2007

Veröffentlichungen im Rahmen Promotion:

Sadtler, S., Rosenau, F., and Jaeger, K.-E. (2007). The N-terminal region of the lipase specific foldase LipH is required for secretion of the lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. Manuskript in Vorbereitung

Posterpräsentationen:

Gruetzmacher, S., Wilhelm, S., Rosenau, F. and Jaeger, K.-E. (2005) Improvement of lipase production by directed evolution of a specific chaperone from *Pseudomonas aeruginosa*. Biospektrum: Sonderausgabe zur VAAM Jahrestagung 2005.

Tielker, D., Rosenau, F., Gruetzmacher, S., Jaeger, K.-E. (2001). Cloning, overexpression, and purification of two lectins from *Pseudomonas aeruginosa*. Book of abstracts of the *Pseudomonas* 2001 meeting, Brüssel, Belgien, p. 142.

Vorträge:

Gruetzmacher, S., Hausmann, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. and Rosenau, F (2005). Improvement of lipase production by directed evolution of a specific chaperone from *Pseudomonas aeruginosa*. Book of abstracts, 5th EU-meeting Nanofoldex, Lausanne, Schweiz.

Kreuz, A., Gruetzmacher, S, Wilhelm, S., Rosenau, F. and Jaeger, K.-E. (2004). Chaperones and Folding catalysts from *Pseudomonas aeruginosa*. Book of abstracts, 3rd EU-meeting Nanofoldex, Düsseldorf, p. 12.

Danksagungen

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas und die guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie. Ferner möchte ich mich für das stetige Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie die regen und fruchtbaren Diskussionen in den letzten Jahren bedanken.

Herrn Prof. Dr. Joachim F. Ernst danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei der Europäischen Union bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projektes: „Nanofoldex – Exploiting the secretion machinery of *Pseudomonads* for the nanotechnological production of pharmaceuticals“.

Bei den Herren Prof. Dr. Lode Wyns, Dr. Patrick Van Gelder und Kris Pauwels aus dem *Department of Molecular and Cellular Interactions* des *Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie* an der *Vrije Universiteit Brussel*, möchte ich mich für die konstruktive Kooperation bedanken.

Bei Frau Dr. Susanne Wilhelm und Herrn Dr. Frank Rosenau bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Arbeiten, die zahlreichen Gespräche und konstruktiven Diskussionen sowie die Durchsicht des Manuskriptes.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IMET für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft während der gesamten Promotionszeit danken. Dabei möchte ich mich besonders bei Frau Lena Rempel für die Unterstützung bei der Durchführung einiger Experimente bedanken.

Für die entspannte und freundschaftliche Atmosphäre im Büro 401 danke ich Frau Anetta Gdynia, Herrn Sascha Hausmann, Herrn Helge Henning und Herrn Kai Bartels. Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors 206 und 306 bedanke ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Alexander Schulz und Herrn Denis Tielker für die Durchsicht meines Manuskriptes.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für die Unterstützung in den letzten Jahren und vor allem im Laufe meiner Promotion besonders danken.

Abschließend möchte ich meiner Frau Susanne danken, die mich vom Anfang bis zum Ende unterstützt hat, jederzeit für mich da war und mir stets Halt gegeben hat.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	V-VII
Abkürzungen	VIII-IX
1. Einleitung	1-17
1.1 Lif-Proteine in Gram-negativen Bakterien	2
1.2 Physiologie der <i>P. aeruginosa</i> - und <i>B. glumae</i> -Foldase	6
1.2.1 Lipase-Foldase-Interaktion	6
1.2.2 Foldase-Spezifität	9
1.2.3 Regulation der Foldase-Genexpression	9
1.3 Molekulare Mechanismen der Foldase-Aktivität	10
1.4 Directed Evolution	13
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden	18-31
2.1 Chemikalien und Enzyme	18
2.2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	18
2.3 Oligonukleotide	22
2.4 Anzucht von Bakterien	23
2.4.1 Nährmedien	23
2.4.2 Testmedien	23
2.4.3 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	24
2.5 Isolierung von Nukleinsäuren	24
2.6 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	24
2.7 <i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	25
2.8 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	25
2.9 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation	25
2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.10.1 Standard-PCR	25
2.10.2 Ortsspezifische Mutagenese	26
2.10.3 Fehlerhafte PCR (epPCR)	26
2.10.4 Sättigungsmutagenese	26
2.11 Sequenzierung von DNA	27

2.12	Herstellung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten	27
2.13	Herstellung von Ganz-Zell-Lysaten	27
2.14	Membranfraktionierung	27
2.15	Bestimmung der Lipaseaktivität	28
2.16	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	28
2.17	Präzipitation von Proteinen	28
2.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.19	Immunologischer Nachweis von Proteinen	29
2.20	Reinigung von LipA-„inclusion-bodies“	29
2.21	<i>In vitro</i> -Renaturierung der LipA-„inclusion-bodies“	29
2.22	Reinigung von LipH als Poly-Histidin-Fusionsprotein	30
2.23	Interaktionsversuche	30
2.24	Computerprogramme und Datenbanken	31
3.	Ergebnisse	32-98
3.1	Mutagenese des Chaperons LipH	32
3.1.1	Fehlerhafte PCR des <i>lipH</i> -Gens aus <i>P. aeruginosa</i>	32
3.1.2	Alaninscan des <i>lipH</i> -Gens aus <i>P. aeruginosa</i>	33
3.2	Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehung zwischen der Lipase LipA und ihrem Chaperon LipH	36
3.2.1	Screening der ep-LipH-Bank im heterologen Wirt <i>E. coli</i> BL21(DE3)	37
3.2.2	Screening „interessanter“ ep-LipH-Varianten im homologen Wirt <i>P. aeruginosa</i> PABST7.1	41
3.2.3	Sequenzierung der ep-LipH-Varianten	44
3.3	Ortsspezifische Mutagenese zur Analyse von Einzelaustauschen	47
3.3.1	Einbringung ortsspezifischer Mutationen in das <i>lipH</i> -Gen	47
3.3.2	Screening der ortsspezifischen LipH-Mutanten im heterologen Wirt <i>E. coli</i> BL21(DE3)	47
3.3.3	Screening der ortsspezifischen LipH-Mutanten im homologen Wirt <i>P. aeruginosa</i> PABST7.1	55
3.4	Isolierte Analyse ausgewählter LipH-Varianten in <i>in vitro</i> -Experimenten	63
3.4.1	Die heterologe Überexpression und Reinigung von LipA als „inclusion-bodies“	63

3.4.2	Heterologe Überexpression und Reinigung von LipH als Poly-Histidin-Fusionsprotein	64
3.4.3	<i>In vitro</i> -Renaturierung der <i>P. aeruginosa</i> -Lipase LipA	65
3.4.4	Interaktionsversuche zwischen der Lipase LipA und den aufgereinigten LipH-Varianten	67
3.5	Screening der AS 228-250 Spacer-Region	72
3.5.1	Sättigungsmutagenese der AS-Position 234	76
3.5.2	Sättigungsmutagenese der AS-Position 241	79
3.6	Screening der N-terminalen AS 22-69	81
3.7	<i>In vitro</i> -Experimente mit ausgewählten LipH-Varianten des N-Terminus	85
3.7.1	<i>In vitro</i> -Renaturierung der <i>P. aeruginosa</i> -Lipase LipA	86
3.7.2	Interaktionsversuche zwischen der Lipase LipA und den aufgereinigten LipH-Varianten	87
3.8	Verkürzung der Foldase LipH um 63 AS	89
3.8.1	<i>In vitro</i> -Renaturierung der <i>P. aeruginosa</i> -Lipase LipA mit der verkürzten LipH-Variante	90
3.8.2	Interaktionsversuche zwischen der Lipase LipA und der verkürzten LipH-Variante	91
3.8.3	Auswirkungen der Verkürzung der Foldase auf die Spezifität	94
3.8.4	Überexpression und Aufreinigung heterologer Lipasen	94
3.8.5	<i>In vitro</i> -Renaturierung der <i>P. alcaligenes</i> -Lipase und der <i>B. glumae</i> -Lipase	95
3.8.6	Expression der verkürzten Foldase LipH im homologen Wirt <i>P. aeruginosa</i> PABST7.1	96
4.	Diskussion	99-134
4.1	<i>In vitro</i> Evolution des Chaperons LipH	99
4.2	Expression der Foldase-Varianten	102
4.3	Charakterisierung erzeugter Varianten der Foldase aus <i>P. aeruginosa</i>	104
4.4	Die C-terminale Verkürzung der Foldase bewirkt eine drastische Reduzierung der Lipaseaktivität	106
4.5	Reduzierung der Lipaseaktivität nach Zufallsmutagenese des Chaperons LipH	108
4.6	Die gerichtete Evolution der Foldase bewirkt eine Steigerung der	115

Lipaseaktivität	
4.7 <i>In vitro</i> -Charakterisierung der ep-LipH-Variante 3-49	123
4.8 Die Spacer-Region hat eine Schlüsselfunktion	125
4.9 Austausche im N-Terminus beeinflussen die Lipaseaktivität	128
4.10 Korrekte Lokalisierung der Foldase ist die Voraussetzung für eine effiziente Sekretion der Lipase	129
4.11 Die Verteilung der AS-Austausche im LipH-Modell und deren Einflüsse	133
5. Zusammenfassung	135-136
6. Summary	137-138
7. Literatur	139-148
8. Anhang	149-158

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1.1	Sequenzvergleich der Lip-Proteine	4
Abb. 1.2	3D-Strukturmodell des LipAH-Komplexes aus <i>P. aeruginosa</i>	7
Abb. 3.1	Bestimmung der lipolytischen Aktivität der ep-LipH-Varianten durch Umsatz des Substrates Tributyrin auf Agarplatten	38
Abb. 3.2	Lipolytische Aktivität der ep-LipH-Varianten im heterologen Wirt	39
Abb. 3.3	Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei heterologer Expression der ep-LipH-Varianten	40
Abb. 3.4	Lipolytische Aktivität der ep-LipH-Varianten im homologen Wirt	42
Abb. 3.5	Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei homologer Expression der ep-LipH-Varianten	43
Abb. 3.6	Bestimmung der lipolytischen Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten im heterologen Wirt auf Tributyrin-Agarplatten	48
Abb. 3.7	AS-Sequenz und Sekundärstrukturvorhersage der C-terminalen LipH-Verlängerung	51
Abb. 3.8	Bestimmung der lipolytischen Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten im homologen Wirt auf Tributyrin-Agarplatten	55
Abb. 3.9	Lipolytische Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten im homologen Wirt	56
Abb. 3.10	Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei homologer Expression der ortsspezifischen LipH-Mutanten.	57
Abb. 3.11	Überexpression und Aufreinigung der Lipase LipA.	64
Abb. 3.12	SDS-PAGE der Überexpression und Aufreinigung einer LipH-Variante	65
Abb. 3.13	Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase durch die LipH-Varianten	66
Abb. 3.14	SDS-PAGE des Interaktionsversuchs zwischen der Lipase LipA und der Foldase LipH	68
Abb. 3.15	Verteilung der Lipaseaktivität auf die einzelnen Fraktionen der LipH-Varianten	69
Abb. 3.16	Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase mit den LipH-Varianten im Interaktionsversuch	70
Abb. 3.17	Die Spacer-Region der <i>P. aeruginosa</i> -Foldase	72
Abb. 3.18	Bestimmung der lipolytischen Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten der Spacer-Region auf Tributyrin-Agarplatten	73
Abb. 3.19	Lipolytische Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten der Spacer-Region im homologen Wirt	74
Abb. 3.20	Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei homologer Expression der ortsspezifischen LipH-Mutanten der Spacer-Region	75
Abb. 3.21	Bestimmung der lipolytischen Aktivität der Sättigungsmutagenese-P234-LipH-Mutanten auf Tributyrin-Agarplatten	77
Abb. 3.22	Lipolytische Aktivität der Sättigungsmutagenese-P234-LipH-Mutanten der Spacer-Region im homologen Wirt	78
Abb. 3.23	Bestimmung der lipolytischen Aktivität der Sättigungsmutagenese-Q241-LipH-Mutanten auf Tributyrin-Agarplatten	79
Abb. 3.24	Lipolytische Aktivität der Sättigungsmutagenese-Q241-LipH-Mutanten der Spacer-Region im homologen Wirt	80
Abb. 3.25	Bestimmung der lipolytischen Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten des N-Terminus auf Tributyrin-Agarplatten	82

Abb. 3.26	Lipolytische Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten des N-Terminus	83
Abb. 3.27	Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei homologer Expression der ortsspezifischen LipH-Mutanten des N-Terminus	84
Abb. 3.28	Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase durch die LipH-Varianten G39A und E51A	86
Abb. 3.29	Verteilung der Lipaseaktivität auf die einzelnen Fraktionen der LipH-Varianten G39A und E51A	87
Abb. 3.30	Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase mit den LipH-Varianten G39A und E51A im Interaktionsversuch	88
Abb. 3.31	SDS-PAGE der Überexpression und Aufreinigung der verkürzten LipH-Variante	90
Abb. 3.32	Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase durch die verkürzte LipH-Variante	90
Abb. 3.33	SDS-PAGE des Interaktionsversuchs zwischen der Lipase LipA und der verkürzten LipH-Variante	91
Abb. 3.34	Verteilung der Lipaseaktivität auf die einzelnen Fraktionen der verkürzten LipH-Variante	92
Abb. 3.35	Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase mit der verkürzten LipH-Variante im Interaktionsversuch	92
Abb. 3.36	Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase durch die verkürzte LipH-Variante in variierenden Konzentrationen	93
Abb. 3.37	Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipasen aus <i>P. alcaligenes</i> und <i>B. glumae</i> durch die verkürzte LipH-Variante	95
Abb. 3.38	Lipolytische Aktivität der verkürzten LipH-Varianten im homologen Wirt	97
Abb. 3.39	Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei homologer Expression der verkürzten LipH-Variante	97
Abb. 4.1	3D-Strukturmodell zur Deletion der Foldase	107
Abb. 4.2	3D-Strukturmodell der Komplexbildung der Foldase mit der Lipase	127
Abb. 4.3	Die Verteilung der AS-Austausche im LipH-Protein	133
Abb. 8.1	Strategien für die Einbringung ortsspezifischer Mutationen in das <i>lipH</i> -Gen	156
Abb. 8.2	Klonierungsschema über die Erstellung der ep-LipH-Bank	156
Abb. 8.3	Klonierungsschema der LipH-Verkürzung	157
Tabellen		
Tab. 2.1	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	18
Tab. 2.2	Übersicht der verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide	19
Tab. 2.3	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	22
Tab. 2.4	Endkonzentrationen der verwendeten Antibiotika	24
Tab. 3.1	Übersicht der erstellten AS-Austausche im Rahmen des LipH-Alaninscans	35
Tab. 3.2	Übersicht der jeweiligen AS-Austausche in den ep-LipH-Varianten	44
Tab. 3.3	Übersicht der Proteinkonzentrationen der aufgereinigten LipH-Varianten	65
Tab. 3.4	Übersicht der Proteinkonzentrationen der aufgereinigten LipH-Varianten G39A und E51A	86
Tab. 8.1	Übersicht der im Rahmen des Alaninscans erstellten Plasmide	148
Tab. 8.2	Übersicht der im Rahmen der P234-Sättigungsmutagenese erstellten Plasmide	151

Tab. 8.3	Übersicht der im Rahmen der P241-Sättigungsmutagenese erstellten Plasmide	151
Tab. 8.4	Übersicht der im Rahmen des Alaninscans verwendeten Oligonukleotide	151
Tab. 8.5	Übersicht der im Rahmen der P234-Sättigungsmutagenese verwendeten Oligonukleotide	155
Tab. 8.6	Übersicht der im Rahmen der Q241-Sättigungsmutagenese verwendeten Oligonukleotide	155

Abkürzungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Ausgenommen sind die in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen und SI-Einheiten. Aminosäuren wurden in dem gebräuchlichen Ein-Buchstabencode abgekürzt.

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
AS-Sequenz	Aminosäure-Sequenz
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
C	Celsius
C _m r	Chloramphenicol-Resistenz
C-Terminus	Carboxyterminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat Dsb <i>disulfide bond formation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
G _m r	Gentamycin-Resistenz
GZE	Gesamtzellextrakt(e)
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KP _i	Kaliumphosphatpuffer
KÜ	Kulturüberstand
λ	Wellenlänge
LV	Leervektor
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i> , Polylinker
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
N-Terminus	Aminoterminus
o.D.	optische Dichte
<i>orf</i>	<i>open reading frame(s)</i> , offene(r) Leserahmen
p.A.	<i>per analyse</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPIase	Peptidy-Prolyl <i>cis-trans</i> Isomerase
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA

TCA	Trichloressigsäure
T _{Cr}	Tetracyclin-Resistenz
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
ÜK	Übernachtskultur(en)
üN	Über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

Im Jahr 1973 demonstrierte C. B. Anfinsen, dass die Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) eines Polypeptids dessen dreidimensionale Struktur bestimmt (Anfinsen, 1973; Epstein *et al.*, 1963). Er erklärte ebenfalls, dass die Proteinfaltung durch andere große Moleküle beeinflusst werden könnte, die sich in derselben Lösung befinden. Dieses könnten Proteine derselben, aber auch anderer Klassen mit der Fähigkeit zur intermolekularen Interaktion sein (Epstein *et al.*, 1963). Die Tatsache, dass ein Protein, welches aus 100 Aminosäuren (AS) besteht, 10^{30} verschiedene Konformationen annehmen kann (Rosenau *et al.*, 2004), zeigt, dass die Zahl der theoretisch möglichen Konformationen unvorstellbar hoch ist. Natürlich sind die meisten dieser Konformationen falsch und somit ertraglos. In Zellen wird eine solche Fehlfaltung durch zwei Klassen von Faltungs-Modulatoren verhindert. Dies sind zum einen molekulare Chaperone wie GroEL-GroES- oder DnaK-DnaJ-GrpE-Systeme, die eine korrekte Faltung über ATP-abhängige Zyklen der Bindung und Entlassung der Faltungsintermediate fördern und so eine Fehlfaltung verhindern (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Schlieker *et al.*, 2002; Walter & Buchner, 2002; Thomas *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit lege ich mein Augenmerk jedoch auf die zweite Klasse der Faltungs-Modulatoren, die Faltungskatalysatoren und Foldasen. Diese beschleunigen limitierende Schritte entlang der Proteinfaltung.

Einige Proteine brauchen zur Ausbildung der korrekten isomeren Form einer Peptidbindung die Hilfe von spezifischen Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerasen, kurz PPIasen (Schiene & Fischer, 2000). Des Weiteren benötigen viele Proteine, darunter auch extrazelluläre Enzyme, für ihre vollständige Funktion die Formation von Disulfidbrücken, die in Bakterien durch periplasmatische Thiol-disulfid-oxidoreduktasen, kurz Dsb-Proteine, katalysiert werden (Raina & Missiakas, 1997; Urban *et al.*, 2001; Liebeton *et al.*, 2001; Collet & Bardwell, 2002). Eine weitere Klasse von Chaperonen übt ihre Funktion im Periplasma aus, wo sie an der korrekten Faltung von spezifischen Zielproteinen mitwirkt. Zu den Zielproteinen zählen unter anderem bakterielle Pilus-Untereinheiten (Hung & Hultgren, 1998; Sauer *et al.*, 2000), Proteasen (Shinde *et al.*, 1993) und Lipasen (Jaeger *et al.*, 1994). Die Familie der PapD-artigen Chaperone wurde umfassend studiert. Die Röntgen-Struktur von PapD, welches zum Aufbau von P-Pili benötigt wird, wurde im Komplex mit dem Substrat PapK aufgeklärt (Sauer *et al.*, 1999). Die N-terminalen Propeptide verschiedener Proteasen, einschließlich Subtilisin, wurden als intramolekulare Chaperone identifiziert, welche die Faltung ihrer

korrespondierenden Proteasen vermitteln (Braun & Tommassen, 1998). Nach der Bindung der verwandten Protease stellen die Propeptide sterische Informationen zur Verfügung, die für die korrekte Faltung des Enzyms nötig sind. Darüber hinaus wirken sie durch ihre Bindung an das aktive Zentrum inhibierend auf eine vorzeitige Proteaseaktivität, sodass diese erst nach der Abgabe in das extrazelluläre Medium zum Tragen kommt.

Das Lipase-Gen *lipA* des Bakteriums *Burkholderia cepacia* wird zusammen mit einem zweiten Gen in einem Operon kodiert. Im Jahr 1991 konnte gezeigt werden, dass dieses Gen, *lipB*, für die Aktivität der Lipase notwendig ist (Jorgensen *et al.*, 1991). Daraufhin wurden immer mehr LipB-artige Proteine in Gram-negativen Bakterien identifiziert, die alle die korrekte Faltung ihrer verwandten Lipase unterstützen. Sie werden daher auch als Lipase-spezifische Foldasen, kurz Lif, bezeichnet (Jaeger *et al.*, 1994). Lipase-spezifische Foldasen sind von außerordentlichem Interesse, da sie die Faltung der wichtigsten Klasse von Enzymen, die in der synthetischen organischen Chemie und Biotechnologie verwendet werden, unterstützen (Jaeger & Reetz, 1998). Bakterielle Enzyme von *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia*-Arten scheinen besonders nützlich für eine große Auswahl der verschiedensten biokatalytischen Anwendung, wie zum Beispiel der enantioselektiven Produktion von Alkoholen, Aminen und Carbonsäuren, zu sein (Jaeger *et al.*, 1996; Liese *et al.*, 2000; Jaeger & Eggert, 2002; Reetz & Jaeger, 2002). Jedoch ist die Anwesenheit der verwandten Foldase alleine für die Produktion enzymatisch aktiver Lipase nicht ausreichend; es bedarf vielmehr mehr als 30 verschiedener zellulärer Proteine, was die Komplexität dieses hochspezifischen Prozesses veranschaulicht (Rosenau & Jaeger, 2000).

1.1 Lif-Proteine in Gram-negativen Bakterien

Basierend auf AS-Sequenz-Homologien werden die Lipasen aus *Pseudomonas* und *Burkholderia* in zwei Unterfamilien eingeteilt: Subfamilie I.1 und I.2 (Arpigny & Jaeger, 1999). Diese Lipasen werden im Periplasma in ihre aktive Konformation gefaltet und anschließend mittels einer komplexen Maschinerie, bestehend aus bis zu 14 verschiedenen Proteinen, über die äußere Membran in das extrazelluläre Medium sekretiert (Sandkvist, 2001). In *P. aeruginosa* erfolgt dies über einen aufwendigen Multi-Protein-Komplex, der aus mindestens 12 verschiedenen Xcp-Proteinen besteht, die von zwei entgegengesetzt transkribierten Operonen kodiert werden (Tommassen *et al.*, 1992; Filloux *et al.*, 1998). Zentrale Komponente hierbei ist die aus 12 XcpQ-Untereinheiten bestehende Pore (Bitter *et*

al., 1998; Brok *et al.*, 1999) der äußeren Membran, die auch Sekretin genannt wird. Dieser Komplex wird für die Translokation diverser Exoenzyme, wie zum Beispiel der Elastase LasB, dem Exotoxin A und den Lipasen LipA und LipC, benötigt (Filloux *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 1999). Zunächst werden diese Proteine mittels des Sec- oder Tat-Sekretionsweg über die innere Membran in das Periplasma transportiert (Voulhoux *et al.*, 2001). Nachdem sie dort in ihre aktive Form gefaltet wurden, werden sie über die äußere Membran in das extrazelluläre Medium sekretiert (Koster *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2003). Um jedoch eine sekretionsfähige Konformation zu erreichen, bedarf es spezifischer intermolekularer Faltungskatalysatoren, der Lif-Proteine (Jaeger *et al.*, 1994; Rosenau & Jaeger, 2000). Diese Lif-Proteine sind normalerweise in einer Operonstruktur mit dem dazugehörigen Lipasegen kodiert und wurden in verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen (Iizumi *et al.*, 1991; Chihara-Siomi *et al.*, 1992; Ihara *et al.*, 1992; Wohlfahrt *et al.*, 1992; Oshima-Hirayama *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2001), in *B. cepacia* (Jorgensen *et al.*, 1991), in *B. glumae* (Frenken *et al.*, 1993 a; Frenken *et al.*, 1993 b), in *Acinetobacter calcoaceticus* (Kok *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1999) und in *Vibrio cholerae* (Ogierman *et al.*, 1997) nachgewiesen. Eine Ausnahme hierbei ist die zweite extrazelluläre Lipase LipC aus *P. aeruginosa*, die kein individuelles Lif-Protein besitzt, sondern durch das zur Lipase LipA gehörende LipH-Protein aktiviert wird (Martinez *et al.*, 1999; Friedrich, 2001). Die Lif-Proteine repräsentieren eine einzigartige Familie von Proteinen ohne signifikante Homologien zu anderen Klassen von Proteinen. Im Jahr 1999 wurden neun vorhandene Lif-Proteine in drei Familien eingeordnet (Sullivan *et al.*, 1999). Obwohl Lif-Proteine von entfernt verwandten Arten einen erheblichen Grad an Sequenz-Ähnlichkeiten aufweisen, ist das Level der Sequenz-Identität unter Mitgliedern dieser Familien gering. Es konnten nur acht AS identifiziert werden, die in allen bekannten Lif-Proteinen hochgradig konserviert sind. In Analogie zu den veröffentlichten Einteilungen der *Pseudomonas*- und *Burkholderia*-Lipasen (Arpigny & Jaeger, 1999) wurden die Lif-Proteine in die Familien I- IV eingeteilt (Rosenau *et al.*, 2004). Familie I umfasst die Lif-Proteine aus *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. wisconsinensis* und *P. alcaligenes*; Familie II beinhaltet Lif-Proteine aus *B. cepacia*, *B. glumae*, *P. fragi*, *Xylella fastidiosa* und *Ralstonia metallidurans* und Familie III enthält Lif-Proteine aus *Acinetobacter calcoaceticus*. Die Lif-Proteine aus *Pseudomonas sp.*-Stamm KFCC10818, *V. cholerae* und *V. vulnificus* bilden die Familie IV, da sie sich in Größe und AS-Sequenz signifikant von allen anderen Lif-Proteinen unterscheiden.

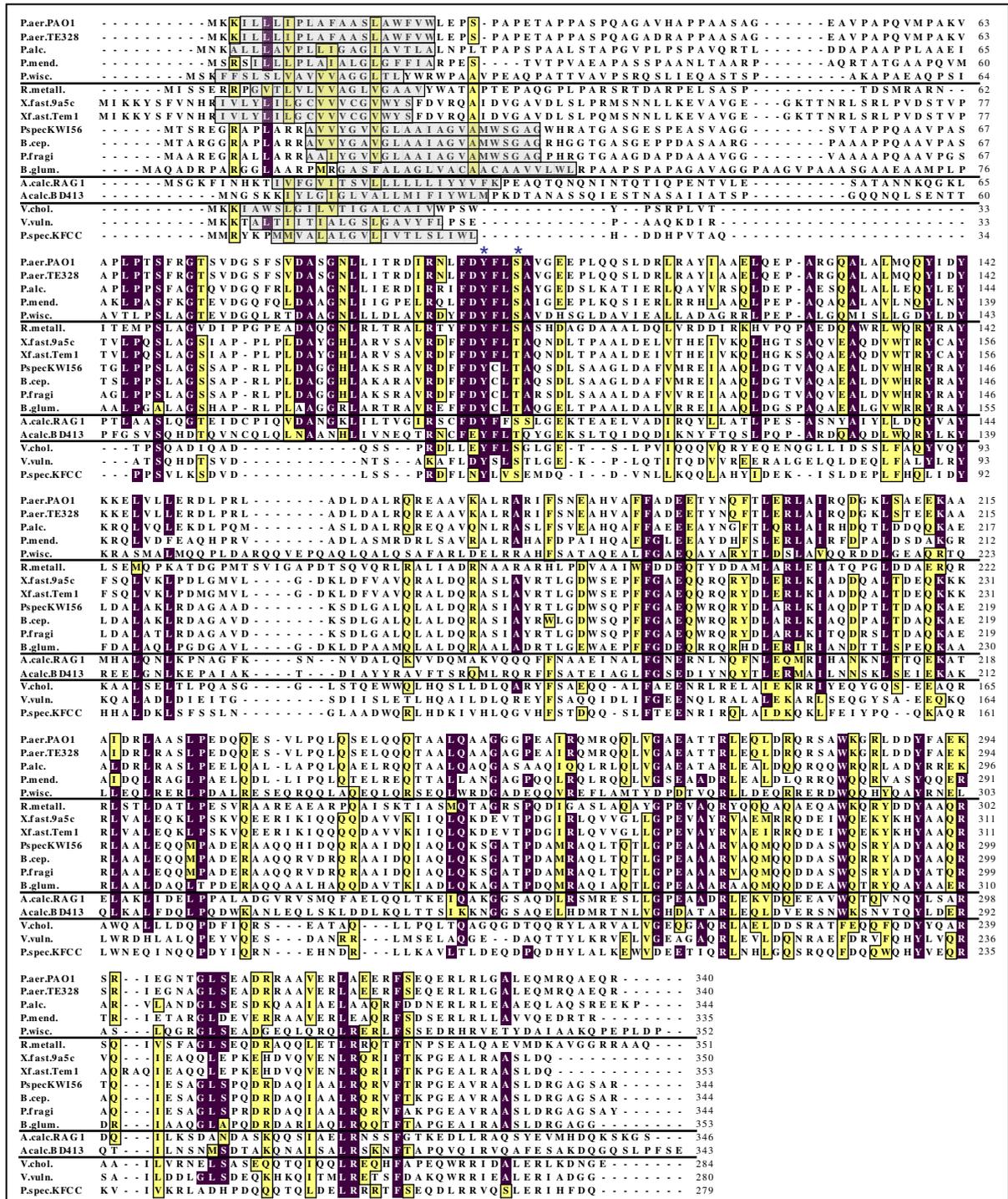


Abb. 1.1: Sequenzvergleich der Lif-Proteine. (modifiziert nach Rosenau & Jaeger, 2004). Die Familien I-IV werden durch die schwarzen Linien gruppiert. Hydrophobe Transmembransegmente sind grau unterlegt. AS, die in mehr als zwei Familien konserviert sind, sind schwarz unterlegt und AS, die in mindestens zwei Familien konserviert sind, sind gelb unterlegt. Die konservierten AS Y99 und S102, die für die Lif-Funktion essentiell sind, sind mit einem Stern markiert. Die AS-Sequenzen oder gegebenenfalls die Nucleotidsequenzen sind unter folgenden "accession" Nummern zugänglich: *P. aeruginosa* PA01, CAA44998; *P. aeruginosa* TE3285, Q01725; *P. pseudoalcaligenes*, CAA02276; *P. mendocina*, AAM14702; *P. wisconsinensis*, O05938; *R. metallidurans*, YP585934; *X. fastidiosa* 9a5c, NP298472; *X. fastidiosa* Temicula 1, NP778696; *P. spec.* KWI-56, P25276; *B. cepacia*, B39133; *P. fragi*, E04514; *B. glumae* PG1, Q05490; *A. calcoaceticus* (RAG1), Q9X2S4; *A. calcoaceticus* BD413, Q43961; *V. cholerae* EITor, NP232621; *V. vulnificus* CMCP6, NP761197; *P. spec.* KFCC10818, AAD22079.

Gemäß der Vorhersage von Prognose-Algorithmen scheinen alle Lif-Proteine eine sehr ähnliche Sekundärstruktur zu besitzen, welche fast ausschließlich aus α -helikalen- (70 %) und „random coil“- (30 %) Elementen gebildet wird (Rost & Sander, 1993). Diese strukturelle Konservierung könnte nicht nur auf eine gemeinsame 3D-Struktur hinweisen, sondern auch auf die Konservierung des katalytischen Mechanismus.

Ein gemeinsames Charakteristikum aller Lif-Proteine ist ein vorhergesagtes, hydrophobes Transmembran-Segment nahe dem N-Terminus. Anhand von Lokalisations-Studien konnte gezeigt werden, dass dieses Segment das Lif-Protein in der inneren Membran verankert und das gesamte Protein zum Periplasma exponiert (Frenken *et al.*, 1993; Schneidinger, 1997). N-terminal verkürzte oder modifizierte Lif-Proteine behalten ihre Fähigkeit bei, die Faltung der Lipase zu katalysieren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Membrananker selbst nicht für die *in vitro*-Faltungsaktivität gebraucht wird (Shibata *et al.*, 1998 b; Quyen *et al.*, 1999; El Khattabi *et al.*, 2000). Verkürzte Lif-Proteine aus *P. aeruginosa* und *B. glumae* mit einer abspaltbaren Signalsequenz, die die Sec-abhängige Translokation in das Periplasma erlaubt, sind weiterhin in der Lage, bei homologer Expression ihre Lipase zu aktivieren (El Khattabi *et al.*, 1999). Daher ist davon auszugehen, dass der Membrananker der Lif-Proteine vor einer Sekretion des Lipase-Foldase-Komplexes durch die Xcp-Maschinerie schützt (El Khattabi *et al.*, 1999). An den Membrananker schließt sich ein Prolin- und Alanin-reicher Bereich mit hoher Sequenz-Variabilität an, der sich über 20 % des Lif-Proteins erstreckt. Familie IV stellt hier erneut eine Ausnahme dar, da die Lif-Proteine dieser Familie in diesem Bereich eine große Deletion aufweisen. Dieser Bereich könnte dazu dienen, die C-terminale Domäne ausreichend von der Membran in das Periplasma zu orientieren.

In der C-terminalen Domäne der Lif-Proteine ist eine ausgeprägtere Homologie zu beobachten. Verschiedene Indizien weisen darauf hin, dass dieser Bereich für die Interaktion mit der Lipase benötigt wird und daher die Faltungsinformation beherbergt. Zum einen sind die verkürzten Lif-Proteine aus *P. aeruginosa* bzw. *B. cepacia* trotz einer N-terminalen Verkürzung von 61 bzw. 67 AS weiterhin *in vitro* aktiv (Shibata *et al.*, 1998 c; Quyen *et al.*, 1999). Zum anderen zeigte ein Trypsin-Verdau des Lipase-Foldase-Komplexes aus *B. glumae*, dass lediglich ein N-terminaler Bereich von 76 AS abgespalten wurde und die C-terminale Domäne, vermutlich im Komplex durch die Interaktion mit der Lipase, geschützt wurde (El Khattabi *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wurde die Foldase in Abwesenheit der Lipase vollständig degradiert. Darüber hinaus lieferten Experimente durch Zufallsmutagenesen der *P. aeruginosa*-Foldase erste Ergebnisse über AS, die essentiell für die Foldaseaktivität sind. Bei der Coexpression einer Foldase-Mutagenesebank im heterologen

Wirt *E. coli* gemeinsam mit der Lipase wurden inaktive Foldase-Varianten identifiziert, die Mutationen in der C-terminalen Domäne an den Positionen Y99 und S102 trugen (Shibata *et al.*, 1998 c). Interessanterweise sind diese Positionen Teil eines konservierten Motivs (R_X₁X₂FDY(F/C)L(S/T)A), das sich in den Familien I und II wiederfindet (Rosenau *et al.*, 2004). Weitere Mutagenesestudien könnten die Rolle des konservierten Motivs im Faltungsprozess aufklären.

1.2 Physiologie der *P. aeruginosa*- und *B. glumae*-Foldase

1.2.1 Lipase-Foldase-Interaktion

Die Rolle der Foldase bei der Aktivierung der Lipase ist *in vivo* schwer zu erforschen, da die Faltung und Sekretion einen eng miteinander verbundenen Prozess darstellen. Der aktuelle Wissensstand beruht zumeist auf genetischen Ansätzen wie Expressionsstudien verschiedener Lipase-Foldase-Systeme im heterologen Wirt oder auf Experimenten, die *in vitro* mit aufgereinigten Lipasen und Foldasen durchgeführt wurden. Diese Studien haben klar gezeigt, dass die Foldase und die dazugehörige Lipase einen stabilen Komplex bilden, der aufgereinigt, immunologisch oder durch chemische Verknüpfung nachgewiesen werden kann (El Khattabi *et al.*, 2000; Hobson *et al.*, 1995; Shibata *et al.*, 1998 b).

Im Jahr 2005 gelang es erstmals, den Komplex aus einer Lipase und der zugehörigen Foldase zu kristallisieren (Pauwels *et al.*, 2005 und 2006). Diese erste molekulare Momentaufnahme der Interaktion eines sterischen Chaperons mit der dazugehörigen Lipase gelang mit der löslichen Form der Foldase aus *B. glumae* und der entsprechenden Lipase. Für diese Struktur-Untersuchungen wurde eine voll funktionale N-terminal-verkürzte Foldase-Variante genutzt, in der die ersten 18 AS sowie der sich anschließende Membrananker (22 AS) durch einen Histidin-Tag ersetzt wurden. Die Kristallstruktur des Lipase-Foldase-Komplexes zeigte, dass die Foldase eine vorher nicht beobachtete ausgedehnte α -helikale Struktur, bestehend aus elf α -Helices, aufweist, die die Lipase „einhüllt“. Dabei konnten zwei deutlich ausgeprägte Minidomänen am N- bzw. C-Terminus der sichtbaren Foldase-Struktur identifiziert werden (α 1- α 3 und α 9- α 11). Ein ausgedehntes helikales Motiv (α 4- α 8) trennt die beiden Minidomänen, sodass sich diese auf verschiedenen Seiten der Lipase befinden. Das hochkonservierte Motiv der Foldasen R_X₁X₂FDY(F/C)L(S/T)A (Rosenau *et al.*, 2004) ist in

der α 1-Helix lokalisiert. Darüber hinaus konnte anhand der Struktur gezeigt werden, dass konservierte AS-Positionen der Foldase mit konservierten Positionen der Lipase interagieren. Die N-terminalen ersten 30 AS der Foldase konnten nicht dargestellt werden, was auf eine hohe Flexibilität in diesem Bereich schließen lässt. Auch insgesamt ist festzustellen, dass die Foldase wesentlich flexibler als die Lipase ist, was darauf hindeuten kann, dass eine hochdynamische, molekulare Plattform während der Lipasefaltung notwendig ist (Pauwels *et al.*, 2006).



Abb. 1.2: 3D-Strukturmodell des LipAH-Komplexes aus *P. aeruginosa*. Das abgebildete Strukturmodell basiert auf der Struktur des Lipase-Foldase-Komplexes aus *B. glumae* (Pauwels *et al.*, 2006) und wurde mit Hilfe des Struktur-Programms „UCSF Chimera“ (University of California, USA) erstellt. Das Lipase-Protein ist gelb dargestellt, das Foldase-Protein grau. Der rot markierte Bereich stellt die Spacer-Region dar, die die beiden Minidomänen der Foldase trennt. Der N- sowie der C-Terminus sind unter Angabe der jeweiligen AS-Position gekennzeichnet.

Die Struktur der Lipase im Komplex mit der Foldase unterscheidet sich praktisch nicht von der „freien“ Lipase. Die α 5-Helix der Lipase, die den Deckel, für das aktive Zentrum bildet, liegt in der geschlossenen Konformation vor. Allerdings hat die α 5-Helix genügend Raum, was die Aktivität der Lipase im Komplex erklärt. Die konservierte AS Glutamat63 der Lipase bildet mit der AS Arginin343 der Foldase eine Salzbrücke, die zur Spezifität der Bindung beitragen könnte. Aufgrund der hohen Affinität und dem Ausmaß der Interaktion stellt die

Entlassung der aktivierten Lipase eine Herausforderung dar, und wird vielleicht nur durch die Interaktion mit der Sekretionsmaschinerie möglich.

In CD-Spektroskopie-Analysen wurde durch die Interaktion von Foldase und Lipase ein Anstieg an α -helikalen Strukturen (El Khattabi *et al.*, 1999) und bei Abwesenheit der Lipase der Verlust einer definierten Tertiärstruktur beobachtet. Man geht heute davon aus, dass die Foldase substanzielle Veränderungen sowohl in der Sekundär- als auch Tertiärstruktur durchläuft, wenn es zur Komplexbildung mit der Lipase kommt. Diese finden wahrscheinlich überwiegend in der Spacer-Region zwischen den beiden Minidomänen statt, wo sich α -Helices bilden, die die Faltungsplattform komplettieren und so die Lipase in ihre aktive Form bringen.

Foldasen können die Rückfaltung chemisch denaturierter Lipasen *in vitro* vermitteln (Ihara *et al.*, 1995; Oshima-Hirayama *et al.*, 1993; Schneidinger, 1997; Shibata *et al.*, 1998 b; Hobson *et al.*, 1993; El Khattabi *et al.*, 2003). Normalerweise bilden das Lipase-Gen und das zugehörige Foldase-Gen ein Operon, was auf 1:1-Verhältnis der Lipase- und Foldase-Expression schließen lässt. Northern-Blot-Analysen zeigten, dass das Primär-Transkript sowohl des *B. glumae*- als auch des *P. aeruginosa*-Lipase-Operons prozessiert wird, sodass nur ein Hauptfragment überbleibt, welches dem Lipase-Gen entspricht. Der Foldase-Bereich des Transkripts scheint degradiert zu werden (Frenken *et al.*, 1993; Schneidinger, 1997). Tatsächlich werden die Foldase-Proteine sowohl in *P. aeruginosa* als auch in *B. glumae* in deutlich geringeren Mengen als ihre zugehörige Lipase produziert. Dasselbe trifft auf die Foldase aus *P. alcaligenes* zu, so dass angenommen werden könnte, dass Foldasen als Mehrfachumsatz-Katalysatoren während der Lipase-Faltung dienen (El Khattabi, 1999; Gerritse *et al.*, 1998). In *in vitro*-Experimenten wurde hingegen eine 1:1-Stöchiometrie für den Lipase-Foldase-Komplex während des Aktivierungs-Prozesses ermittelt, was auf die Funktion eines Einfachumsatz-Katalysators hindeutet (El Khattabi *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 1998 c). Weitere Anhaltspunkte für diese These wurden in *in vivo*-Versuchen gesammelt, in denen das Lipase-Foldase-System aus *B. cepacia* in *E. coli* exprimiert wurde. Die Expression der beiden Gene wurde in diesem Versuch getrennt induziert. Aktive Lipase konnte nur dann detektiert werden, wenn zuerst die Foldase synthetisiert wurde, die Lipase-Expression also mit einer Verzögerung induziert wurde (Aamand *et al.*, 1994). Wurde die Foldase-Expression gestoppt, so folgte die Lipaseaktivierung einem sigmoidalen Verlauf. Dies deutet auf einen Verbrauch der Foldase während der Faltungsreaktion hin (Aamand *et al.*, 1994). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist die Bildung eines stabilen Lipase-Foldase-

Komplexes, der nur durch die Sekretion der Lipase getrennt wird. Demnach verbleibt die Foldase *in vitro* oder in *E. coli*, welcher nicht über ein Typ-II-Sekretionssystem verfügt, mit der Lipase assoziiert, sodass nur die Faltung einer Lipase möglich ist. Dennoch scheint die Menge an Foldase-Protein limitierend zu sein, da gezeigt wurde, dass das Expressionslevel der Foldase ein „bottleneck“ für die Produktion aktiver Lipase in *P. aeruginosa* und *B. glumae* darstellt. Die Überexpression der Foldase-Gene im jeweiligen Stamm resultierte in einem beachtlichen Anstieg der extrazellulären Lipase (El Khattabi *et al.*, 2003).

1.2.2 Foldase-Spezifität

Foldasen aktivieren nur ihre zugehörige Lipase. Werden die Foldasen aus *B. glumae* und *P. aeruginosa* mit der jeweiligen Lipase der anderen Art co-exprimiert, so findet keine Lipase-Faltung statt (Shibata *et al.*, 1998 c; El Khattabi *et al.*, 1999). Hybrid-Foldasen aus *P. aeruginosa* und *B. glumae* konnten nur dann die *B. glumae*-Lipase aktivieren, wenn sie den C-terminalen Bereich von mindestens 138 AS der *B. glumae*-Foldase enthielten (El Khattabi *et al.*, 1999). Dieses Ergebnis bestätigt erneut die Vermutung, dass der C-Terminus für die Interaktion zwischen Foldase und Lipase benötigt wird und so die Foldase-Spezifität bestimmt.

Foldasen und Lipasen aus nah verwandten Arten können sich gegenseitig, wenn auch mit eingeschränkter Effizienz, ersetzen. Wurde die *P. alcaligenes*-Lipase in *P. aeruginosa* zusammen mit der *P. aeruginosa*-Foldase exprimiert, resultierte dieses in aktiver und sekretierter Lipase (El Khattabi *et al.*, 1999). Dasselbe Ergebnis erhielt man, wenn Foldase-Lipase-Kombinationen aus *P. aeruginosa* und *P. wisconsinensis* von synthetischen Operons in *P. aeruginosa* exprimiert wurden. Jedoch war die Foldase aus *P. aeruginosa* nicht in der Lage, die Lipase aus *B. glumae* zu aktivieren; Ob die Expression in *P. aeruginosa* oder in *B. glumae* durchgeführt wurde, hatte keinen Einfluss (Janosch, 2002).

1.2.3 Regulation der Foldase-Genexpression

Lipasen und ihr dazugehöriges Foldase-Protein werden normalerweise gemeinsam in einem Operon kodiert (Jaeger *et al.*, 1994). Eine Ausnahme stellt die Lipase LipC aus *P. aeruginosa* dar. LipC hat eine 51 %ige Ähnlichkeit zur Lipase LipA aus *P. aeruginosa*. In der Nähe des

LipC-Gens gibt es kein Gen, welches für eine Foldase kodiert. Die Expression enzymatisch aktiver Lipase LipC ist von der Expression des Foldase-Gens im LipA-Operon abhängig (Martinez *et al.*, 1999). Wird LipC in *E. coli* überexprimiert, so resultiert dies in der Bildung von inaktiven „inclusion-bodies“ der Lipase LipC. Aufgereinigtes LipC konnte nur in Gegenwart der Foldase LipH aktiviert werden; LipH aktiviert somit nicht nur die Lipase LipA sondern auch die zweite *P. aeruginosa*-Lipase LipC. Interessanterweise ist die Expression beider Lipase-Gene unterschiedlich reguliert. Die Expression von LipA wird über ein Zweikomponenten-System und ein allgemeines Regulatorprotein organisiert (Rosenau & Jaeger, 2000; Jaeger *et al.*, 1999). LipC wird jedoch auch dann exprimiert, wenn die Expression der Lipase LipA komplett unterdrückt ist. Da für enzymatisch aktives LipC jedoch die Foldase LipH erforderlich ist, muss das LipH-Gen unabhängig von dem LipA-Gen exprimiert werden. Daher wurde die Existenz eines Promotors postuliert, der im LipAH-Operon liegen soll. Um diesen Promotor zu finden, wurden Reporter-gen-Fusionen mit der β -Galaktosidase aus *E. coli* und Teilen des LipAH-Operons erstellt. So konnte der Promotor in der intergenische Region von 49 Basenpaaren lokalisiert werden, welche die Gene *lipA* und *lipH* voneinander trennen. Anschließend wurde mittels einer „Primer-Extension“-Analyse der Foldase-mRNA ein Transkriptionsstart in der intergenischen Region identifiziert. Eine genauere Analyse der intergenischen Region zeigte, dass ein erheblicher Anteil aus sich wiederholenden DNA-Sequenzen besteht. Diese direkten und indirekten Wiederholungen formen als mRNA typische Sekundärstrukturen wie den „hairpin loop“ (Wohlfahrt *et al.*, 1992), der als Transkriptions-Terminator oder zur Prozessierung durch mRNA-abbauende Enzyme während der Expression des Lipase-Operons dienen kann. Solche intergenischen „hairpin loops“ wurden auch im Lipase-Foldase-Operon von *A. calcoaceticus* (Kok *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1999) und *P. alcaligenes* (Gerritse *et al.*, 1998) identifiziert und stehen im Verdacht, für die erhöhte Produktion der Lipase im Verhältnis zur Foldase verantwortlich zu sein.

1.3 Molekulare Mechanismen der Foldase-Aktivität

Chaperone, die essentielle sterische Informationen für ihr Zielprotein bereitstellen, werden als „sterische Chaperone“ bezeichnet (Ellis, 1998; Aamand *et al.*, 2000). Zu dieser Gruppe zählen die Propeptide der Proteasen, die PapD-artigen Chaperone aus *E. coli*, welche am Pilus-Aufbau beteiligt sind, und die Foldasen aus Gram-negativen Bakterien.

Die PapD-Familie der periplasmatischen Chaperone ist an dem Aufbau bakterieller Pili aus Pilus-Untereinheiten beteiligt, die im Periplasma gefaltet werden und danach polymerisieren, um eine faserartige Struktur zu bilden. Die Pilus-Untereinheiten haben eine ungewöhnliche Immunoglobulin-homologe Faltung, die durch das Fehlen eines C-terminalen β -Strangs gekennzeichnet ist, der in Immunoglobulin-homologen Faltungen normalerweise vorhanden ist. Durch das Fehlen dieses β -Strangs wird ein hydrophober Bereich für das Lösungsmittel zugänglich (Sauer *et al.*, 1999; Choudhury *et al.*, 1999). Im Komplex mit dem PapD-artigen Chaperon wird diese Faltung durch den β -Strang des Chaperons komplettiert (Sauer *et al.*, 1999; Choudhury *et al.*, 1999). Diese Interaktion wurde als „donor strand complementation“ bezeichnet; sie stabilisiert die Pilus-Untereinheit und verhindert deren unproduktive Polymerisation innerhalb des Periplasmas (Sauer *et al.*, 1999; Choudhury *et al.*, 1999). Der β -Strang des Chaperons ist dabei für die Stabilisierung ausreichend; Wurde er mit dem C-Terminus der Pilus-Untereinheit fusioniert, so konnte diese ebenfalls ihre stabile Konformation in Abwesenheit des Chaperons annehmen (Barnhart *et al.*, 2000). Der stabile Komplex zwischen dem Chaperon und der Pilus-Untereinheit wird durch die Interaktion zwischen dem Komplex und der Translokations-Pore der äußeren Membran gelöst (Barnhart *et al.*, 2003). Dadurch wird die Polymerisation der Pilus-Untereinheit eingeleitet und Energie für die Translokation der Untereinheit durch die Membran bereitgestellt (Behrens, 2003; Zavialov *et al.*, 2003).

Viele bakterielle Proteasen, Subtilisin aus *B. subtilis* und α -lytische Protease aus *Aerobacter enzymogenes* eingeschlossen, werden zusammen mit einem N-terminalen Propeptid synthetisiert, welches die Funktion eines intramolekularen sterischen Chaperons hat. Im Fall der α -lytische Protease faltet sich die Protease-Domäne selbst in ein stabiles Intermediat, welches aufgrund der großen Energiebarriere im Faltungsprozess jedoch selbst nicht in der Lage ist, sich in den enzymatisch aktiven, nativen Zustand umzuwandeln (Baker *et al.*, 1992; Sohl *et al.*, 1998). Eine Energiebarriere im Faltungsprozess impliziert eine Energiebarriere auch bei der Rückfaltung. Da also der native Zustand kinetisch gefangen und vor der Rückfaltung durch eine beachtliche Rückfaltungsbarriere geschützt ist, wird diese energetische Ungunst über das thermodynamisch stabilere Faltungsintermediat aufgebracht (Sohl *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 1999; Jaswal *et al.*, 2002). Das Propeptid hilft, diese energetische Barriere im Faltungsprozess zu überwinden. Es stabilisiert den Faltungsübergangs-Zustand und bindet fest an den nativen Zustand, wodurch das Gleichgewicht zum Propeptid/nativer Zustand-Komplex hin verschoben wird, bis der Zustand thermodynamisch stabil ist (Cunningham *et al.*, 1999). Anschließend wird die „reife“ Protease

aus dem stabilen Komplex durch den Abbau des Propeptids durch die eigene katalytische Aktivität entlassen (Jaswal *et al.*, 2002). Die Kristallstruktur des Propeptid/nativer Zustand-Komplex zeigt eine ausgedehnte, hydratisierte Interphase zwischen dem Propeptid und der Protease-Domäne (Sauter *et al.*, 1998). Das relevante Ereignis für die Stabilisierung des Faltungsübergangs-Zustand und die Formation des nativen Zustands könnte die Verdrängung von gebundenen Wassermolekülen sein, um dadurch einen höheren Grad an Oberflächen-Anpassung zwischen Propeptid und Protease zu erlangen. Die Verdrängung von angeordneten Wassermolekülen würde ebenfalls die Entropie des Systems erhöhen und die thermodynamische Stabilität des Komplexes erklären (Cunningham *et al.*, 1999).

In vitro-Rückfaltungsexperimente haben gezeigt, dass die *B. glumae*-Lipase sich auch in Abwesenheit der Foldase in eine stabile, nativ-ähnliche Konformation faltet, was mittels CD-Spektroskopie dargestellt wurde. Diese inaktive Form kann durch Zugabe der Foldase in die enzymatisch aktive Form überführt werden, was ein Hinweis dafür ist, dass das Chaperon hilft, die energetische Barriere im produktiven Faltungsprozess zu überwinden (El Khattabi *et al.*, 2000). Eine weitere Parallele zum Faltungsprozess der α -lytischen Protease stellt das offensichtlich stabile Faltungsintermediat dar, welches stabiler als das native Protein ist. Dies weist darauf hin, dass das native Protein nicht die Konformation der minimalen freien Energie eingenommen hat (El Khattabi *et al.*, 2000). Das Propeptid der α -lytischen Protease trägt vermutlich dazu bei, die Wassermoleküle zu verdrängen, dadurch die Oberfläche für die Interaktion zu vergrößern und so die native Konformation der Protease zu stabilisieren. *B. glumae*- und *B. cepacia*-Lipasen konnten in Abwesenheit der jeweiligen Foldase nur rückgefaltet werden, wenn 40% Glycerol im Rückfaltungspuffer enthalten waren (El Khattabi *et al.*, 2000; Quyen *et al.*, 1999). Glycerol soll die hydrophoben Interaktionen innerhalb ungefalteter Proteine stimulieren (Rariy & Klibanov, 1997). Im Fall der *P. aeruginosa*-Lipase war dies nicht möglich, es sei denn, die Foldase wurde zugefügt. Glycerol kann daher nicht als genereller Ersatz für die Foldase angesehen werden.

Durch einen einzigen AS-Austausch konnte sich die Lipase aus *Pseudomonas sp.*-Stamm KFCC10818 selber falten. Diese Variante wurde in einer Mutagenesebank der Lipase identifiziert, welche in *E. coli* ohne die zugehörige Foldase exprimiert wurde und trotzdem enzymatisch aktiv war (Kim *et al.*, 2001). Der Austausch könnte die energetische Barriere im Faltungsvorgang reduziert haben. Obwohl nicht bekannt ist, ob eine der Lipasen aus Familie I.1 oder I.2 (Arpigny & Jaeger, 1999) durch den Austausch einer AS zu einer Selbstaktivierung in der Lage wäre, hätte sich diese Mutation im Laufe der Evolution vermutlich durchgesetzt; Die Foldase-unabhängige Faltung zur aktiven Lipase ist für die Zelle

wünschenswert. Somit gewinnt die Aktivierung mittels Foldase an Bedeutung. Die Möglichkeit der Selbstfaltung setzt wahrscheinlich eine Reduzierung der Energie-Barriere voraus. Allerdings resultiert dies auch in einer niedrigeren Energie-Barriere für die Rückfaltung und somit in einer reduzierten Stabilität der Lipase. Eine solche Reduzierung der Stabilität wäre von Nachteil, zumal die Bakterien aus Familie I.1 und I.2 auch extrazelluläre Proteasen, wie z. B. die Elastase aus *P. aeruginosa*, produzieren. Es wäre daher interessant, zu wissen, ob die Foldase-unabhängige Lipase-Variante aus *Pseudomonas sp*-Stamm KFCC10818 eine erhöhte Sensitivität gegenüber Proteasen aufweist.

Es stellt sich die Frage, ob die Foldase außer der Lipase-Aktivierung eine weitere Funktion in der Zelle übernimmt und daher im Laufe der Evolution geschützt wurde. Dient sie eventuell auch als Lipase-Inhibitor nachdem die Faltung erfolgt ist, wie es bei den Protease-Propeptiden der Fall ist (Ihara *et al.*, 1995)? Allerdings weisen Lipasen, im Gegensatz zu den Proteasen, in der Zelle keine schädlichen Aktivitäten auf, zumal die bakterielle Membran hauptsächlich aus Phospholipiden aufgebaut ist, die kein Substrat der Lipasen darstellen. Darüber hinaus scheint die Foldase nicht inhibitorisch auf die Lipaseaktivität zu wirken, da der Lipase-Foldase-Komplex in *in vitro*-Experimenten Lipaseaktivität aufweist (El Khattabi *et al.*, 2000). Eine Beteiligung der Foldase an der Sekretion liegt da näher. Es ist noch kein allgemeines Sekretions-Signal für Exoenzyme, die über den TypII-Sekretionsweg sekretiert werden, bekannt. Eventuell stellt der Komplex aus Lipase und Foldase als strukturelles Element dieses Signal dar (Sandkvist, 2001). Die Interaktion dieses Komplexes mit Teilen der Sekretions-Maschinerie könnte auch die Entlassung der Lipase aus dem stabilen Komplex bewirken, was in diesem Fall, im Gegensatz zu den Proteasen, nicht durch Autoproteolyse möglich ist.

Obwohl bereits viele Fragen bezüglich der Genregulation, der physiologischen Funktion und den potentiellen Mechanismen der Foldase-Funktion geklärt werden konnten, sind mindestens ebenso viele noch unbeantwortet:

- Wirken die Foldasen inhibitorisch auf die Lipase und verhindern sie so Lipaseaktivität bereits im Periplasma? Doch was wäre dann das Substrat?
- Was passiert mit der Foldase nach der Lipaseaktivierung?
- Haben die Foldasen außer der Lipaseaktivierung noch weitere Funktionen? Spielen sie zum Beispiel eine direkte Rolle in der Sekretion?
- Interagieren die Foldasen mit weiteren Proteinen, zum Beispiel mit Teilen der Sekretionsmaschinerie?
- Wie sieht die Kristall-Struktur weiterer Lipasen aus?

- Wieso ist die Lipase-Aktivierung überhaupt erforderlich, zumal andere α - β -Hydrolasen sich selbstständig aktivieren?

1.4 Directed Evolution

„The key (of breeding) is man’s power of accumulative selection: nature gives successive variations, man adds them up in certain directions useful to them.” (Charles Darwin, 1858).

Mit Hilfe der „directed“, d.h. der gerichteten Evolution ahmt der Forscher die natürliche Evolution in verkürzter Zeit im Labor nach. Unter „natürlicher Evolution“ versteht man die zufällige, ungerichtete Veränderung von Eigenschaften mit anschließender natürlicher Selektion des am besten angepassten Organismus, was C. Darwin im Jahr 1859 mit der Bezeichnung „survival of the fittest“ auf den Punkt brachte.

In der gerichteten Evolution bedient man sich der Hilfe molekularbiologischer Methoden, um eine genetische Diversität im Zielgen zu bewirken. Die Vielzahl der so entstandenen Varianten wird in generierten Mutantenbanken exprimiert und die korrespondierenden Proteine auf die gewünschten Eigenschaften hin analysiert. Durch den entsprechenden Selektionsdruck identifizierte Varianten können durch weitere Zyklen gerichteter Evolution optimiert werden.

Die gerichtete Evolution kann dabei auf Strukturkenntnisse und deren Funktionsbeziehung verzichten (Roberts *et al.*, 1992; Chen & Arnold, 1993), diese im Gegenzug jedoch liefern (Lee *et al.*, 2000). Das Prinzip der gerichteten Evolution tauchte im Jahr 1967 erstmals auf, wurde in den folgenden Jahrzehnten weiterentwickelt und konnte in den 1990er Jahren erstmals zur Optimierung eines Biokatalysators dienen (Mills *et al.*, 1967; Eigen, 1984; Roberts *et al.*, 1992; Chen & Arnold, 1993; Kaufman, 1993). Heutzutage hat sich das Verfahren der gerichteten Evolution etabliert, um Biokatalysatoren optimal an die Anforderungen, z. B. in der Industrie, anzupassen. Dabei stehen der Einsatz in Biotransformationen (pH, Temperatur, Lösungsmittel) (Bessler *et al.*, 2003; Sriprapundh *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004; Stephens *et al.*, 2006), die Verbesserung der Aktivität (Ness *et al.*, 2002; Terao *et al.*, 2006), die Veränderung der Spezifität (Cho *et al.*, 2004; Hancock *et al.*, 2006) sowie die Optimierung der (Stereo-) Selektivität im Vordergrund (Jaeger & Eggert, 2004; Reetz *et al.*, 2006).

In vitro Mutagenese-Methoden

Im Prinzip sind zwei generelle Methoden der gerichteten Evolution zu unterscheiden: Zum einen die nicht-rekombinativen und zum anderen die rekombinativen Methoden. In dem nun folgenden Abschnitt soll ein Überblick über einige ausgewählte Methoden gegeben werden. Dabei richtet sich das Hauptaugenmerk auf Ansätze der nicht-rekombinativen Methode, da diese in der vorliegenden Arbeit angewandt wurden.

Die rekombinativen Ansätze werden generell in Homologie-abhängige und Homologie-unabhängige Methoden unterteilt. Vorreiter sämtlicher Homologie-abhängiger Rekombinationsmethoden ist das im Jahr 1994 von W. P. C. Stemmer entwickelte DNA-Shuffling (Stemmer, 1994 a/b). Hierbei werden Varianten eines Gens oder verschiedene, homologe Gene (Cramer *et al.*, 1989) durch einen DNase-Verdau fragmentiert und anschließend in einem PCR-ähnlichen Ansatz wieder zusammengefügt. Vom DNA-Shuffling ausgehend wurden weitere Variationen entwickelt, die Gegenstand einer Vielzahl von Artikel waren (Zhao & Arnold, 1997; Coco *et al.*, 2002; Zha *et al.*, 2003; Eggert *et al.*, 2005; Bloom *et al.*, 2005). Die Pioniermethode der Homologie-unabhängigen Ansätze ist „Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes“ (ITCHY) (Ostermeier *et al.*, 1999 a/b; Lutz *et al.*, 2001 a). Dabei werden die zu rekombinierenden Gene mittels Endonuklease III restringiert und anschließend fusioniert. So entstehen Gen-Chimären mit je einem Crossover. Weitere Homologie-unabhängige Methoden sind z. B. SCRATCHY (Lutz, 2001 b), SHIPREC (Sieber *et al.*, 2001), SCOPE (O’Maille *et al.*, 2002) und SISDC (Hiraga & Arnold, 2003).

Zu den nicht-rekombinativen Ansätzen zählt die Methode der fehlerhaften PCR (error prone PCR [epPCR]). Sie ist die am häufigsten gewählte Methode zu Beginn einer gerichteten Evolution. Hierbei nutzt man die fehlende Korrekturlese-Fähigkeit der Taq-DNA-Polymerase (Tindall & Kunkel, 1988; Eckert & Kunkel, 1990) und die dadurch entstehende natürliche Fehlerrate während der Genamplifizierung. Diese wird durch die Zugabe von Additiven wie $MnCl_2$ oder unphysiologisch hohen Konzentrationen von $MgCl_2$ erhöht (Cadwell & Joyce, 1992; Cirino *et al.*, 2003). Auch Polymerasen mit höheren Fehlerraten werden in der epPCR eingesetzt (Cline & Hogrefe, 2000; Biles & Connolly, 2004). Einen Nachteil dieser Methode stellt der degenerierte genetische Code dar, der dazu führt, dass einige AS-Austausche bevorzugt werden, während andere unwahrscheinlich und somit kaum zugänglich sind

(Eggert *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2006). Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurden weitere nicht-rekombinative Methoden entwickelt, die in ihrer Umsetzung jedoch aufwendiger sind. Im Rahmen der Sättigungsmutagenese wird die AS einer oder mehrere bestimmter Position(en) gegen jede andere natürlich vorkommende AS ausgetauscht. Dabei können alle 64 Basentriplets Anwendung finden oder nur ausgewählte, bedingt durch den degenerierten genetischen Code (Airaksinen & Hovi, 1998; Georgescu, 2003), was den Aufwand beim anschließenden Screening verkleinern soll (Hughes *et al.*, 2003).

Eine weitere Methode der nicht-rekombinativen Ansätze stellt der Alanin-scan dar, der es ermöglicht, gezielt den Einfluss ortsspezifischer AS-Austausche auf die Funktion des Proteins zu beobachten (Cunningham & Wells, 1989; Ashkenazi *et al.*, 1990; Weiss *et al.*, 2000; Morrison & Weiss, 2001). Dabei wird jede AS-Position des Proteins gegen die AS Alanin ausgetauscht. Wird diese bereits durch ein Alanin besetzt, wird dieses durch Prolin ersetzt. Diese Methode dient vorwiegend dem Verständnis von Struktur-Funktionsbeziehungen und nicht der Optimierung eines Proteins.

Einen guten Überblick über weitere Methoden bietet Wong *et al.*, 2006.

Die epPCR stellt aufgrund ihrer einfachen und schnellen Anwendbarkeit allerdings noch immer den häufigsten Startpunkt für die gerichtete Evolution von Proteinen dar. Der Erfolg dieser Methode zeigte sich bereits in Bereichen der Thermostabilität (Stephens *et al.*, 2006), der (Stereo-)Selektivität (Reetz, 2004), der Substratspezifität (Mahan *et al.*, 2004) sowie in der Optimierung der spezifischen Aktivität (Kim & Guengerich, 2004; Kumar *et al.*, 2005).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist die Aufklärung von Struktur- und Funktionsbeziehungen der Foldase LipH aus *P. aeruginosa*, um so ein Verständnis von den molekularen Grundlagen verschiedener Eigenschaften des Chaperons zu bekommen.

Ein essentieller Schritt für die Produktion enzymatisch aktiver und in das extrazelluläre Medium sekretierter Lipase ist die periplasmatische Faltung und der sich daran anschließende Export über die äußere Membran.

Die Faltung sekretorischer Proteine erfolgt im Periplasma unter Mitwirkung spezifischer sowie unspezifischer periplasmatischer Faltungsmediatoren, wobei enzymatisch aktive periplasmatische Intermediate gebildet werden (Hamood *et al.*, 1990; Pugsley, 1992; Frenken

et al., 1993 a/b; Lu *et al.*, 1993; Bortoli-German *et al.*, 1994; Hardie *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 1996).

Die Foldase LipH stellt einen solchen spezifischen Faltungshelfer dar und ist neben der Faltung wahrscheinlich auch an dem Export der Lipase beteiligt (Filloux *et al.*, 1998; Sandkvist, 2001; Pauwels *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit soll die Foldase LipH einem vollständigen „Alaninscan“ unterzogen werden. Der Austausch jeder der 340 AS zu Alanin bzw. Prolin soll eine gezielte Analyse definierter Bereiche des LipH-Proteins auf ihre Beteiligung an der Aktivierung bzw. Sekretion der Lipase hin ermöglichen.

Im Gegensatz zum Alaninscan soll die Methode der fehlerhafte PCR eine schnelle Möglichkeit darstellen, Punktmutationen über das gesamte Gen zu verteilen. Austausche in der AS-Sequenz können so zu einer Veränderung der Faltungseigenschaften führen, ohne sich dabei auf bestimmte Regionen festzulegen.

Das darauf folgende Screening findet sowohl im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) als auch im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 statt. Dabei dient die Lipase-Aktivität als Indikator für funktionales LipH. Darüber hinaus sollen die *in vivo*-Ergebnisse durch *in vitro*-Versuche zur Protein-Faltung mit gereinigten Proteinen ergänzt werden.

Die gewonnenen Ergebnisse sollen zum Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehungen der Foldase sowie der zugehörigen Lipase beitragen und dadurch zu neuen Erkenntnissen im Bereich der Proteinfaltung führen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

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

Antibiotika: Gerbu (Geilberg), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen).

Chemikalien: Biomol (Hamburg), Fluka (Sternheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg).

Enzyme: Restriktionsenzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Weitere Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Lysozym, Sigma (Deisenhofen); T4-DNA-Ligase, Ribonuclease A und T4-DNA-Polymerase, MBI Fermentas (St. Leon-Rot); *Pfu*-DNA-Polymerase, Stratagene (Heidelberg); DNaseI, Promega (Mannheim); Reverse Transkriptase, Invitrogen (Karlsruhe).

Medienkomponenten: Difco (Detroit, USA), Gibco BRL (Eggenstein), Oxoid (Wesel).

Antikörper: Der Zweitantikörper, Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat, wurde von der Firma Bio-Rad (München) bezogen.

2.2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196 (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
<i>Escherichia coli</i> JM101	F' <i>traD36 lacI^q</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15 proAB Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>thi supE1</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>Escherichia coli</i> S17-1	Ec294::[RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)], <i>pro, res, recA, tra⁺, Tp^r, Sm^r</i>	Simon <i>et al.</i> , 1986
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F' <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (λ ts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-</i> <i>T7gene1</i>)	Studier & Moffat, 1986
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F- <i>gyrA462 endA1</i> Δ (<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB</i> <i>mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) supE44 ara14</i> <i>galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) syl5</i> Δ <i>leu mlt1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PABST7.1	Δ (<i>3/4lipA/1/3lipH</i>), miniD-180 (Tc: <i>lacI^q</i> P _{lacUV5-T7 gene 1})	Jaeger <i>et al.</i> , 1997

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide.

Vektoren für <i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz
pBluescript II KS+ (pBKS)	P _{T7} P _{T3} P _{lac} <i>lacZ'</i> Amp ^r ColE1	Stratagene, Heidelberg
pBluescript II SK+ (pBSK)	P _{T7} P _{T3} P _{lac} <i>lacZ'</i> Amp ^r ColE1	Stratagene, Heidelberg
pET19b	ColE1 P _{T7} Φ ₁₀ Ap ^r <i>lacI'</i>	Novagen, Madison, USA
pGATRfA	Cmr Apr <i>ccdB attR1 attR2</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Vektoren mit weitem Wirtsbereich	Genotyp	Referenz
pBR22b	<i>rep mob lacZα</i> Cm ^r (MCS: pET22b+)	Rosenau, unveröffentlicht
pBBR1MCS	<i>lacZα</i> Cm ^r <i>rep mob</i>	Kovach <i>et al.</i> , 1994
rekombinante Plasmide	Genotyp	Referenz
pBBL7	pBBR1MCS + <i>XmnI/SmaI</i> -Fragment, 2,8 kb, <i>lipA/H</i> , P _{lac}	Düfel, unveröffentlicht
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i>	pBBR1MCS mit ca. 960 bp PCR-Fragment von <i>P. aeruginosa</i> (<i>lipA</i>) (<i>XbaI/BamHI</i>) aus pUCPL6AN	Janosch, 2002
pBBR1MCS/PA <i>lipH</i>	pBBR1MCS mit ca. 1000 bp PCR-Fragment von <i>P. aeruginosa</i> (<i>lipH</i>) (<i>XbaI/BamHI</i>) aus pUCPL6AN	Janosch, 2002
pBBR1MCS/PAL <i>lipA</i>	pBBR1MCS mit ca. 1000 bp PCR-Fragment von <i>P. alcaligenes</i> (<i>lipA</i>) (<i>NdeI/PpuMI</i>) aus pMAtrlip	Janosch, 2002
pBBR1MCS/BG <i>lipA</i>	pBBR1MCS mit ca. 1100 bp PCR-Fragment von <i>B. glumae</i> (<i>lipA</i>) (<i>NdeI/PpuMI</i>) aus genomischer DNA	Janosch, 2002
pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i>	pBBRPA- <i>lipA</i> mit <i>lipH</i> aus pBBRPA <i>lipH</i> (<i>NdeI/BamHI</i>)	Janosch, 2002
pBBR1MCS/PA <i>lipAH/ccdB</i>	1,7 kb- <i>ccdB</i> -Kassette aus pGATRfA in <i>Eco72I</i> des pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i>	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> MA+ verk. <i>lipH</i>	pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> mit <i>lipH</i> Δ AS 22-63 (<i>NdeI/BamHI</i>)	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> e <i>lipH</i> 1-16	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutationen <i>lipH</i> A103T, L133S, D152G	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> e <i>lipH</i> 1-36	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutationen <i>lipH</i> R151H, F195L	diese Arbeit

rekombinante Plasmide	Genotyp	Referenz
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>eplipH</i> 1-37	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> A282V	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>eplipH</i> 2-58	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutationen <i>lipH</i> M136T, K170Stopp, V232A	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>eplipH</i> 2-65	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> H182P	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>eplipH</i> 3-49	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutationen <i>lipH</i> V232G, Stopp341R	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>eplipH</i> 3-73	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutationen <i>lipH</i> P36L, Q279Stopp	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>eplipH</i> 4-15	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutationen <i>lipH</i> S48P, Q138R	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>eplipH</i> 4-25	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutationen <i>lipH</i> R258H, R327C	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>eplipH</i> 4-32	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutationen <i>lipH</i> R199H, E324G	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>eplipH</i> 4-37	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutationen <i>lipH</i> A132V, Q242L, E313G	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> S48P	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> S48P	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> A103T	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipHA</i> 103T	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> A132V	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> A132V	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> L133S	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> L133S	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> Q138R	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q138R	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> R151H	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> R151H	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> D152G	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> D152G	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> F195L	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> F195L	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> R199H	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> R199H	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> V232G	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> V232G	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> Q242L	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q242L	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> R258H	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> R258H	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> E313G	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> E313G	diese Arbeit

rekombinante Plasmide	Genotyp	Referenz
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> E324G	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> E324G	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> <i>lipH</i> R327C	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> R327C	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA</i> e <i>lipH</i> Stopp341R	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Stopp341R	diese Arbeit
pLipA-SS	pET19b mit PCR-Fragment von <i>P. aeruginosa</i> (<i>lipA</i>) ohne SS	Hausmann, unveröffentlicht
pEHTHis19	pET19b (985 bp ; <i>lipH</i> ₇)	Jorasch, 1996
pET19b/PAL <i>lipA</i>	pET19b mit <i>P. alcaligenes lipA</i>	diese Arbeit
pET19b/BG <i>lipA</i>	pET19b mit <i>B. glumae lipA</i>	diese Arbeit
pET19b/PA verkürztes <i>lipH</i>	pET19b mit <i>P. aeruginosa lipH</i> $\Delta_{AS 1-63}$	diese Arbeit
pET19b/ PA MA+ verk. LipH	pET19b mit <i>P. aeruginosa lipH</i> $\Delta_{AS 22-63}$	diese Arbeit
pET19b/PA <i>lipH</i> G39A	pET19b mit <i>P. aeruginosa lipH</i> G39A (<i>NdeI/BamHI</i>) aus pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> G39A	diese Arbeit
pET19b/PA <i>lipH</i> S48P	pET19b mit <i>P. aeruginosa lipH</i> S48P (<i>NdeI/BamHI</i>) aus pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> S48P	diese Arbeit
pET19b/PA <i>lipH</i> E51A	pET19b mit <i>P. aeruginosa lipH</i> E51A (<i>NdeI/BamHI</i>) aus pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> E51A	diese Arbeit
pET19b/PA <i>lipH</i> V232G	pET19b mit <i>P. aeruginosa lipH</i> V232G (<i>NdeI/BamHI</i>) aus pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> V232G	diese Arbeit
pET19b/PA <i>lipH</i> P234A	pET19b mit <i>P. aeruginosa lipH</i> P234A (<i>NdeI/BamHI</i>) aus pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234A	diese Arbeit
pET19b/PA <i>lipH</i> P234K	pET19b mit <i>P. aeruginosa lipH</i> P234K (<i>NdeI/BamHI</i>) aus pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234K	diese Arbeit
pET19b/PA <i>lipH</i> Stopp341R	pET19b mit <i>P. aeruginosa lipH</i> Stop341R (<i>NdeI/BamHI</i>) aus pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Stopp341R	diese Arbeit
pET19b/PA e <i>lipH</i> 3-49	pET19b mit <i>P. aeruginosa lipH</i> 3-49 (<i>NdeI/BamHI</i>) aus pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> 3-49	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Als Startermoleküle für die Polymerasekettenreaktion wurden die in Tabelle 2.3 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Diese wurden in HPLC-gereinigter, lyophilisierter Form von den Firmen Eurogentec (Seraing, Belgien) und Thermo BioSciences GmbH (Ulm) bezogen. Sie wurden in dem vom Hersteller angegebenen Volumen A. dest. aufgenommen, sodass sie in einer Konzentration von 100 pmol/μl vorlagen.

Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Länge (bp)
M13 forward	5' – GTAAAACGACGGCCAGT – 3'	17
M13 reverse	5' – GGAAACAGCTATGACCATG – 3'	19
LipH Up verkürzt	5' – CATATGCCGCTGCCAACCTCC – 3'	21
Membrananker Up	5' – CTAGCATATGAAGAAAATCCTCCTGCTGATTCCACTGG CGTTCGCCGCCAGCCTGGCCTGGTTCGTCTGGGC – 3'	72
Membrananker Down	5' – TAGCCCAGACGAACCAGGCCAGGCTGGCGGCGAACGCC AGTGGAAATCAGCAGGAGGATTTTCTTCATATG – 3'	70
pBSK1*	5' – AGGAGGATTTTCTTCATT – 3'	18
pBSK2*	5' – GAGCAGCGCTGAGGATC – 3'	17
Ht Up	5' – AAAACATATGCTGGAACCTTCCCCCGCAC – 3'	29
Ht Down	5' – AAAAGGATCCTCAGCGCTGCTCGGCCTGGCGCATC – 3'	35
PA lipH S48P	5' – CACCGCTTCTCCCGCGGGGGCTGCTGGCGGGGC – 3'	33
PA lipH A103T	5' – GGGCTCTTCGCCGACCGTGCTGAGGAAGTAGTC – 3'	33
PA lipH A132V	5' – CTGCATCAGCGCCAACACCTGGCCGCGCGCCGG – 3'	33
PA lipH L133S	5' – TTGCTGCATCAGCGCCGACGCCTGGCCGCGCGC – 3'	33
PA lipH Q138R	5' – CTTGTAGTCGATGTATCGCTGCATCAGCGCCAA – 3'	33
PA lipH R151H	5' – CAGGCGCGGCAGGTCGTGTTTCGAGCAGCACCAG – 3'	33
PA lipH D152G	5' – GGCCAGGCGCGGCAGGCCGCGTTCGAGCAGCAC – 3'	33
PA lipH F195L	5' – GAAACCTACAACCAGCTCACCTGGAGCGCCTG – 3'	33
PA lipH R199H	5' – CAGTTCACCTGGAGCACCTGGCGATCCGCCAG – 3'	33
PA lipH V232G	5' – GACCAGCAGGAAAGCGGGCTGCCGCAACTGCAA – 3'	33
PA lipH Q242L	5' – CAAAGCGAACTGCAGCTGCAGACCGCCGCCCTC – 3'	33

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Länge (bp)
PA lipH R258H	5' – GGCCCGGAAGCCATCC <u>ACC</u> AGATGCGTCAGCAA –3'	33
PA lipH E313G	5' – CGCCGCGCGGCGGT <u>CGGAC</u> GCCTGGCCGAGGAG –3'	33
PA lipH E324G	5' – CGCTTCAGCGAACAG <u>GGAC</u> CGCTTGCGCCTGGGC –3'	33
PA lipH R327C	5' – GAACAGGAACGCTT <u>TGTGC</u> CTGGGCGCGCTGGAA –3'	33
PA lipH Stopp341R	5' – CAGGCCGAGCAGCGC <u>AGAG</u> GATCCCCCGGGCTG –3'	33

2.4 Anzucht von Bakterien

Alle Nähr- und Testmedien wurden 20 min bei 121 °C und 200 kPa sterilisiert. Hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter, Porendurchmesser 0,25 o. 0,45 µm) und dem Medium (≤ 60 °C) nachträglich zugesetzt.

2.4.1 Nährmedien

Luria-Bertani-Medium (LB) (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g/l Trypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefextrakt

NB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

8 g/l Bouillon (Lab Lemco Broth, Oxoid); 4 g/l NaCl

SOB-Medium

20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl

SOC-Medium

20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,58 g/l NaCl; 0,19 g/l KCl; 10 ml/l 1 M MgSO₄; 20 ml/l 1 M Glucose; 10 ml/l 1 M MgCl₂

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

2.4.2 Testmedien

α -Komplementations-Agar (Sambrook *et al.*, 1989)

1 ml 100mM IPTG in 70 % (v/v) Ethanol; 5 ml 2 % (w/v) X-Gal in DMF; 300 ml LB-Agar

Tributyryn-Agar (Kok *et al.*, 1993)

7,5 ml Tributyrin und 0,75 g Gummi arabicum ad 15 ml A. dest. mischen, das Tributyrin mit Ultraschall (3 min, 75 W, 100 %) emulgieren und zu 500 ml autoklaviertem LB-Agar (60 °C) geben. Lipolytische Aktivität zeigt sich durch Bildung klarer Höfe um die Bakterienkolonie.

2.4.3 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Kulturen von *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden in LB-Medium angelegt und bei 37 °C bebrütet. Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden auf einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg), größere Volumina im Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH), bei 180–220 UpM kultiviert. Dabei entspricht das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer-Kolbens 1:10. Zur Überexpression der heterologen Gene wurde die Expression der T7-RNA-Polymerase bei dem Erreichen einer $O.D._{580nm} = 0,5 - 0,8$ durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,4 mM) induziert. Stämme mit plasmid- oder genomkodierten Resistenzmarken wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Tab. 4) kultiviert. Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Hauptkulturen wurden aus einer ÜK auf eine $O.D._{580nm} = 0,05$ beimpft. Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedien ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7,5 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80 °C eingefroren.

Tab. 2.4: Endkonzentrationen der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration für <i>E. coli</i> (µg/ml)	Konzentration für <i>P. aeruginosa</i> (µg/ml)
Ampicillin	100	-
Carbenicillin	-	600
Chloramphenicol	50	300
Gentamycin	-	25

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte nach der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder durch die Verwendung von Mini- und Midipräp-Kits der Firmen Invitex (Berlin) und Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller.

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

2.6 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA und RNA sowie der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 0,6 - 2 %igen (w/v) Agarosegelen. Als Elektrophoresepuffer wurde $0,5 \times$ TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na_2 - EDTA; pH 8,3) verwendet. Als Größenstandard für die DNA-Gele wurde die „1kb-ladder“ von Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf dem „Gel Print 2000i“-

Videodokumentationssystem der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sowie mittels des „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep® Gel cleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

2.7 *In vitro*-Rekombination von DNA

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

2.8 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden nach Hanahan (1983) durchgeführt.

2.9 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Mobilisierbare Plasmide wurden in Zellen von *P. aeruginosa* durch di-parentale Konjugation eingebracht. Dabei wurde je 1 ml einer ÜK des Plasmid-haltigen Donorstamms *E. coli* S17-1 mit 1 ml Zellen des jeweiligen Rezipientenstammes von *P. aeruginosa*, die zuvor für 10 min bei 46 °C inkubiert wurden, gemischt und durch Zentrifugation (3 min; 5.000 g; RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für mindestens 4 h bei 37 °C auf einer LB-Agarplatte inkubiert, bevor diese in 1 ml LB-Medium resuspendiert und in Verdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁻⁶ auf Selektivagar ausplattiert wurden. Zur Kontraselektion des Donorstamms enthielt der Selektivagar zusätzlich 25 µg/ml Irgasan (Ciba Geigy, Basel, Schweiz).

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.10.1 Standard-PCR

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 ng Plasmid- oder 10 ng genomische DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 1 × (2 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 „NucleoSpin Extract“-Kits der Firma

Macherey & Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers. Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen.

2.10.2 Ortsspezifische Mutagenese

Zielgerichtete Basenaustausche wurden mit der „Megaprimer“-Methode nach Baretino *et al.* (1994) in das *lipH*-Strukturgen von *P. aeruginosa* eingeführt. Dabei wurde mit einer ersten Standard-PCR (siehe 2.11.1) ein Megaprimer synthetisiert, der durch den eingesetzten Mutagenese-Primer (Tab. 2.3 und Tab. 8.4) die gewünschte Punktmutation enthielt. Als weiteres DNA-Startermolekül wurde das Oligonukleotid „M13 forward“ verwendet. Da die zielgerichteten Basenaustausche über das gesamte *lipH*-Strukturgen verteilt sind, wurden zwei verschiedene Plasmide als Matrizen-DNA verwendet, um so die Größe des Megaprimers zu begrenzen. Für Basenaustausche bis AS-Position 179 wurde das Plasmid pBKS/*lipH BamHI/AflI*-Verkürzt verwendet, für Austausch ab AS-Position 180 bis 340 wurde das Plasmid pBSK/*lipH AflI/XbaI*-Verkürzt verwendet. In einer zweiten PCR (siehe 2.11.1) wurden zur Amplifizierung des kompletten *lipH*-Gens der Megaprimer zusammen mit den flankierenden DNA-Startermolekülen „M13 forward“ und „M13 reverse“ eingesetzt. In dieser zweiten PCR-Reaktion wurde als Matrizen-DNA für Basenaustausche bis AS-Position 179 das Plasmid pBKS/*lipH XbaI/AdeI*-Verkürzt und für Austausch ab AS-Position 180 bis 340 das Plasmid pBSK/*lipH AdeI/BamHI*-Verkürzt eingesetzt. Da diese Plasmide keine Bindungsstellen für das PCR-Startermolekül „M13 forward“ boten und das Oligonukleotid „M13 reverse“ nicht mit der Matrizen-DNA der ersten PCR (pBKS/*lipH BamHI/AflI*-Verkürzt bzw. pBSK/*lipH AflI/XbaI*-Verkürzt) hybridisieren konnte, wurde eine Amplifikation der *lipH*-Wildtyp-Sequenz vermieden.

2.10.3 Fehlerhafte PCR (epPCR)

Es wurde eine Fehlerrate von 2-4 Basensubstitutionen pro Gen durch folgenden Reaktionsansatz erreicht:

25 pmol von jedem Oligonukleotid, 75 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 1,5 mM MgCl₂, 0,15 mM MnCl₂, 10 mM dNTPs, 1 ng Matrizen-DNA, 10 U *Taq*-Polymerase (2.1).

Die PCR wurde wie unter 2.10.1 durchgeführt.

Als Matrizen-DNA diente das Plasmid pBBR1MCS/PA *lipH*, als Primer die Oligonukleotide „M13 forward“ und „M13 reverse“. Durch mehrere parallele epPCR-Ansätze, welche anschließend vereint wurden, wurde eine höhere Diversität der eingeführten Mutationen gesichert.

2.10.4 Sättigungsmutagenese

Sättigungsmutagenesen wurden durchgeführt, um ein bestimmtes Basen-Triplett vollständig zu mutagenisieren und so im Austausch gegen die Wildtyp-AS sämtliche anderen natürlichen AS an dieser Position in das LipH-Protein einzuführen. Für die Sättigungsmutagenese wurde ebenfalls die von Baretino *et al.* (1994) beschriebene Methode der „Megaprimer“-PCR (2.10.2) verwendet. Da die Sättigungsmutagenese an den

Positionen AS 234 und AS 241 durchgeführt wurde, wurde als Matrizen-DNA in der ersten Standard-PCR das Plasmid pBSK/lipH *AflI/XbaI*-Verkürzt und in der zweiten Reaktion das Plasmid pBSK/lipH *AflI/XbaI*-Verkürzt verwendet. Die Tabelle der verwendeten Sättigungsmutagenese-Primer befindet sich im Anhang (Tab. 8.5, 8.6).

2.11 Sequenzierung von DNA

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

2.12 Herstellung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten

Um die Expression plasmidkodierter Proteine in Zellextrakten von *E. coli* und *P. aeruginosa* nachzuweisen und den zeitlichen Verlauf zu analysieren, wurden Kulturüberstände und Gesamtzellextrakte (GZE) hergestellt. Diese wurden dann in Enzymtests (2.15), Coomassie-Brilliant-Blue gefärbten SDS-PAGEs (2.18) oder durch einen immunologischen Nachweis (2.19) untersucht. Aus den Expressionskulturen (2.4.3) wurden Proben entnommen und die Zelldichte über Messung der O.D._{580nm} bestimmt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 13000 UpM, EZ, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, im Bedarfsfall sterilfiltriert (Schleicher & Schüll, NC45 Membranfilter, 0,45 µm Porendurchmesser) und/oder konzentriert (Amicon, Centricon 10) und sofort verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Das Zellsediment wurde für die Herstellung von GZE verwendet. Das Zellsediment wurde in einem Volumen SDS-Probenpuffer aufgenommen, so dass 10 µl der Lösung einer O.D._{580nm} = 0,15 entsprachen. Dann wurde die Probe für 10 min bei 98 °C denaturiert und einer SDS-PAGE (2.18) unterzogen.

2.13 Herstellung von Ganz-Zell-Lysaten

Nach erfolgter Expression wurden die Kulturen durch Zentrifugation (20 min, 8000 x g, 4 °C, Sorvall-Kühlzentrifuge) geerntet. Das Zellsediment wurde in einem Volumen Zellaufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 2mM EDTA) resuspendiert und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson-Sonifier W250, 2 x 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Das Ganz-Zell-Lysat wurde in Enzymtests (2.15) eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.14 Membranfraktionierung

Zur Membranfraktionierung wurden aus dem gewonnenen Ganz-Zell-Lysat durch Zentrifugation (5 min, 5.000 UpM, RT) die Zelltrümmer entfernt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 min, 14.000 UpM, RT) wurden die sedimentierten Membranproteine direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen und über eine SDS-PAGE (2.18) analysiert.

2.15 Bestimmung der Lipaseaktivität (Winkler & Stuckmann, 1979)

In basischer Lösung adsorbiert abgespaltenes *p*-Nitrophenol Licht der Wellenlänge $\lambda = 410$ nm. Die $O.D._{410nm}$ ist somit ein Maß für die Aktivität der Lipase.

Substratemulsion: 207 mg Natriumdesoxycholat, 100 mg Gummi arabicum, 90 ml Sörensen Phosphatpuffer pH 8,0 (Lösung A: 8,9 g/l Na_2HPO_4 , Lösung B: 0,68 g/l KH_2HPO_4 [A:B \rightarrow 17:1]); 30 mg *p*NP Palmitat in 10 ml Isopropanol. Pro Reaktion wurden 2,5 ml Substratemulsion mit 20-100 μ l Probe vermischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die $O.D._{410nm}$ der einzelnen Ansätze im Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) gemessen. Angegeben werden die Werte als relative Aktivität, wobei die $O.D._{410nm}$ auf 1 ml Probenvolumen und auf die Zelldichte ($O.D._{580nm}$) bezogen ist ($O.D._{410nm}/O.D._{580nm} \times ml$).

2.16 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen von Kulturüberständen und GZE wurden nach den Methoden von Bradford (1976) oder mit Hilfe des „BCA Protein Assay“ (Pierce, Rockford, USA) ermittelt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.17 Präzipitation von Proteinen (Peterson, 1977)

Proteinproben wurden mit 0,1 Volumen Natriumdesoxycholat-Lösung vermischt, mit 0,2 Volumen 70 %iger (w/v) Trichloressigsäure versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (30 min, 13.000 UpM) wird das Sediment zweimal mit 80 % Aceton gewaschen und getrocknet.

2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli *et al.* (1970) bestehend aus einem 5 % Sammel- und einem 12 % Trenngel. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerin; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und vor dem Auftragen 5 min bei 95 °C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma Bio-Rad (München) bei einer Spannung von 100-200 V. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Merrill (1990) mit „Coomassie Brilliant Blue R-250“ (Serva, Heidelberg) oder mittels „SimplyBlue SafeStain“ (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt. Gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese durch TCA-Fällung (2.17) präzipitiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.19 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung der Apparatur „Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ (Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad, München) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte mittels Elektroblob in einem von Dunn (1986) beschriebenen Puffer (10 mM NaHCO₃; 3 mM Na₂CO₃; 20 % (v/v) Methanol) bei 150 mV für 15 min und bei 300 mV für weitere 20 min. Die PVDF-Membran wurde anschließend in TBST (50 mM Tris/HCl pH 6,8; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0,2 % (v/v) Tween 20) mit 2,5 % (w/v) Milchpulver blockiert.

Der indirekte immunologische Nachweis von dem auf der PVDF-Membran immobilisierten LipA- und LipH-Protein erfolgte unter Verwendung eines LipA- bzw. LipH-spezifischen polyklonalen Antiserums in einer Verdünnung von 1:50.000 bzw. 1:200.000. Die Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „ECL-Western Blotting Detection“-System (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, Großbritannien) unter Verwendung des Zweit-Antikörpers Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Bio-Rad, München) in einer Verdünnung von 1:5.000.

2.20 Reinigung von LipA-„inclusion-bodies“ (modifiziert nach Joly & Swartz, 1994)

In *E. coli* BL21(DE3)/pLipA-SS wurde das Lipasegen unter Kontrolle eines T7-Expressionssystem überexprimiert. Nach Induktion und 2 h Wachstum wurde die Zelldichte der Kultur bestimmt und die Zellen sedimentiert (20 min, 9000 UpM, GSA, 4 °C). Das Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen Zellaufschlusspuffer (150 mM Tris) resuspendiert, so dass eine Zelldichte von O.D._{580nm} = 20 erreicht wurde, und die Zellen aufgeschlossen (2.13). Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 10.000 UpM, SS34, 4 °C) wurde das Sediment in Puffer 2 (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 1 % Lauryl-Sarcosin) aufgenommen und für 15 min bei RT inkubiert, sodass das in Puffer 2 enthaltene Lauryl-Sarcosin die Membranen der Bakterienzelle solubilisieren konnte. Dieser Extraktionsschritt wurde nach einer weiteren Zentrifugation (20 min, 10.000 UpM, SS34, 4 °C) wiederholt. Anschließend wurde die Probe noch einmal zentrifugiert und das Pellet, welches die gereinigten Lipase „inclusion-bodies“ enthielt, in 10 ml Puffer 1 (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA) aufgenommen. Die Ausbeute und der Erfolg der Reinigung wurden durch eine SDS-PAGE (2.18) analysiert.

2.21 *In vitro*-Renaturierung der LipA-„inclusion-bodies“

Die gereinigten „inclusion bodies“ (2.20) wurden in 8 M Harnstoff aufgenommen und durch Inkubation für 1 h bei 37 °C vollständig denaturiert. Daraufhin wurden die „inclusion-bodies“ 1:10 im Rückfaltungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 3,5 mM CaCl₂, 45 % (v/v) Glycerol, 0,7 mM Laurylmaltosid [modifiziert nach Schneidinger, 1997]), der - wenn nicht anders angegeben - eine äquimolare Menge LipH- NHis enthielt, verdünnt. Nach Inkubation für 3 h bei 30 °C wurde das renaturierte LipA einem Aktivitätstest (2.15) unterzogen.

2.22 Reinigung von LipH als Poly-Histidin-Fusionsprotein

Für die Reinigung der in Form eines Poly-Histidin-Fusionsproteins in *E. coli* BL21(DE3)/pEHTHis19 überexprimierten LipH-Varianten wurde die immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) angewendet. Dazu wurden über Nitrilo-3-Essigsäure (NTA) an die Matrix (Sepharose CL-6B) gebundene Nickel-Ionen (Ni^{2+} -NTA-Gelmaterial, Qiagen) gewählt, da sie die größte Selektivität für die in *E. coli* überexprimierten, rekombinanten Poly-Histidin-Fusionsproteine im Vergleich mit dem Hauptteil der Wirtsproteine besitzen (Lindner *et al.*, 1992).

Vor dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit mindestens 5 Säulenvolumen Equilibrierungspuffer (20 mM Imidazol, 10 % (v/v) KPi-Stocklösung, pH 8 (500 mM KH_2PO_4 , 50 mM Tris), 300 mM NaCl) gespült. Dieser enthielt geringe Imidazolkonzentrationen, um unspezifische Protein-Bindungen von Nicht-Poly-Histidin-Fusionsproteinen zu verhindern. Anschließend wurde das Ganz-Zell-Lysat (O.D._{580nm} = 20/ml) auf die Säule aufgetragen. Nachdem mit 3 Säulenvolumen Equilibrierungspuffer gewaschen wurde, wurden unspezifisch gebundene Proteine durch Auftragen von 3 Säulenvolumen Waschpuffers (50 mM Imidazol, 10 % (v/v) KPi-Stocklösung, pH 8, 300 mM NaCl) entfernt. Nach der Elution des Poly-Histidin-Fusionsproteins mit Elutionspuffer (250 mM Imidazol, 10 % (v/v) KPi-Stocklösung, pH 8, 300 mM NaCl) im Ausgangsvolumen des Ganz-Zell-Lysats, wurde die Säule mit 3 Volumen 0,5 M NaOH gespült und bis zur nächsten Benutzung mit 20 % (v/v) Ethanol befüllt. Der Erfolg und die Qualität der Reinigung wurden über Aliquots von der Durchlauf- und Waschfraktion sowie dem Eluat kontrolliert, welche mittels einer SDS-PAGE (2.18) analysiert wurden.

2.23 Interaktionsversuche

Um die Interaktionen und deren Unterschiede zwischen dem LipA-Protein und den LipH-Varianten zu untersuchen, wurden die LipH-Varianten mittels Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Hilden) immobilisiert. Dazu mussten die aufgereinigten LipH-Varianten (2.22) vom Elutionspuffer (250 mM Imidazol) in den Equilibrierungspuffer (20 mM Imidazol) mittels Vivaspin 10 (Sartorius AG, Göttingen) umgepuffert werden.

Das aufgereinigte LipA wurde auf 3 mg/ml eingeeengt (Vivaspin10), 1:10 in Rückfaltungspuffer (2.21) verdünnt und für 3 h bei 30 °C inkubiert.

Anschließend wurden in Überschuss 300 µg LipH zu 500 µl Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Bindekapazität: 300 µg Protein/ml) gegeben und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Mittels eines magnetischen Separators wurden die Beads immobilisiert und der Überstand abgenommen (Durchlauf LipH). Die Beads wurden für 10 min mit Waschpuffer (2.22) gewaschen (Waschfraktion 1). Nun wurden zwischen 150-300 µg „nah natives“ LipA zu den Beads gegeben und für 3 h bei 30 °C inkubiert. Nach 1 min auf dem magnetischen Separator wurde der Überstand abgenommen (Durchlauf LipA) und die Beads für 10 min mit Rückfaltungspuffer (2.22) gewaschen (Waschfraktion 2). Die Elution des LipAH-Komplexes erfolgte mittels Elutionspuffer (2.22) für 30 min bei 30 °C. Nach 1 min auf dem magnetischen Separator wurde der Überstand abgenommen (Eluat), die Beads mit 20 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 20 % (v/v) Ethanol bei 4 °C gelagert.

Die Interaktion wurde über Aliquots von der Durchlauf- und Waschfraktion sowie dem Eluat kontrolliert, welche mittels einer SDS-PAGE (2.18) analysiert wurden.

2.24 Computerprogramme und Datenbanken

Die Erstellung von Klonierungsstrategien erfolgte unter Verwendung der Programme "Clone Manager for Windows 7.03" (Scientific & Educational Software) und "Plasmid Map Enhancer for Windows 95, Version 3.0" (Scientific & Educational Software).

Abbildungen von Proteinstrukturen wurden mit den Programmen „UCSF Chimera“(University of California, USA) oder „Deep View/ Swiss-Pdb Viewer 3.7“ erstellt. Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997).

Für Sequenz- und Datenbankrecherchen im Internet wurden folgende Adressen verwendet:
„National Center for Biotechnological Information“ (NCBI):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

„*Pseudomonas* Genome Project“:

<http://www.pseudomonas.com>

3. Ergebnisse

3.1 Mutagenese des Chaperons LipH

Um AS-Positionen der Foldase, die an der Aktivierung bzw. Sekretion der Lipase beteiligt sind, zu identifizieren, wurde das Chaperon LipH in der vorliegenden Arbeit einem *in vitro*-Evolutionprozess unterzogen. Die Überprüfung hinsichtlich möglicher Veränderungen der Lipaseaktivität, der Enantioselektivität oder Stabilität ist dabei über das zu aktivierende Enzym LipA möglich. Zudem sollte auf diese Weise die Frage geklärt werden, ob diese Methodik prinzipiell geeignet ist, eine Veränderung der Eigenschaften des Katalysators ausschließlich über die gerichtete Evolution des Faltungshelfers zu bewirken.

3.1.1 Fehlerhafte PCR des *lipH*-Gens aus *P. aeruginosa*

Zur gerichteten Evolution des Chaperons LipH wurde die Methode der fehlerhaften PCR (epPCR) gewählt, da diese Methode eine schnelle Möglichkeit darstellt, Mutationen über das gesamte Gen verteilt einzuführen. Austausche in der AS-Sequenz können so zu einer Veränderung der Faltungseigenschaften führen, ohne sich dabei auf bestimmte Regionen festzulegen. Schon aus anderen Beispielen ist bekannt, dass zum Teil weit vom aktiven Zentrum entfernte Austausche zu einer Verbesserung der katalytischen Eigenschaften führen können (Liebeton *et al.*, 2000; Bocola *et al.*, 2004; Reetz *et al.*, 2007).

Die Reaktionsbedingungen der epPCR wurden durch erhöhte MgCl₂- und MnCl₂-Konzentrationen so eingestellt, dass eine Fehlerrate von ca. drei Basen-Austauschen auf 1 kb erhalten wurde. Bei einer Größe von 1023 Basen kam es so zu maximal drei AS-Austauschen pro LipH-Protein. Als Template für die epPCR diente der Vektor pBBR1MCS/PA *lipH* (Janosch, 2002). Mittels der Primer „M13 forward“ und „M13 reverse“ wurde das *lipH*-Gen amplifiziert. Um eine hohe Diversität der eingeführten Mutationen zu sichern, wurde das PCR-Produkt von zehn epPCR-Ansätzen vereint.

Aus vorangegangenen Arbeiten lag das Lipase/Foldase-Operon (LipAH-Operon) aus *P. aeruginosa* in dem Vektor pBBR1MCS unter Kontrolle des T7-Polymerase-abhängigen Promotors vor (Janosch, 2002), pBBRPA-*lipAH*. Dieser Shuttlevektor, der in *E. coli* ebenso wie in *P. aeruginosa* und weiteren Gram-negativen Bakterien stabil repliziert werden kann,

diente als Grundlage für den Ansatz eines Hochdurchsatzscreenings einer *lipH*-Varianten-Bank mit anschließender Sequenzierung der positiven Klone. Um in folgenden Klonierungsschritten eine ungewollte WT-*lipH*-Religation auszuschließen, wurde über die *Eco72I*-Schnittstelle die *ccdB*-Kassette (Invitrogen, Karlsruhe) in das WT-*lipH* inseriert. Das *ccdB*-Gen codiert für einen Gyrasehemmer, der in herkömmlichen Klonierungsstämmen, wie z. B. dem Stamm *E. coli* DH5 α , zu einer Veränderung der DNA-Topologie führt, indem er mit der DNA-Topoisomerase II (Produkt des *ccdB*-Gens) interagiert. Dadurch sind die Zellen nicht lebensfähig (Bernard & Couturier, 1992; Miki *et al.*, 1992). Für die Konstruktion des pBBRPA-*lipAH/ccdB*-Vektors mußte der *E. coli* Stamm DB3.1 verwendet werden. Dieser kann trotz Expression des *ccdB*-Gens überleben, da durch eine Mutation in dem *ccdB*-Gen, das für die Topoisomerase II codiert, das CcdB-Protein keinen Angriffspunkt hat.

Über die das *lipH*-Gen flankierenden Schnittstellen *PpuMI* und *BamHI* wurden die mutagenisierten PCR-Fragmente in den mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdauten Vektor pBBRPA-*lipAH/ccdB* kloniert. Dabei fällt das *lipH*-Gen samt inserierter *ccdB*-Kassette heraus (Abb. 8.2). Eine Religation des Vektors wurde durch eine Behandlung mit der alkalischen Phosphatase CIAP (Fermentas, St. Leon-Rot) verhindert. Der Expressionswirt *E. coli* BL21(DE3) wurde mit dieser epPCR-Bibliothek transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf 36 großen Soc-Cm²⁵-Platten ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert. Über eine Verdünnungsreihe, die auf kleinen Soc-Cm²⁵-Platten ausplattiert wurde, wurde die Anzahl der Transformanden bestimmt. Die auf diese Weise entstandene zufällig generierte ep-LipH-Bank hat eine Größe von 797.760.000 (ca. 8 *10⁸) Transformanden. Die Kolonien jeder großen Soc-Cm²⁵-Platte wurden nun mit je 4 ml Soc-Medium ab gespült und vereint. Nach Zugabe von 13 % (v/v) DMSO wurde die ep-LipH-Bank in 2 ml-Aliquots bei -80 °C eingefroren und steht so dauerhaft für Screening-Anwendungen auf verschiedene Eigenschaften zur Verfügung.

3.1.2 Alaninscan des *lipH*-Gens aus *P. aeruginosa*

Im Rahmen eines Alaninscans sollte eine vollständige Mutagenese-Bank angelegt werden, in der durch PCR-vermittelte Mutagenese jede einzelne Position des Chaperons gegen die AS Alanin ausgetauscht werden sollte. War diese Position bereits mit Alanin besetzt, wurde diese gegen Prolin ausgetauscht.

Im Gegensatz zur gerichteten Evolution des Chaperons LipH über die Methode der epPCR ist der Alaninscan ein deutlich aufwendigeres Verfahren. Sein Vorteil liegt darin, dass gezielt definierte Bereiche des LipH-Proteins auf ihre Beteiligung an der Aktivierung bzw. Sekretion der Lipase hin analysiert werden können.

Auf die Mutagenese der AS 1-21 wurde dabei verzichtet, da dieses hydrophobe Transmembransegment als Membrananker fungiert und selbst nicht für die Faltungsaktivität gebraucht wird (Shibata *et al.*, 1998 a; Quyen *et al.*, 1999; El Khattabi *et al.*, 2000).

Zur Konstruktion der ortsspezifischen LipH-Varianten mit AS-Einzelaustausch wurde eine PCR-Methode von Baretino *et al.* (1994) angewendet. In dieser wird in einer ersten PCR die gewünschte Substitution eingeführt, indem ein Mutagenese-Oligonukleotid (Tab. 8.4) zusammen mit einem gegenläufigen, universellen Oligonukleotid eingesetzt wird. Da das „Megaprimer“ genannte PCR-Produkt noch nicht das vollständige Zielgen umfasst, muss der Megaprimer zusammen mit zwei universellen Oligonukleotiden in einer zweiten PCR eingesetzt werden. Essentiell an dieser Methode ist die Verwendung einer Matrizen-DNA in der zweiten PCR, welche keine Bindestelle für das universelle „Up“-Oligonukleotid besitzt. Das „Up“-Oligonukleotid kann nur mit dem Megaprimer hybridisieren, wodurch sichergestellt wird, dass nur die mutagenisierte DNA, nicht aber die ebenfalls vorhandene Wildtyp-DNA exponentiell amplifiziert werden kann. Die Vorgehensweise nach Baretino *et al.* macht eine gelelektrophoretische Trennung von Megaprimer und Matrizen-DNA aus der ersten PCR mit anschließender Gelelution des Megaprimers nötig. Um diesen zeitaufwendigen Schritt bei 319 durchzuführenden Mutagenesen zu umgehen, wurde die Vorgehensweise nach Baretino *et al.* optimiert. Hierzu wurde in der zweiten PCR ein „Down“-Oligonukleotid ausgewählt, das nicht an der für die erste PCR ausgewählte Matrizen-DNA binden konnte. Somit wurde im Vergleich zu der Methode nach Baretino *et al.* die Isolierung des Megaprimers vermieden. Da im Rahmen des Alaninscans jede AS ausgetauscht werden soll und die Basenaustausche daher über das gesamte *lipH*-Strukturgen verteilt sind, wurden jeweils zwei verschiedene Plasmide als Matrizen-DNA verwendet, um so die Größe des Megaprimers zu begrenzen, pBKS/*lipH BamHI/AflI*-Verkürzt und pBSK/*lipH AflI/XbaI*-Verkürzt. Das Prinzip der in dieser Arbeit angewandten Methode zur Durchführung von ortsspezifischen Mutagenesen ist in Abb. 8.1 im Anhang dargestellt.

Über die das *lipH*-Gen flankierenden Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* wurden die mutagenisierten PCR-Fragmente in den mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdauten Vektor pBBRPA-*lipAH/ccdB* kloniert. Eine Religation des Vektors wurde durch

eine Behandlung mit der alkalischen Phosphatase CIAP (Fermentas, St. Leon-Rot) verhindert. Das so erstellte LipAH-Operon liegt in dem Vektor pBBR1MCS unter Kontrolle des T7-Polymerase-abhängigen Promotors vor.

Um den Erfolg der ortsspezifischen Mutation zu überprüfen, wurde der Klonierungsstamm *E. coli* DH5 α mit den erhaltenen Konstrukten transformiert und die anschließend isolierte Plasmid-DNA sequenziert. Von jeder Variante der in den Vektor pBBRPA-*lipAH/ccdB* ligierten PCR-Produkte wurde ein Teil zur dauerhaften Aufbewahrung bei -20 °C gelagert und steht dauerhaft für Screening-Anwendungen auf verschiedene Eigenschaften zur Verfügung. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die im Rahmen des Alaninscans erstellten Konstrukte.

L22A	T68A	D114A	D160A	G206A	A252P	E298A
E23A	S69A	R115A	A161P	K207A	G253A	G299A
P24A	F70A	L116A	L162A	L208A	P254A	N300A
S25A	R71A	R117A	R163A	S209A	E255A	T301A
P26A	G72A	A118P	Q164A	A210P	A256P	G302A
A27P	T73A	Y119A	R165A	E211A	I257A	L303A
P28A	S74A	I120A	E166A	E212A	R258A	S304A
E29A	V75A	A121P	A167P	K213A	Q259A	E305A
T30A	D76A	A122P	A168P	A214P	M260A	A306P
A31P	G77A	E123A	V169A	A215P	R261A	D307A
P32A	S78A	L124A	K170A	A216P	Q262A	R308A
P33A	F79A	Q125A	A171P	I217A	Q263A	R309A
A34P	S80A	E126A	L172A	D218A	L264A	A310P
S35A	V81A	P127A	R173A	R219A	V265A	A311P
P36A	D82A	A128P	A174P	L220A	G266A	V312A
Q37A	A83P	R129A	R175A	R221A	A267P	E313A
A38P	S84A	G130A	I176A	A222P	E268A	R314A
G39A	G85A	Q131A	F177A	S223A	A269P	L315A
A40P	N86A	A132P	S178A	L224A	T270A	A316P
V41A	L87A	L133A	N179A	P225A	T271A	E317A
H42A	L88A	A134P	E180A	E226A	R272A	E318A
A43P	I89A	L135A	A181P	D227A	L273A	R319A
P44A	T90A	M136A	H182A	Q228A	E274A	F320A
P45A	R91A	Q137A	V183A	Q229A	Q275A	S321A
A46P	D92A	Q138A	A184P	E230A	L276A	E322A
A47P	I93A	Y139A	F185A	S231A	D277A	Q323A
S48A	R94A	I140A	F186A	V232A	R278A	E324A
A49P	N95A	D141A	A187P	L233A	Q279A	R325A
G50A	L96A	Y142A	D188A	P234A	R280A	L326A
E51A	F97A	K143A	E189A	Q235A	S281A	R327A
A52P	D98A	K144A	E190A	L236A	A282P	L328A
V53A	Y99A	E145A	T191A	Q237A	W283A	G329A
P54A	F100A	L146A	Y192A	S238A	K284A	A330P
A55P	L101A	V147A	N193A	E239A	G285A	L331A
P56A	S102A	L148A	Q194A	L240A	R286A	E332A
Q57A	A103P	L149A	F195A	Q241A	L287A	Q333A

V58A	V104A	E150A	T196A	Q242A	D288A	M334A
M59A	G105A	R151A	L197A	Q243A	D289A	R335A
P60A	E106A	D152A	E198A	T244A	Y290A	Q336A
A61P	E107A	L153A	R199A	A245P	F291A	A337P
K62A	P108A	P154A	L200A	A246P	A292P	E338A
V63A	L109A	R155A	A201P	L247A	E293A	Q339A
A64P	Q110A	L156A	I202A	Q248A	K294A	R340A
P65A	Q111A	A157P	R203A	A249P	S295A	
L66A	S112A	D158A	Q204A	A250P	R296A	
P67A	L113A	L159A	D205A	G251A	I297A	

Tab. 3.1: Übersicht der erstellten AS-Austausche im Rahmen des LipH-Alanin-scans. Die grün markierten Austausche konnten als Volllängenprodukt im Rahmen der PCR amplifiziert und anschließend in den Vektor pBBRPA-*lipAH/ccdB* inseriert werden. Die Konstrukte werden bei -20 °C gelagert und stehen dauerhaft für Screening-Anwendungen auf verschiedene Eigenschaften zur Verfügung.

Es konnten 174 der 319 gewünschten AS-Austausche mittels PCR als Volllängenprodukt amplifiziert und anschließend in den Expressionsvektor inseriert werden. Bei der Vielzahl der durchzuführenden PCR-Reaktionen musste allerdings auf eine Optimierung der jeweiligen Reaktion verzichtet werden. Im Rahmen der Standard-PCR konnten daher 145 AS-Austausche nicht amplifiziert werden. Diese stammen vorwiegend aus der zweiten Hälfte des *lipH*-Gens. In diesem Bereich war der Amplifizierungserfolg deutlich geringer als in der ersten Hälfte. Es konnten lediglich 46 von 161 AS-Austauschen im Bereich von AS 180-340 als Volllängenprodukt amplifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnten in der ersten Hälfte 128 AS-Austausche im Bereich von AS 22-179 amplifiziert werden, lediglich 30 nicht. Die Amplifizierung der 46 PCR-Produkte der zweiten Hälfte war jedoch nur nach einer Linearisierung des Template-Vektors pBSK/*lipH AdeI/BamHI*-Verkürzt möglich, was ein Hinweis auf die Ausbildung von die Amplifizierung erschwerenden Sekundärstrukturen war. Die jeweilige Amplifizierung des Megaprimers hingegen stellte in keinem Fall ein Problem dar.

3.2 Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehung zwischen der Lipase LipA und ihrem Chaperon LipH

Zur Beantwortung der grundlegenden Frage, ob die *in vitro*-Evolution prinzipiell geeignet ist, die Aktivität eines Enzyms durch die gerichtete Evolution seines sterischen Chaperons zu erhöhen, wurde zuerst der auf der gerichteten Evolution basierende Ansatz der ep-LipH-Bank analysiert. Wie bereits angesprochen bot diese Methode im Gegensatz zum Alanin-scan eine

schnelle Möglichkeit, Punktmutationen über das gesamte Gen zu verteilen und den Einfluss der Austausch auf die Lipaseaktivierung zu untersuchen.

3.2.1 Screening der ep-LipH-Bank im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3)

Als heterologer Expressionswirt diente *E. coli* BL21(DE3). Transformiert mit dem Konstrukt pBBRPA-*lipAH* fungierte er als Positiv-Kontrolle, transformiert mit dem Vektor pBBR1MCS stellte der Expressionswirt eine Negativ-Kontrolle dar.

Indikatoragarplatten

Bei der Zufallsmutagenese entsteht eine Vielzahl von Varianten, welche anschließend auf ihre Eigenschaften getestet werden müssen. Das intermolekulare Chaperon LipH dient der Lipase LipA aus *P. aeruginosa* als Faltungshelfer. Ohne funktionelles LipH wird LipA katalytisch nicht aktiv. Daher stellte die Lipaseaktivität im Screening der ep-LipH-Varianten einen Indikator für funktionales LipH dar.

Das erste Screening fand auf Tributyrinagar-Cm²⁵-Platten statt. Dabei wird die Lipaseaktivität über eine Hofbildung um die jeweilige Kolonie detektiert. Wie Induktionstests gezeigt haben, ist eine Induktion mit IPTG (0,1 mM) nicht notwendig, sie wirkt eher hemmend auf die Kolonienzahl. Die konstitutive Expression des LipAH-Operons ist für den Nachweis von Lipaseaktivität ausreichend. Nach einer Inkubation der Platten bei 37 °C üN ist die Lipaseaktivität über Hofbildung nur schwer nachzuweisen, da der Expressionswirt *E. coli* BL21(DE3) nicht über den notwendigen Sekretionsmechanismus der Lipase, den Xcp-Apparat, verfügt. Nach einer drei-tägigen Inkubation bei 4 °C ist die klare Hofbildung bei aktiver Lipase jedoch gut zu erkennen; Die Hydrolyse des Tributyrins kann erst bei Lyse der Zellen bzw. Diffusion des Tributyrins in die Zelle nachgewiesen werden.

90 % der getesteten LipH-Mutanten zeigten keine Lipaseaktivität mehr. Die Ursachen dafür können in der Entstehung von selten verwendeten Codons, Stoppcodons, instabilen oder inaktiven LipH-Varianten bzw. fehlgefalteten und somit instabilen oder inaktiven Lipasen liegen, die durch eingeführte Mutationen in das *lipH*-Gen während der epPCR bewirkt wurden. Da bei fehlender Hofbildung und der daraus resultierenden fehlenden Lipaseaktivität nicht ersichtlich ist, worin dies den Ursprung hat, und die Zahl der „uninteressanten“

Varianten (z. B. falsche Codon-Usage) gegenüber der Zahl der „interessanten“ Varianten (z. B. inaktiver LipAH-Komplex) in der Masse überwiegt, wurden diese Varianten nicht weiter analysiert. Die verbleibenden aktiven 10 % der getesteten Varianten wurden in Doppelbestimmung auf LB-Tributylin-Cm²⁵-Platten überimpft. Durch die entsprechenden Kontrollen konnte nun, nach oben beschriebener Inkubation, die Lipaseaktivität der Varianten im Vergleich zur Positivkontrolle eingeordnet werden.

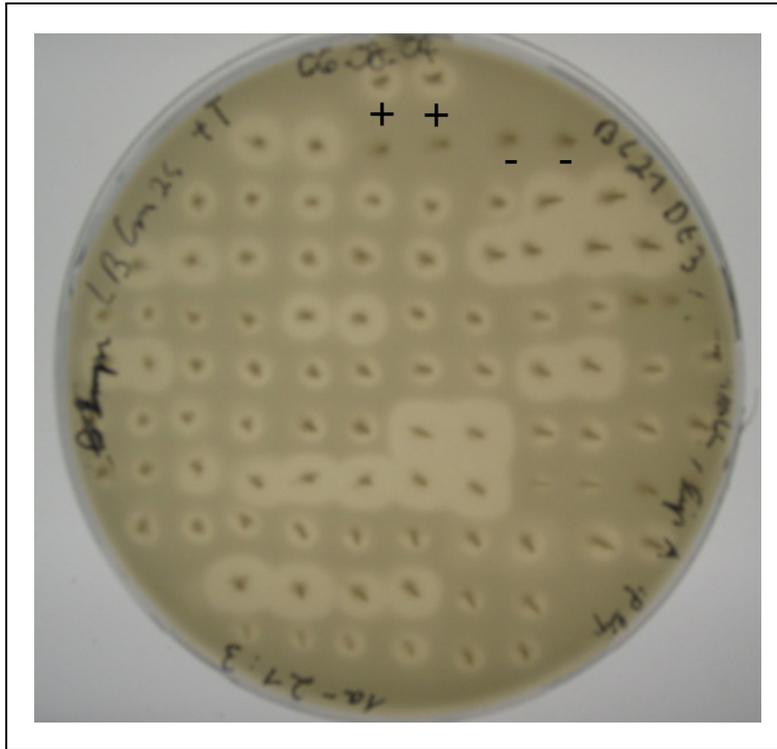


Abb. 3.1: Bestimmung der lipolytischen Aktivität der ep-LipH-Varianten durch Umsatz des Substrates Tributyrin auf Agarplatten. Die Aktivität wird durch Bildung eines Hofes um die Kolonie herum detektiert und konnte im heterologen Wirt nach einer Inkubation bei 37° C üN und anschließender drei-tägiger Inkubation bei 4 °C über die klare Hofbildung um die Kolonien beobachtet werden. Die Lipaseaktivität konnte über die Kontrollen (+: Positivkontrolle *E. coli* BL21(DE3)/pBBRPA-*lipAH*, -:Negativ-Kontrolle *E. coli* BL21(DE3)/pBBR1MCS) ins Verhältnis zur durch WT-LipH aktivierten Lipase gesetzt werden. Die Ergebnisse konnten in zwei unabhängigen Anzuchten verifiziert werden

Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, zeigt die Positiv-Kontrolle die erwartete Hofbildung, was auf das Vorhandensein aktiver Lipase schließen lässt. Die Negativ-Kontrolle zeigt keine Hofbildung. Die Lipaseaktivitäten der überimpften ep-LipH-Varianten können nun erstmals mit der Lipaseaktivität einer durch WT-LipH „aktivierten“/gefalteten Lipase in Relation gesetzt werden. Dabei fällt auf, dass die Hofbildung der meisten Varianten sich mit der Hofbildung der Positiv-Kontrolle deckt, was für eine vergleichbare Lipaseaktivität spricht. Nur wenige Varianten bilden deutlich größere, andere aber auch deutlich kleinere Höfe aus.

Spektrophotometrische Bestimmung der Lipaseaktivität

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten mittels Indikatoragarplatten, in diesem Fall Tributyrinagarplatten, kann immer nur als erster Schritt des Screenings angesehen werden, da

diese nur eine begrenzte Aussagekraft, z. B. bedingt durch Unterschiede in der Koloniegröße, haben. Für das Screening einer *ep-lipH*-Bank ist diese Methode jedoch prädestiniert, da schnell eine Eingrenzung der „interessanten“ Varianten möglich ist.

Um detailliertere Ergebnisse zu erlangen, muss die Lipaseaktivität spektrophotometrisch bestimmt werden. Die photometrische Bestimmung der Lipaseaktivität wurde nur an „interessanten“ Varianten durchgeführt, d. h. an solchen, die sich im Verhältnis zur WT-Variante durch eine reduzierte bzw. erhöhte Hofgröße unterscheiden. Dazu wurden Hauptkulturen (2.4.3) der ausgewählten Varianten in 10 ml LB-Cm²⁵-Medium angeimpft und bei 37 °C üN inkubiert. Zur photometrischen Lipaseaktivitätsbestimmung wurde ein Ganz-Zell-Lysat hergestellt (2.13) und nach der von Winkler & Stuckmann beschriebenen Methode (2.15) analysiert.

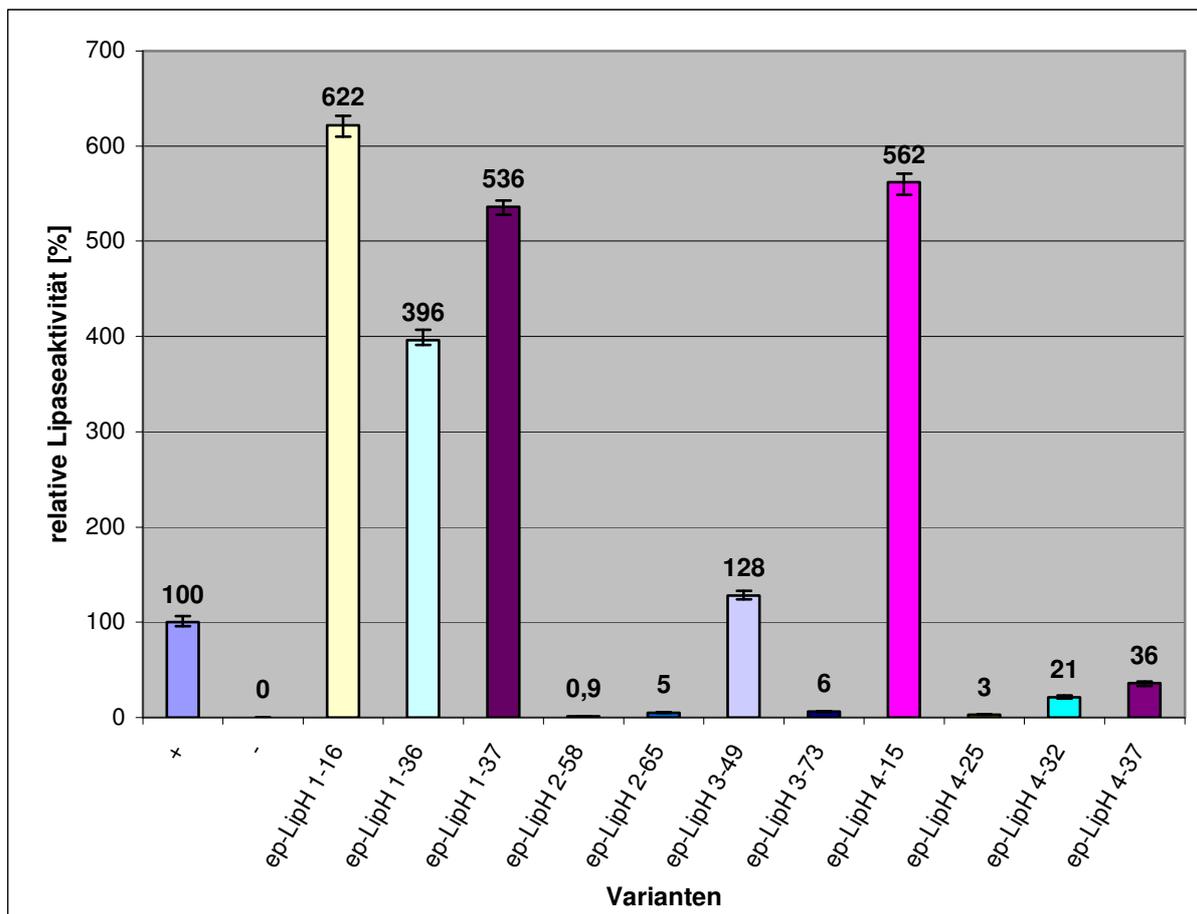


Abb. 3.2: Lipolytische Aktivität der ep-LipH-Varianten im heterologen Wirt. Die Lipaseaktivität im Ganz-Zell-Lysat wurde mit *pNPP* als Substrat bestimmt. Dargestellt ist die relative Lipaseaktivität im Ganz-Zell-Lysat von *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden zur Expression der ep-LipH-Varianten im Operon mit der WT-Lipase nach 16 Wuchs. Die Werte von *E. coli* BL21(DE3) mit pBBR1MCS/*lipAH* (WT-Operon) wurden gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, zeigten die ep-LipH-Varianten auch bei einer Flüssigkultur-Anzucht Unterschiede in der Lipaseaktivität. Im Unterschied zum vorangegangenen Screening auf Indikatorplatten sind die nun erhaltenen Ergebnisse deutlich genauer, da die bestimmte Lipaseaktivität in Relation zur optischen Dichte gesetzt wurde. Im Verhältnis zur vom WT-LipH aktivierten Lipase (Positiv-Kontrolle) zeigten die ep-LipH-Varianten entweder eine deutliche Reduzierung oder Erhöhung der Lipaseaktivität.

Immunologischer Nachweis des Chaperons LipH und der Lipase LipA

Um eine Korrelation der zellulären LipH-Konzentration mit der Lipaseproduktion zu erfassen, wurden die jeweilige Lipase- und Foldasemenge immunologisch ermittelt. Bei der Lipase LipA aus *P. aeruginosa* handelt es sich um ein extrazelluläres Enzym, welches über den Xcp-Apparat sekretiert wird. Da die Expression allerdings im heterologen Wirt *E. coli* stattgefunden hat und dieser keinen Xcp-Apparat besitzt, wurde sowohl die Lipase als auch die Foldase im GZE detektiert.

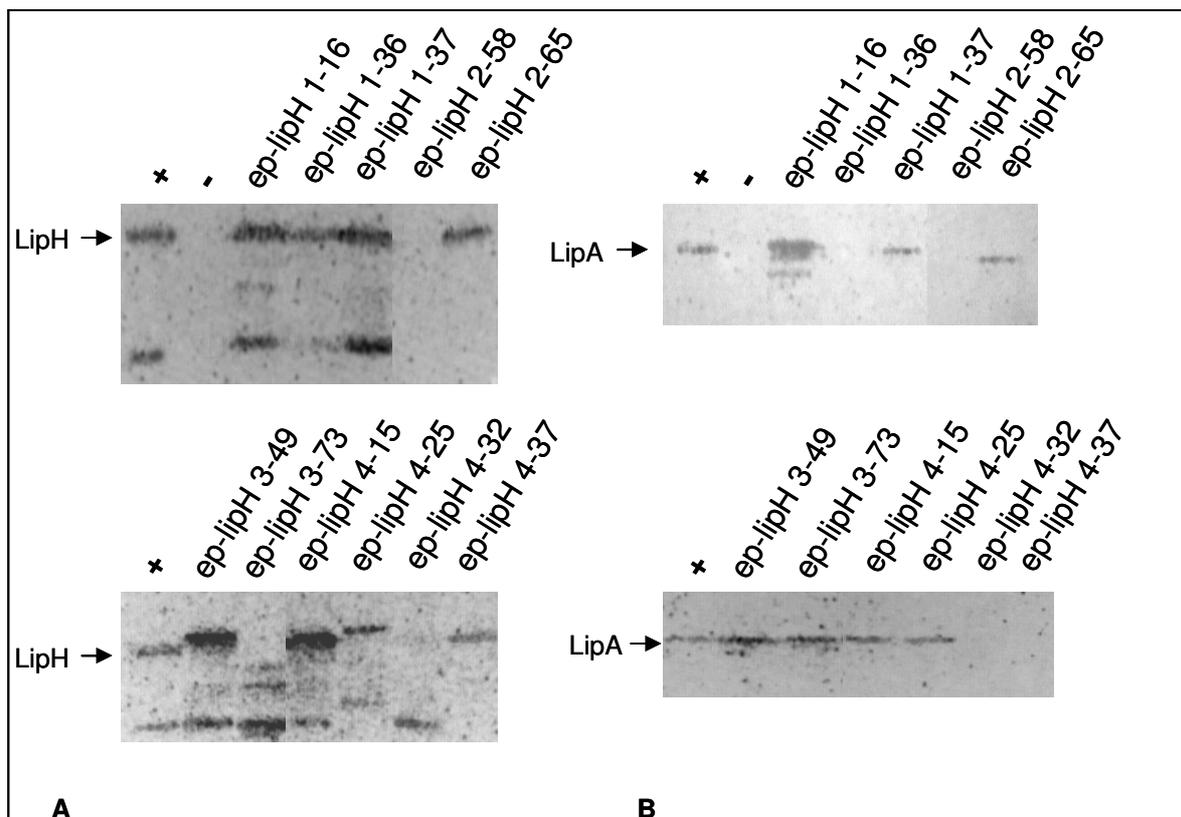


Abb. 3.3: Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei heterologer Expression der ep-LipH-Varianten. A: Immunodetektion der Foldase LipH. B: Immunodetektion der Lipase LipA.

Die Bakterien wurden für 16 h bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. +: Positivkontrolle *E.coli* BL21(DE3)/pBBRPA-lipAH, -: Negativ-Kontrolle *E.coli* BL21(DE3)/pBBR1MCS) Für den Nachweis des LipH- bzw. LipA-Proteins wurde die Menge an GZE eingesetzt, die einer O.D._{580nm} = 0,15 entsprach, diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte unter Verwendung des LipH- bzw. LipA-spezifischen Antiserums.

Die Immunodetektion der Foldase LipH zeigt im Fall der Positiv-Kontrolle ein deutlich erkennbares Signal, welches im Fall der Negativ-Kontrolle nicht detektiert werden konnte. Im Fall der ep-LipH-Varianten konnte das Foldaseprotein ebenfalls detektiert werden, wenn auch in einigen Fällen nicht in Volllänge (z. B. ep-LipH-Variante 3-73) bzw. mit einem deutlichen „Shift“ nach oben, was auf eine verlängerte Form des Proteins hindeutet (z. B. ep-LipH-Variante 3-49).

Die Lipase LipA konnte ebenfalls im Fall der Positiv-Kontrolle sowie in den Varianten detektiert werden. Die Negativ-Kontrolle zeigte, wie erwartet, kein Signal.

3.2.2 Screening „interessanter“ ep-LipH-Varianten im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1

Die bisher erhaltenen Ergebnisse beruhen alle auf einer heterologen Expression im Wirt *E. coli* BL21(DE3). Diese Ergebnisse können jedoch nicht ohne weiteres auf eine Expression im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 übertragen werden. Die Freisetzung enzymatisch aktiver bakterieller Lipasen in das Kulturmedium stellt einen komplexen Vorgang dar, an dem die verschiedensten zellulären Vorgänge beteiligt sind. Angefangen bei der Transkription entsprechender Strukturgene über die Translation der resultierenden mRNA bis zur Translokation des Proteins über die innere und äussere Membran im Falle Gram-negativer Bakterien, kann jeder Schritt einer Regulation durch die Zelle unterliegen. Daher wurden „interessante“ ep-LipH-Varianten auch im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 exprimiert.

Spektrophotometrische Bestimmung der Lipaseaktivität

Um sofort detaillierte Ergebnisse zu erlangen, wurde die Lipaseaktivität direkt spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurden Hauptkulturen (2.4.3) der ausgewählten Varianten in 10 ml LB-Cm³⁰⁰-Medium angeimpft und bei 37 °C üN inkubiert. Zur photometrischen Lipaseaktivitätsbestimmung wurde der Kulturüberstand (2.12) nach der von Winkler & Stuckmann beschriebenen Methode (2.15) analysiert.

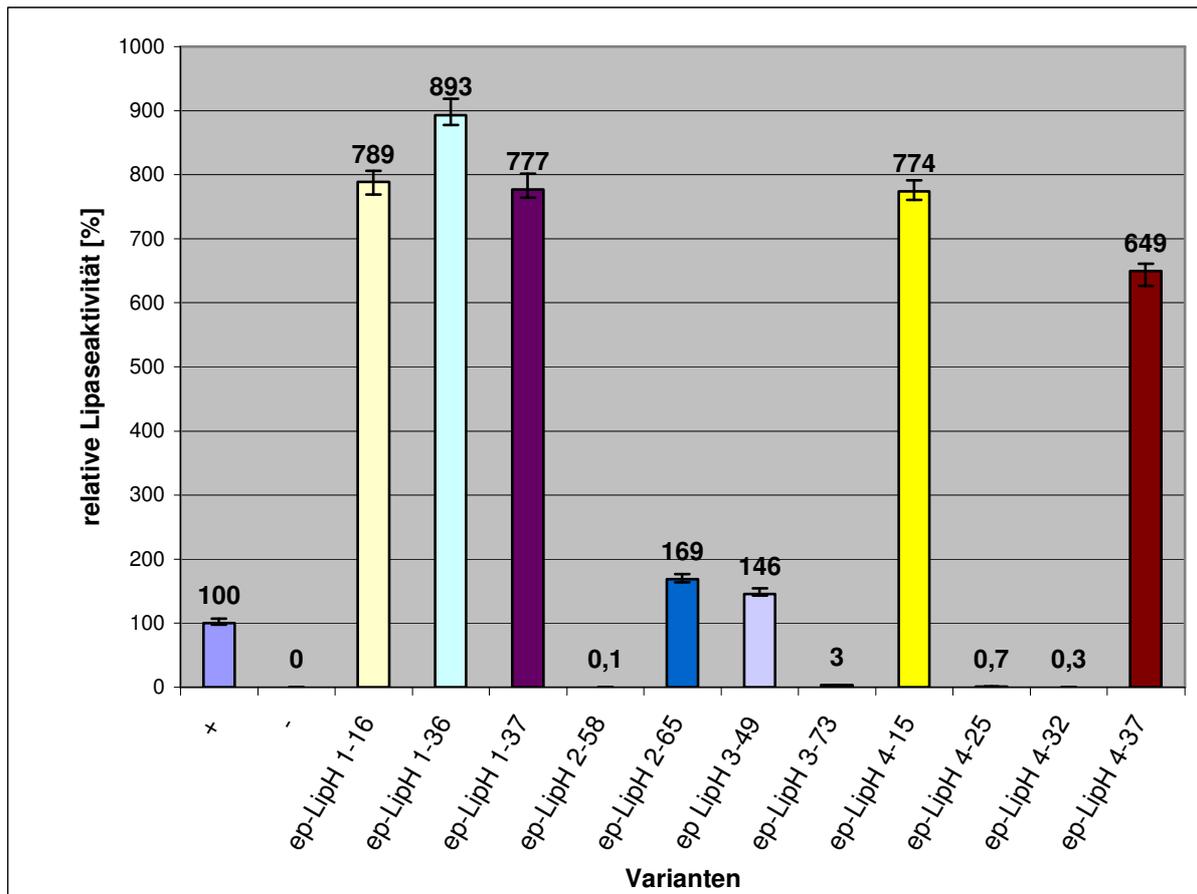


Abb. 3.4: Lipolytische Aktivität der ep-LipH-Varianten im homologen Wirt. Die Lipaseaktivität im Kulturüberstand wurde mit *pNPP* als Substrat bestimmt. Dargestellt ist die relative Lipaseaktivität im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit den Plasmiden zur Expression der ep-LipH-Varianten im Operon mit der WT-Lipase nach 16 Wuchs. Die Werte von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit *pBBR1MCS/lipAH* (WT-Operon) wurden gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, zeigten die ep-LipH-Varianten auch bei homologer Expression Unterschiede in der Lipaseaktivität. Im Verhältnis zur WT-Variante zeigten die ep-LipH-Varianten eine deutliche Reduzierung, oder auch eine deutliche Erhöhung der Lipaseaktivität.

Immunologischer Nachweis des Chaperons LipH und der Lipase LipA

Im homologen Wirt *P. aeruginosa* liegt die Foldase LipH aminoterminal membrangebunden vor und muss bei einem immunologischen Nachweis daher im GZE detektiert werden. Die Lipase LipA liegt als extrazelluläres Enzym im Kulturüberstand vor. Um die Lipase immunologisch detektieren zu können, wurden die Proteine des Kulturüberstandes mittels

Trichloressigsäure (2.17) präzipitiert. Zusätzlich wurde die Lipase im GZE detektiert, was der noch nicht sekretierten Lipase entspricht.

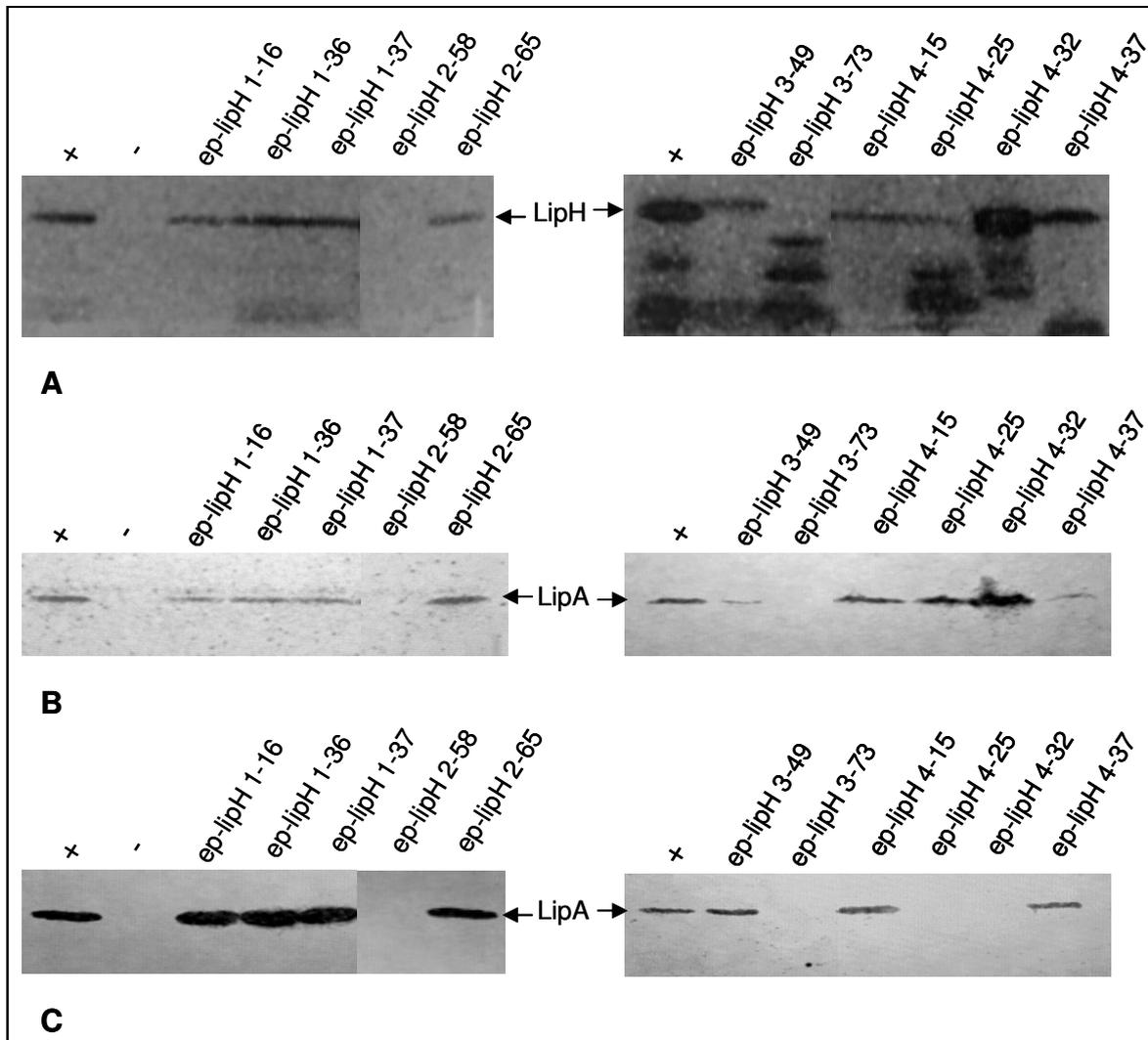


Abb. 3.5: Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei homologer Expression der ep-LipH-Varianten. Die Bakterien wurden für 16 h bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. +: Positivkontrolle *P.aeruginosa* PABST7.1/pBBRPA-lipAH, -:Negativ-Kontrolle *P.aeruginosa* PABST7.1/pBBR1MCS) **A:** Immunodetektion der Foldase LipH. Die auf das Gel aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580nm}= 0,15). Der Nachweis erfolgte mit einem LipH-spezifischen Antiserum. **B:** Immunodetektion der Lipase LipA im GZE. Die auf das Gel aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580nm}= 0,3). Der Nachweis der Lipase mit einem Lipase-spezifischen Antiserum. **C:** Immunodetektion der Lipase LipA im Kulturüberstand. Die Kulturvolumen, die einer O.D._{580nm}= 0,3 entsprachen, wurden mit TCA gefällt. Der Nachweis der Lipase erfolgte mit einem Lipase-spezifischen Antiserum.

Die Immunodetektion der Foldase LipH zeigt im Fall der Positiv-Kontrolle ein deutlich erkennbares Signal, welches im Fall der Negativ-Kontrolle nicht detektiert werden konnte. Im Fall der ep-LipH-Varianten konnte das Foldaseprotein ebenfalls detektiert werden, wenn auch in einigen Fällen nicht in Volllänge bzw. mit einem deutlichen „Shift“ nach oben, was auf eine verlängerte Form des Proteins hindeutet.

Die Lipase LipA konnte im Fall der Positiv-Kontrolle sowie bei den meisten Varianten sowohl im GZE als auch im Überstand detektiert werden. Die Negativ-Kontrolle zeigte, wie erwartet, kein Signal. Dieser Anteil der Lipase im GZE hat allerdings keinen Einfluss auf die im Überstand detektierte Lipaseaktivität.

3.2.3 Sequenzierung der ep-LipH-Varianten

In den durchgeführten Vorversuchen zur Erstellung der ep-LipH-Bank wurde eine durchschnittliche Fehlerrate von drei AS-Austauschen pro LipH eingestellt. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich daher bislang nicht auf konkrete Austausche zurückführen. Um eine Übersicht der Austausche zu erhalten, wurden die ep-LipH-Varianten sequenziert.

ep-LipH-Variante	Anzahl der Austausche	Aminosäureaustausch
ep-LipH 1-16	3	A103T, L133S, D152G
ep-LipH 1-36	2	R151H, F195L
ep-LipH- 1-37	1	A282V
ep-LipH 2-58	3	M136T, K170Stopp, V232A
ep-LipH 2-65	1	H182P
ep-LipH 3-49	2	V232G, Stopp341R
ep-LipH 3-73	2	P36L, Q279Stopp
ep-LipH 4-15	2	S48P, Q138R
ep-LipH 4-25	2	R258H, R327C
ep-LipH 4-32	2	R199H, E324G
ep-LipH 4-37	3	A132V, Q242L, E313G

Tab. 3.2: Übersicht der jeweiligen AS-Austausche in den ep-LipH-Varianten.

Im Durchschnitt liegen pro LipH 2,1 AS-Austausche vor, was eine Abweichung von den ermittelten 3 AS-Austauschen darstellt. Bei neun von elf Varianten liegt mehr als ein AS-Austausch vor. In diesen Fällen müssen die einzelnen Austausche mittels ortsspezifischer Mutagenese in das *lipH*-Gen inseriert werden und dann einzeln analysiert werden. Nur so lässt sich eine Aussage darüber treffen, welcher Einzel-AS-Austausch im LipH eine Erhöhung

bzw. Reduktion der Lipaseaktivität bewirkt oder ob es sich um ein Zusammenspiel mehrerer AS-Austausche handelt.

Allerdings wurde im Fall von zwei Varianten, ep-LipH-Variante 2-58 und 3-73, auf die ortsspezifische Mutagenese verzichtet. Aufgrund eines während der epPCR inserierten Stoppcodons kam es zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation, was die drastische Reduzierung der Lipaseaktivität erklärt. Durch den vorzeitigen Abbruch der Translation ist ebenfalls die Immunodetektion des LipH-Proteins schlüssig, da kein Volllängenprodukt detektiert werden konnte. Die C-terminale Verkürzung der Foldase um 62 AS im Fall von Variante 3-73 sowie die C-terminale Verkürzung um 171 AS führt sowohl bei heterologer Expression als auch bei homologer Expression zum nahezu vollständigen Funktionsverlust des LipH-Proteins.

In zwei der elf Varianten wurde allerdings nur eine AS ausgetauscht, sodass man die jeweiligen Ergebnisse auf diesen Austausch zurückführen kann.

In Variante ep-LipH 1-37 wurde an AS-Position 282 die AS Alanin gegen Valin ausgetauscht. Dieser Austausch bewirkte bei heterologer Expression in *E. coli* BL21(DE3) eine Erhöhung der Lipaseaktivität um mehr als 500 %, bei homologer Expression in *P. aeruginosa* PABST7.1 eine Erhöhung um fast 800 %. Die Analyse des zugehörigen LipH- und LipA-Blots lässt vergleichbare LipH- und LipA-Mengen erkennen, sodass Unterschiede in der Expression als Ursache für die Aktivitätserhöhung ausgeschlossen werden können.

Die AS Alanin und Valin sind beides aliphatische und damit apolare, lipophile AS, die bevorzugt im Proteininneren lokalisiert sind. Der Hydrophobizitäts-Index von Alanin (+1,8) und Valin (+4,2) bestätigt dieses. Der Hydrophobizitäts-Index gibt die relative Hydrophobizität einer AS wieder. Je positiver der Wert, desto stärker die Hydrophobizität. Hydrophile AS haben negative Werte. Hydrophobe AS sind eher im Proteininneren lokalisiert, während sich hydrophile AS eher an der Oberfläche eines Proteins befinden (Gomez *et al.*, 1977; Feng & Zhang, 2000). Valin ist stärker hydrophob und damit eher zum Proteininneren gerichtet als Alanin. Eine weitere Eigenschaft von inaktiven hydrophoben AS ist, dass ihre Reste keine H-Brücken mit anderen AS ausbilden. Die beiden AS unterscheiden sich unter anderem auch in ihrer Größe, wobei Valin größer ist.

Auf der Grundlage der Struktur des LipAH-Komplexes aus *B. glumae* (Pauwels *et al.*, 2005 und 2006) wurde ein LipAH-Modell für den LipAH-Komplex aus *P. aeruginosa* berechnet („UCSF Chimera“, University of California, USA). Betrachtet man die Lage der LipH-AS 282 im berechneten Modell, liegt diese nicht in direktem Kontakt zur Lipase LipA. Stimmt das berechnete Modell in dieser Region mit der Realität überein, so ist eine Interaktion zwischen

AS 282 und LipA-AS auf den ersten Blick nicht offensichtlich. Allerdings handelt es sich bei 3D-Strukturen immer um eine Momentaufnahme des Proteins. In anderen Momenten kann sich die Lage verschiedener AS zueinander deutlich geändert haben. Eine Aussage darüber, ob die AS 282 direkt mit AS des LipA-Proteins interagiert, kann daher nicht abschließend getroffen werden. Aufgrund des größeren Restes von Valin ist allerdings eine Veränderung der LipH-Proteinstruktur wahrscheinlich. Dieses könnte eine effektivere Aktivierung der Lipase bewirken, da bei vermeintlich gleichen LipA-Mengen (Abb.3.3 und 3.5) der Anteil aktiver Lipase nicht erkennbar ist. Bei genauerer Betrachtung der Immunodetektion des homologen LipA-Blots ist die gesamte LipA-Menge zwar vergleichbar, jedoch ist der sekretierte Anteil in der Variante 1-37 leicht erhöht (Abb. 3.5).

In Variante 2-65 wurde an AS-Position 182 Histidin gegen Prolin ausgetauscht. Dieser Austausch bewirkte bei heterologer Expression in *E. coli* BL21(DE3) eine 95 % Reduzierung der Lipaseaktivität, bei homologer Expression in *P. aeruginosa* PABST7.1 dagegen eine Erhöhung auf 160 %. Die Analyse des zugehörigen LipH- und LipA-Blots lässt vergleichbare Protein-Mengen erkennen, sodass auch hier Unterschiede in der Expression als Ursache für die Aktivitätsveränderung ausgeschlossen werden können.

Histidin gehört zur Gruppe der basischen AS. In neutralem Milieu erhält der Rest von basischen AS ein Proton und ist damit positiv geladen. Dadurch kommt es zur Interaktion zwischen positiv- und negativ-geladenen Resten und zur Ausbildung von Salzbrücken, die der Proteinstabilisierung dienen. Ein negativer Hydrophobizitäts-Index von -3,2 spricht dafür, dass die relativ große AS eher zum Proteinäußeren gerichtet ist.

Prolin ist eine ungeladene, unpolare, zyklische AS. Die Aminopropylgruppe als Rest hat mit der Aminogruppe reagiert und so einen Fünfring gebildet. Sie ist damit die Einzige der 20 AS, in der der Rest direkt mit der Aminogruppe verbunden ist. Aufgrund dieser Besonderheit wird Prolin auch als „Helixbrecher“ bezeichnet und ist oft am „Turn“ einer Peptidkette in der 3D-Struktur eines Proteins lokalisiert.

Die Position 182 befindet sich außen in einem „Loop“, was für die relativ große AS Histidin typisch ist, steht jedoch nicht in direktem Kontakt zur Lipase. Trotzdem zeigt die heterologe Expression gegenüber der homologen Expression deutliche Unterschiede in der Lipaseaktivität. Durch den Austausch von Histidin zu Prolin wurde in dem an dieser Stelle ausgebildeten „Loop“ eine Beugung erzeugt. Bei heterologer Expression ist die Lipaseaktivität dadurch deutlich reduziert, 5 % der WT-Lipaseaktivität. Bei homologer Expression dagegen auf 160 % der WT-Lipaseaktivität erhöht.

3.3 Ortsspezifische Mutagenese zur Analyse von Einzelaustauschen

Wie oben bereits erwähnt, müssen die Mehrfach austausche von neun der elf ep-LipH-Varianten mittels ortsspezifischer Mutagenese analysiert werden, um festzustellen, welcher AS-Austausch im LipH eine Erhöhung bzw. Reduktion der Lipaseaktivität bewirkt und/oder ob es sich um ein Zusammenspiel mehrere AS-Austausche handelt.

3.3.1 Einbringung ortsspezifischer Mutationen in das *lipH*-Gen

Zur Konstruktion der LipH-Varianten mit AS-Einzelaustausch sollte erneut die PCR-Methode von Baretino *et al.* (1994) zur Anwendung kommen. Das Prozedere entsprach dabei der unter Punkt 3.1.2 beschriebenen Durchführung. Von jeder Variante der in den Vektor pBBRPA-*lipAH/ccdB* ligierten PCR-Produkte wurde ein Teil zur dauerhaften Aufbewahrung bei -20 °C gelagert und steht so dauerhaft für Screening-Anwendungen auf verschiedene Eigenschaften zur Verfügung.

3.3.2 Screening der ortsspezifischen LipH-Mutanten im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3)

Zunächst wurden die Analysen im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. So konnte der Einfluss jedes einzelnen AS-Austausches in der Foldase auf die Aktivität der Lipase untersucht werden.

Indikatoragarplatten

Das erste Screening fand wie zuvor auf Tributyrinagar-Cm²⁵-Platten statt. Unterschiede in der Lipaseaktivität wurden über eine Hofbildung um die Einzelkolonien unter konstitutiven Expressionsbedingungen untersucht.



Abb. 3.6: Bestimmung der lipolytischen Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten im heterologen Wirt auf Tributyrin-Agarplatten. Die Aktivität wird mittels Hofbildung um die Kolonie herum detektiert und konnte im heterologen Wirt nach einer Inkubation bei 37° C üN und anschließender dreitägiger Inkubation bei 4 °C über die klare Hofbildung um die Kolonien beobachtet werden. Die Lipaseaktivität konnte über Kontrollen (+: Positivkontrolle *E. coli* BL21(DE3)/pBBRPA-*lipAH*, -:Negativ-Kontrolle *E. coli* BL21(DE3)/pBBR1MCS) ins Verhältnis gesetzt werden. Die Ergebnisse konnten in zwei unabhängigen Anzuchten verifiziert werden

Die ep-LipH-Variante 1-16, bestehend aus den Austausch A103T, L133S und D152G, weist bei heterologer Expression eine stark erhöhte Lipaseaktivität von mehr als 600 % auf. In der Immunodetektion dieser Variante (siehe Abb. 3.3) konnte lediglich eine unwesentliche Erhöhung der LipH-Menge detektiert werden, die Menge der Lipase war allerdings deutlich erhöht. Unterschiede in der LipH-Expression konnten daher als Ursache für die deutliche Aktivitätssteigerung ausgeschlossen werden.

Die Austausch A103T und D152G zeigen laut Indikatoragarplatte eine leicht reduzierte Lipaseaktivität im Verhältnis zur WT-Variante; Einzelaustausch L133S zeigt keine Lipaseaktivität.

Im Sequenzvergleich der Familien I-IV der Lip- Proteine (Rosenau *et al.*, 2004) ist ersichtlich, dass die AS-Position 103 in einem konservierten Sequenzbereich liegt. Hier ist Alanin in zwei der vier Familien konserviert. Alanin zählt zu den AS mit ungeladenen, unpolaren Seitenketten als Rest, in diesem Fall einer Methylgruppe. Diese Gruppe von AS bilden nur sehr geringe Bindungen untereinander aus.

Durch den Austausch zu Threonin wird die Position 103 mit einer AS mit polarer aber ungeladener Seitenkette, der 2-Hydroxyethylgruppe, besetzt. Die AS dieser Gruppe können untereinander und mit anderen polaren Substanzen H-Brücken ausbilden. Sie sind für den Großteil der Stabilität von Strukturen verantwortlich. Obwohl an Position 103 Alanin konserviert ist, wird bei einem Austausch zu Threonin weiterhin aktive Lipase gebildet. Threonin findet sich an dieser Position in Familie IV im Stamm *Vibrio vulnificus* CMCP6

wieder. Der Austausch von einer ungeladenen, unpolaren AS zu einer ungeladenen, polaren AS lässt hier weiterhin die Produktion aktiver Lipase zu.

Die AS-Position 133 ist anhand des Sequenzvergleichs nicht konserviert. In acht der 17 verglichenen Stämme ist sie allerdings von Leucin besetzt. In Familie I, wozu auch der verwendete Stamm *P. aeruginosa* PAO1 gehört, weisen vier der fünf Stämme hier ein Leucin auf, der fünfte Stamm Isoleucin. Isoleucin ist wie Leucin eine ungeladene, unpolare AS. Beide AS haben unpolare kettenförmige Kohlenwasserstoffe als Rest, Leucin mit einer 2-Methylpropyl-Gruppe und Isoleucin mit einer Butylgruppe. Aufgrund ihrer gleichen Summenformel, $C_6H_{13}NO_2$, werden sie als „Konstitutionsisomere“ bezeichnet. Die unpolaren Reste bilden geringe Wechselwirkungen untereinander aus und richten sich bevorzugt zueinander aus. Zahlreiche Proteine weisen eine Konformation auf, in der die unpolaren Reste im Innern des Moleküls liegen, wo sie nicht mit Wassermolekülen oder anderen polaren Substanzen wechselwirken und die polaren Reste nach außen zeigen. Der hohe Hydrophobizitäts-Index (Leucin = 3,8 und Isoleucin = 4,5) lässt ebenfalls auf eine Orientierung der AS in das Proteininnere schließen.

Durch den Austausch zu Serin wird die Position 133 mit einer AS mit polarer aber ungeladener Seitenkette, der Hydroxymethylgruppe, besetzt. Diese Gruppe von AS bewirkt, wie bereits zuvor besprochen, den Großteil der Stabilität von Strukturen. Durch den Austausch von Leucin, einer hydrophoben AS, die selten an chemischen Reaktionen teilnimmt, zu Serin, einer hydrophilen, reaktiven AS, kommt es bei heterologer Expression zum Verlust der Lipaseaktivität.

Position 152 ist im Sequenzvergleich der Familien der Lif-Proteine nicht konserviert. In der Familie I, zu der auch das Lif-Protein LipH aus *P. aeruginosa* gehört, ist Aspartat in drei von fünf Stämmen an dieser Position lokalisiert. Aspartat gehört zu den polaren, geladenen AS mit einer zweiten Säure oder Aminogruppe, im Fall von Aspartat mit der Essigsäure, als Rest. Sie können Protonen aufnehmen oder abgeben; Aspartat verliert ein Proton und ist daher negativ geladen. Durch die polare Ladung können diese AS noch stärkere Bindungen zu anderen polaren AS aufbauen, es sei denn, diese sind gleichartig geladen. Im berechneten Modell liegt die AS-Position 152 in einem „Loop“ und ist vermutlich nicht direkt an der Interaktion zwischen Lipase und Foldase beteiligt.

Im Gegensatz zur ep-LipH-Variante 1-16 mit einer um 600 % erhöhten Lipaseaktivität zeigt keiner der Einzelaustausche eine Aktivitätserhöhung. Die Aktivitätssteigerung beruht daher auf einem Zusammenspiel der drei Austausche in der Variante 1-16.

Die ep-LipH-Variante 1-36, bestehend aus den Austauschen R151H und F195L, weist bei heterologer Expression eine stark erhöhte Lipaseaktivität von ca. 400 % auf. Die Immunodetektion der Foldase entsprach in der Signalintensität der der WT-Variante, was auf vergleichbare Proteinmengen schließen lässt.

Der Einzelaustausch R151H in der Foldase zeigt bei heterologer Expression keine Hofbildung und damit keine Aktivität der Lipase. Die Position 151 ist laut Modell Bestandteil eines mobilen „Loops“. Diese Position ist nicht konserviert, allerdings ist sie meistens mit polaren, geladenen AS besetzt, zu denen auch Arginin mit einem Harnstoffrest zählt. Durch die polare Ladung kann sie starke Bindungen zu anderen polaren AS aufbauen, in diesem Fall zu negativ geladenen wie Aspartat oder Glutamat (LipH-AS 150 und 152). Arginin hat einen Hydrophobizitäts-Index von -4,5, was auf eine Orientierung zum Proteinäußeren schließen lässt. Durch den Austausch zu Histidin wird die Position 151 ebenfalls mit einer polaren, geladenen AS besetzt. Trotzdem zeigt diese Variante bei heterologer Expression keine Hofbildung.

Der zweite AS-Austausch in der ep-LipH-Variante 1-36 ist an Position 195. In *P. aeruginosa* belegt diese Phenylalanin, welche in der Familie I an vier der fünf Positionen konserviert ist. Phenylalanin ist eine AS mit ungeladener, unpolarer Seitenkette, die eher zum Proteininneren lokalisiert ist. Die Seitenkette wird hier durch ringförmige Kohlenwasserstoffe, einem Phenylrest, gebildet. Bei Betrachtung von F195 im Modell zeigt sich, dass diese in der ersten Helix in einem Helix-Turn-Helix-Motiv liegt und zur entsprechenden zweiten Helix ausgerichtet ist. Durch den Austausch wird die relativ große AS Phenylalanin gegen die etwas kleinere AS Leucin ausgetauscht. Leucin ist ebenfalls eine ungeladene, unpolare AS, allerdings mit aliphatischen Kohlenwasserstoffen als Rest, der 2-Methylpropyl-Gruppe. Dieser Austausch von einer AS mit aromatischem Rest zu einer AS mit aliphatischem Rest an Position 195 in der Foldase bewirkt bei heterologer Expression eine deutliche höhere Lipaseaktivität. Betrachtet man den Sequenzvergleich genauer, so fällt auf, dass Leucin an dieser Position in der Familie IV konserviert ist.

Beide Austausche zusammen, R151H und F195L, bewirken eine deutliche Aktivitätserhöhung der Lipase. Da der Einzelaustausch R151H bei heterologer Expression jedoch keine Lipaseaktivität zeigt, ist der Austausch an der Position 195 für die Aktivitätssteigerung verantwortlich und kann den Austausch an Position 151 kompensieren.

Die ep-LipH-Variante 3-49, bestehend aus den Austauschen V232G und Stopp341R, weist bei heterologer Expression eine erhöhte Lipaseaktivität von ca. 130 % auf. Die

Im Fall der Variante 3-49 beruht die Aktivitätssteigerung auf der Kumulation beider Austausche, wobei jeder für sich ebenfalls eine Lipaseaktivitätssteigerung bewirkt.

Die ep-LipH-Variante 4-15, bestehend aus den Austauschen S48P und Q138R, weist bei heterologer Expression eine stark erhöhte Lipaseaktivität von ca. 560 % auf. Obwohl in der Immunodetektion eine erhöhte LipH-Menge im Vergleich zum WT nachgewiesen wurde, war die LipA-Menge nicht erhöht. Expressionsunterschiede der Lipase können also nicht Ursache für die Aktivitätssteigerung sein.

Der Austausch von Serin zu Prolin an der Position 48 bewirkt eine starke Reduzierung der Lipaseaktivität. Da das berechnete Modell erst bei AS 74 beginnt, kann keine Aussage über die Lage der Position 48 getroffen werden.

Der Austausch Q138R bewirkt bei heterologer Expression ebenfalls eine drastische Reduzierung der Lipaseaktivität. Glutamin zählt zu den AS mit polaren, aber ungeladenen Seitenketten. Durch den Austausch zu Arginin wird die Position 138 mit einer polaren, geladenen AS besetzt. Potentielle Bindungspartner für Arginin sind Aspartat und Glutamat. Die Position 138 ist in mindestens zwei Familien konserviert. In Familie I ist sie in vier von fünf Fällen mit einem Glutamin besetzt. Obwohl diese Position in der Familie II, zu der auch die Foldase von *B. glumae* gehört, in allen sieben Fällen mit einem Arginin konserviert ist, reduziert sich die Lipaseaktivität im vorliegenden Fall drastisch. Nach dem berechneten Modell liegt die Position 138 in einer Helix. Ein potentieller Bindungspartner des Austausches Arginin liegt in unmittelbarer Nähe, Glutamat180.

Im Gegensatz zur ep-LipH-Variante 4-15 mit einer um 560 % erhöhten Lipaseaktivität zeigt keiner der Einzelaustausche eine Aktivitätserhöhung. Die Aktivitätssteigerung beruht daher auf einem Zusammenspiel der zwei Austausche in der Variante 4-15.

Die ep-LipH-Variante 4-25, bestehend aus den Austauschen R258H und R327C, weist bei heterologer Expression eine stark reduzierte Lipaseaktivität von ca. 3 % auf. Die Immunodetektion der Foldase lässt auf vergleichbare Mengen Protein im Verhältnis zum WT schließen. Das Signal der LipA-Immunodetektion ebenfalls. Trotzdem ist die Lipaseaktivität stark reduziert.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Indikatoragarplatte zeigen die Austausche R258H und R327C eine vergleichbare, leicht erhöhte Lipaseaktivität bei heterologer Expression im Verhältnis zum WT.

Die Position 258 ist im Sequenzvergleich der Familien I-IV der Lip-Proteine in mehr als zwei Familien mit Arginin konserviert und liegt in der ersten Helix eines Helix-Turn-Helix-Motivs ohne direkten Kontakt zur Lipase. Obwohl R258 konserviert ist, kommt es durch den Austausch zu Histidin zu keiner Veränderung der Lipaseaktivierung.

Laut Sequenzvergleich ist die Position 327 in zwei der vier Familien, darunter auch Familie I, mit einem Arginin konserviert. Im Modell liegt Arginin in einem Peptidstrang in direkter Nähe zur Lipase. Als direkter Bindungspartner kommt Glutamat⁵⁸ der Lipase in Frage. Diese Position ist in den Lipasen verschiedener Familien konserviert. Durch den Austausch zu Cystein wird die Position 327 mit einer polaren, aber ungeladenen AS besetzt. Zur Ausbildung einer starken Bindung kann es daher nicht mehr kommen, trotzdem bleibt die Lipaseaktivität bei heterologer Expression vergleichbar zur Positiv-Kontrolle.

Beide Austausche in der Variante 4-25 bewirkten bei heterologer Expression gemeinsam eine drastische Reduzierung der Lipaseaktivität auf 3 % im Verhältnis zur Positiv-Kontrolle. Diese Reduzierung konnte keiner der Einzelaustausche aufweisen. Daher ist ein Zusammenspiel des Austausches an Position 258 und Position 327 für die Aktivitätsreduzierung verantwortlich.

Die ep-LipH-Variante 4-32, bestehend aus den Austauschen R199H und E324G, weist bei heterologer Expression eine deutlich reduzierte Lipaseaktivität von ca. 21 % auf. Die Foldase konnte in der Immunodetektion nicht oder nur sehr schwach als Volllängenprodukt nachgewiesen werden. Lediglich im deutlich kleineren kDa-Bereich konnten spezifische Signale detektiert werden, die vermutlich Abbauprodukte der Foldase darstellen. Die Lipase LipA konnte nicht detektiert werden.

Einzelaustausch R199H in der Foldase zeigt bei heterologer Expression keine Hofbildung und damit keine Lipaseaktivität. Im Sequenzvergleich sieht man, dass Arginin an dieser Position in mehr als zwei der vier Familien konserviert ist. Im Modell liegt die AS in einer Helix in unmittelbarer Nähe zur Lipase. Ein Kontakt zur Lipase wäre dem Modell zufolge über Leucin²³ der Lipase möglich. Durch den Austausch zu Histidin kommt es bei heterologer Expression zum Aktivitätsverlust der Lipase.

Der Austausch E324G in der Foldase wies bei heterologer Expression eine vergleichbare, jedoch leicht reduzierte Hofbildung auf. Diese Position ist in den vier Familien nicht konserviert. Allerdings ist sie in Familie I in vier von fünf Fällen mit einem Glutamat besetzt, im fünften Fall mit einem Aspartat, ebenfalls einer AS mit negativ geladener Seitenkette. E324 liegt laut Modell in einem „coil“ in direkter Nähe zur Lipase, eine Interaktion ist im Modell jedoch nicht erkennbar.

Bei erneuter Betrachtung der beiden Einzelaustausche ist die Reduzierung der Lipaseaktivität bei heterologer Expression der Variante 4-32 auf 21 % auf beide Austausche zurückzuführen, wobei Austausch R199H mehr ins Gewicht fällt, da Austausch E324G nur eine leichte Reduzierung der Lipaseaktivität bewirkte.

Die ep-LipH-Variante 4-37, bestehend aus den Austauschen A132V, Q242L und E313G, weist bei heterologer Expression eine deutlich reduzierte Lipaseaktivität von ca. 36 % auf. Laut Immunodetektion der Foldase ist die Proteinmenge im Vergleich zum WT jedoch nur geringfügig reduziert. Die Lipase LipA konnte immunologisch nicht detektiert werden.

Die Einzelaustausche A132V und Q242L in der Foldase zeigen bei heterologer Expression eine reduzierte Hofbildung und damit eine Reduzierung der Lipaseaktivität, der Einzelaustausch E313G zeigt eine leicht vergrößerte Hofbildung und damit eine Erhöhung der Lipaseaktivität.

Position 132 ist in mehr als zwei der vier Familien mit Alanin konserviert. Nach dem berechneten Modell liegt Alanin in einer Helix ohne direkte Nähe zur Lipase. Alanin scheint nicht an der Oberfläche lokalisiert zu sein, was mit dem Hydrophobizitäts-Index von 1,8 korreliert. Eine Interaktion mit anderen Proteinen ist daher unwahrscheinlich. Eventuell kommt es durch den Austausch zu Valin zu einer veränderten Orientierung. Alanin befindet sich in einer hydrophoben Umgebung. Ein Austausch zu Valin, einer ebenfalls hydrophoben AS, jedoch mit einem deutlich höheren Hydrophobizitäts-Index von 4,2, könnte eine sterischen Veränderung zur Folge haben.

Der Austausch Q242L in der Foldase zeigt bei heterologer Expression ebenfalls eine reduzierte Hofbildung. Glutamin ist an dieser Position nicht stark konserviert. Allerdings haben vier der fünf Vertreter der Familie I sowie beide Vertreter aus Familie III ein Glutamin an dieser Position. Im Modell sitzt die AS in einer Helix an der Oberfläche. Diese Helix stellt eine Art Bügel zwischen den zwei Domänen des LipH dar. Im Gegensatz zu Glutamin orientiert sich der AS-Austausch Leucin eher zum Proteininneren und ist etwas kleiner.

Der Einzelaustausch E313G wies eine leichte Erhöhung der Lipaseaktivität auf. Im Sequenzvergleich ist diese Position nicht konserviert, allerdings ist Glutamat in den Familien I und II 6-mal an dieser Stelle vertreten. Im Modell liegt Glutamat in einer Helix an der Oberfläche. Dieser gesamte Bereich ist sehr beweglich. Glutamat bildet als polare, geladene AS Bindungen zu anderen polaren AS aus. Ein Kontakt zu anderen Proteinen ist daher denkbar. Durch den Austausch zu Glycin wird diese Position mit einer ungeladenen, unpolaren AS besetzt. Diese AS beteiligen sich nur selten direkt an der Katalyse. Im Fall der

heterologen Expression scheint die Interaktion des Glutamats nicht erforderlich, sogar hinderlich gewesen zu sein.

Wahrscheinlich wird die Reduzierung der Lipaseaktivität bei heterologer Expression der Variante 4-37 auf 36 % durch die Austausch A132V und Q242L bewirkt. Die leichte Erhöhung der Aktivität durch den Austausch E313G wird so kompensiert.

3.3.3 Screening der ortsspezifischen LipH-Mutanten im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1

Nachdem der Einfluss jedes einzelnen AS-Austausches in der Foldase auf die Aktivität der Lipase unter heterologen Expressionsbedingungen analysiert wurde, sollte geklärt werden, welchen Einfluss die Austausch unter homologen Expressionsbedingungen haben und ob es, wie schon zuvor bei den ep-LipH-Varianten beobachtet, Unterschiede in der Lipaseaktivität zwischen heterologer und homologer Expression gibt.

Indikatoragarplatten

Das erste Screening fand - wie zuvor bei der heterologen Expression - auf Tributyrinagar-Platten statt. Bereits nach einer Inkubation der Platten bei 37 °C üN ist die Lipaseaktivität nachweisbar. Eine mehrtägige Inkubation bei 4 °C wie bei heterologer Expression war nicht notwendig, da der homologe Wirt über den TypII-Sekretionsmechanismus verfügt und die Lipase extrazellulär sekretiert wird.



Abb. 3.8: Bestimmung der lipolytischen Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten im homologen Wirt auf Tributyrin-Agarplatten. Die Aktivität wird mittels Hofbildung um die Kolonie detektiert und konnte im homologen Wirt nach einer Inkubation bei 37° C üN beobachtet werden. Die Lipaseaktivität konnte über Kontrollen (+: Positivkontrolle *P. aeruginosa* PABST7.1/pBBRPA-lipAH, -:Negativ-Kontrolle *P. aeruginosa* PABST7.1/pBBR1MCS) ins Verhältnis gesetzt werden. Die Ergebnisse konnten in zwei unabhängigen Anzuchten verifiziert werden

Bereits auf der Indikatorplatte sind deutliche Unterschiede in der Hofgröße und der damit korrelierenden Lipaseaktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten zu erkennen.

Spektrophotometrische Bestimmung der Lipaseaktivität

Um detailliertere Ergebnisse zu erlangen, wurde die Lipaseaktivität ebenfalls spektrophotometrisch bestimmt.

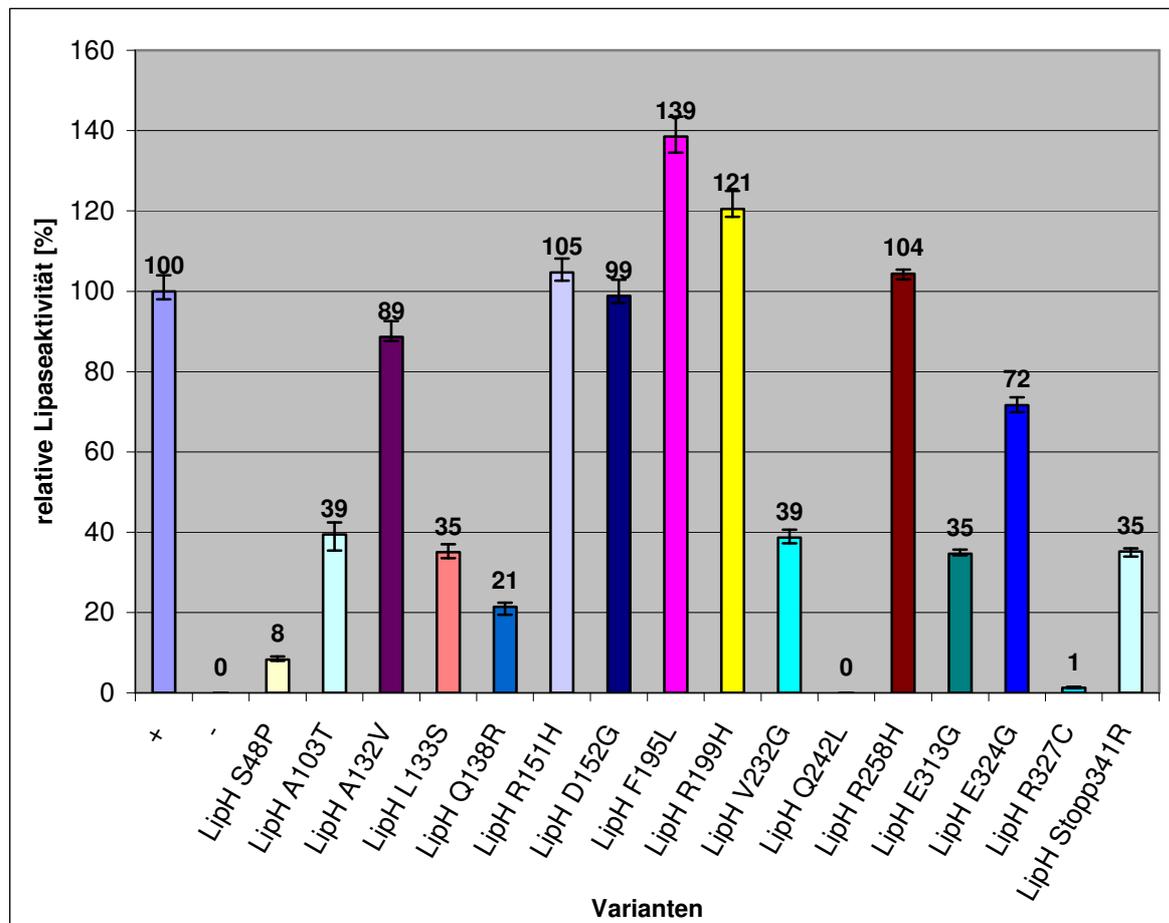


Abb. 3.9: Lipolytische Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten im homologen Wirt. Die Lipaseaktivität im Kulturüberstand wurde mit *pNPP* als Substrat bestimmt. Dargestellt ist die relative Lipaseaktivität im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit den Plasmiden zur Expression der ep-LipH-Varianten im Operon mit der WT-Lipase nach 16 Wuchs. Die Werte von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit pBBR1MCS/*lipAH* (WT-Operon) wurden gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Wie in Abbildung 3.9 zu sehen, zeigten die ortsspezifischen LipH-Varianten auch bei einer Flüssigkultur-Anzucht Unterschiede in der Lipaseaktivität. Im Gegensatz zum vorangegangenen Screening auf Indikatorplatten, ermöglichen die hierbei erhaltenen Ergebnisse eine quantitative Aussage, da die bestimmte Lipaseaktivität in Relation zur

optischen Dichte gesetzt wurde. Im Verhältnis zur WT-Variante zeigten die ep-LipH-Varianten eine deutliche Reduzierung, aber auch eine deutliche Erhöhung der Lipaseaktivität.

Immunologischer Nachweis des Chaperons LipH und der Lipase LipA

Im homologen Wirt *P. aeruginosa* liegt die Foldase LipH aminoterminal membrangebunden vor und muss bei einem immunologischen Nachweis daher im GZE detektiert werden. Die Lipase LipA liegt als extrazelluläres Enzym im Kulturüberstand vor. Um die Lipase immunologisch detektieren zu können, wurden die Proteine des Kulturüberstandes mittels Trichloressigsäure (2.17) präzipitiert.

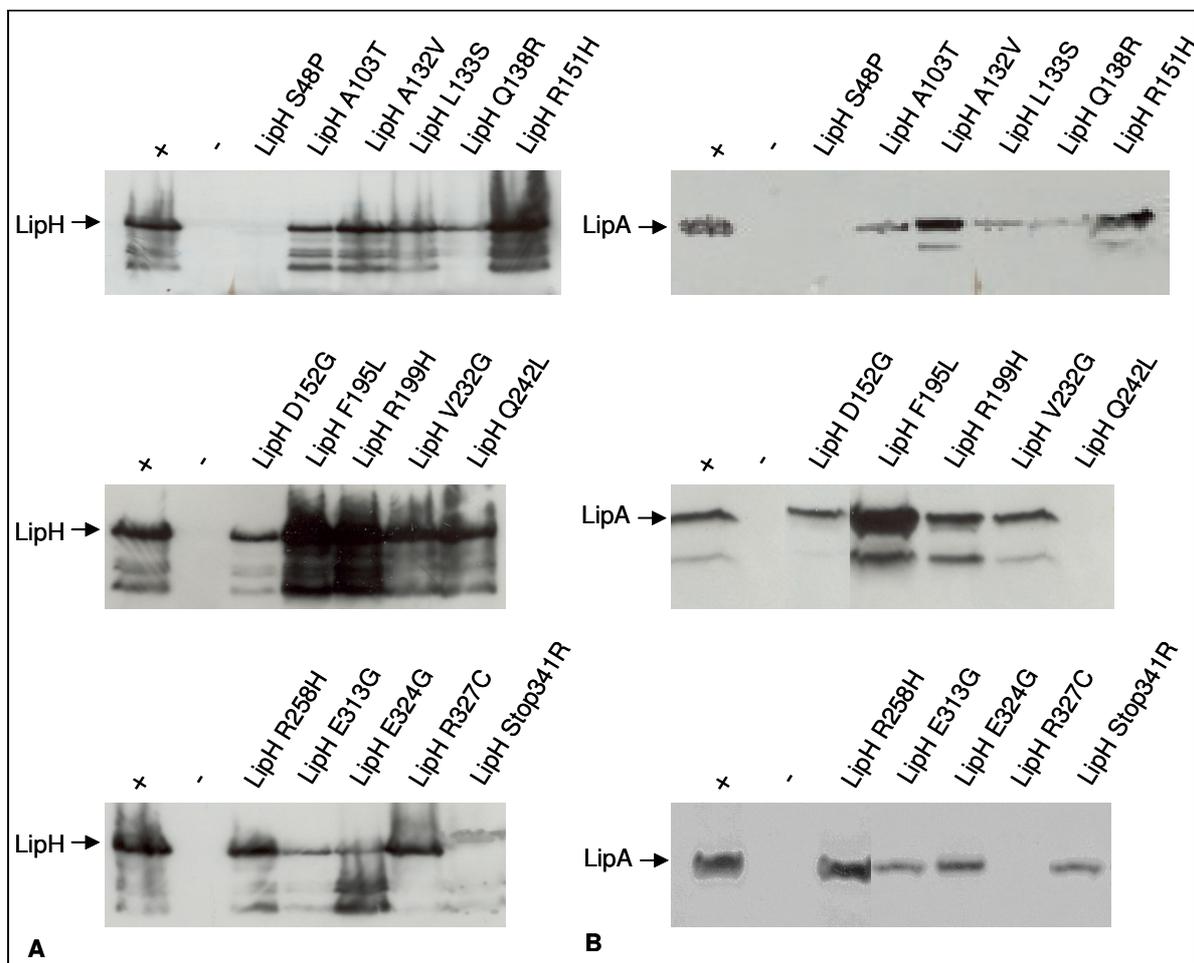


Abb. 3.10: Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei homologer Expression der ortsspezifischen LipH-Mutanten. Die Bakterien wurden für 16 h bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. +: Positivkontrolle *P.aeruginosa* PABST7.1/pBBRPA-lipAH, -:Negativ-Kontrolle *P.aeruginosa* PABST7.1/pBBR1MCS) **A:** Immunodetektion der Foldase LipH. Die auf das Gel aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580nm} = 0,15). Der Nachweis erfolgte mit einem LipH-spezifischen Antiserum. **B:** Immunodetektion der Lipase LipA im Kulturüberstand. Die Kulturvolumen, die einer O.D._{580nm} = 0,3 entsprachen, wurden mit TCA gefällt. Der Nachweis der Lipase erfolgte mit einem Lipase-spezifischen Antiserum.

Die aus den Austauschen A103T, L133S und D152G bestehende ep-LipH-Variante 1-16, weist bei homologer Expression eine stark erhöhte Lipaseaktivität von fast 800 % auf. Laut Immunodetektion ist die LipH-Menge vergleichbar mit dem WT-Niveau; Die Lipasemenge im Überstand ist nur leicht erhöht (Abb. 3.5).

Betrachtet man die Ergebnisse der Indikatoragarplatte bei homologer Expression, so zeigen die Austausche A103T und D152G eine vergleichbare, eher leicht reduzierte Lipaseaktivität im Verhältnis zum WT; Einzelaustausch L133S zeigt eine deutlich reduzierte Lipaseaktivität im Verhältnis zur Koloniegröße.

Die LipH-Mutante A103T zeigt bei homologer Expression auf der Indikatorplatte eine leicht reduzierte Aktivität. Das Ergebnis der spektrometrisch bestimmten Lipaseaktivität stimmt mit diesem Ergebnis überein, die Lipaseaktivität ist auf 40 % des WT-Niveaus reduziert. In der LipH-Immunodetektion der LipH-Variante A103T wurde ein vergleichbares Signal wie im Fall des WT-LipH detektiert, was auf vergleichbare Mengen des Proteins schließen lässt. Die Lipasemenge scheint laut Immunodetektion jedoch leicht reduziert.

Durch den Austausch von Alanin zu Threonin (vgl. S. 48) ist weiterhin die Produktion aktiver Lipase möglich. Allerdings bewirkt der Austausch an der konservierten Position 103 eine Reduzierung der Lipaseaktivität auf 40 %.

Die Mutante L133S (vgl. S. 49) zeigte eine deutlich reduzierte Lipaseaktivität. Im spektrometrischen Test wurde dieses Ergebnis ebenfalls bestätigt, die Aktivität ist auf 35 % reduziert. Dieses ist auf die reduzierte Lipasemenge im Überstand zurückzuführen (siehe Abb. 3.10 B), obwohl das LipH-Protein in vergleichbarer Menge zum WT vorliegt (siehe Abb. 3.10 A).

Die Mutante D152G (vgl. S. 49) wies auf der Indikatorplatte eine leicht reduzierte Aktivität auf. Im spektrometrischen Lipaseaktivitätstest wurde dieses nicht bestätigt. Mit 99 % hat die Aktivität der gemessenen LipH-Mutante WT-Niveau. Laut Immunodetektion kann jeweils von gleichen, eher leicht reduzierten Proteinmengen der Proteine LipA und LipH im Verhältnis zum WT-Niveau ausgegangen werden (Abb. 3.10).

Durch den Austausch zu Glycin kommt es zwar zum Verlust der stabilisierenden Salzbrücke zwischen Aspartat152 und Arginin163 und somit zu einer erhöhten Flexibilität an der schwach konservierten Position 152, dennoch wird weiterhin aktive Lipase im WT-Niveau produziert.

Im Gegensatz zur ep-LipH-Variante 1-16 mit einer um 800 % erhöhten Lipaseaktivität, zeigt keiner der Einzelaustausche eine Aktivitätserhöhung. Die Aktivitätssteigerung beruht daher auf einem Zusammenspiel der drei Austausche in der Variante 1-16.

Die aus den Austauschen R151H und F195L bestehende ep-LipH-Variante 1-36 weist bei homologer Expression eine stark erhöhte Lipaseaktivität von fast 900 % auf. Laut Immunodetektion ist die LipH-Menge vergleichbar mit dem WT-Niveau; Die Lipasemenge im Überstand ist nur leicht erhöht (Abb. 3.5).

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Indikatoragarplatte bei homologer Expression, zeigen die Austausche R151H und F195L eine vergleichbare Lipaseaktivität im Verhältnis zur WT-Variante.

Die LipH-Mutante R151H (vgl. S. 50) zeigte auf der Indikatorplatte eine zur Positiv-Kontrolle vergleichbare Aktivität. Das Ergebnis der spektrometrisch bestimmten Lipaseaktivität stimmt damit überein, die Lipaseaktivität liegt bei 105 % des WT-Niveaus. Laut Immunodetektion ist die Foldasemenge zwar erhöht, die Lipasemenge jedoch vergleichbar zum WT-Niveau (Abb. 3.10).

Bei einem Austausch an Position 151 der Foldase von Arginin zu Histidin stehen Aspartat oder Glutamat (AS 150 und 152) weiterhin als Bindungspartner zur Verfügung. Bei homologer Expression erreicht die Lipaseaktivität daher WT-Niveau.

Die Mutante F195L (vgl. S. 50) zeigte auf der Indikatorplatte ebenfalls eine Lipaseaktivität auf Niveau der Positiv-Kontrolle. Wie im spektrometrischen Test der entsprechenden Flüssigkultur ermittelt wurde, bewirkt der Austausch der in der ersten Helix eines Helix-Turn-Helix-Motives gelegene Position 195 zu Leucin bei homologer Expression eine Erhöhung der Lipaseaktivität auf 139 %. Die Erhöhung ist laut Immunodetektion schlüssig, da deutlich erhöhte Mengen Foldase- als auch Lipase-Protein detektiert wurden (Abb. 3.10).

Die Austausche R151H und F195L bewirken zusammen eine deutliche Aktivitätserhöhung der Lipase auf 900 %. Da der Einzelaustausch R151H sich bei homologer Expression relativ neutral darstellt, ist der Austausch an der Position 195 für die Aktivitätssteigerung verantwortlich; Der Effekt kann mit dem Austausch an Position 151 deutlich gesteigert werden.

Die aus den Austauschen V232G und Stopp341R bestehende ep-LipH-Variante 3-49 weist bei homologer Expression eine erhöhte Lipaseaktivität von ca. 150 % auf. Obwohl die LipH-Menge laut Immunodetektion deutlich reduziert ist, ist die Lipasemenge im Überstand vergleichbar mit dem WT-Niveau.

Die Ergebnisse der Indikatoragarplatte bei homologer Expression zeigen, dass die Austausche V232G und Stopp341R eine vergleichbare, eher leicht reduzierte Lipaseaktivität im Verhältnis zur Positiv- Kontrolle bewirken.

Die LipH-Mutante V232G, die laut Modell in einer Helix liegt, die eine Art Bügel zwischen zwei LipH-Domänen darstellt (vgl. S. 51), zeigte bei homologer Expression auf der Indikatorplatte eine leicht reduzierte Aktivität. Dies stimmt mit dem Ergebnis der spektrometrisch bestimmten Lipaseaktivität überein, die Lipaseaktivität ist auf 39 % des WT-Niveaus reduziert. Die jeweiligen Proteinmengen sind laut Immunodetektion hingegen vergleichbar mit dem WT-Niveau (Abb. 3.10).

Die Mutante Stopp341R (vgl. S. 51) wies auf der Indikatorplatte eine leicht reduzierte Aktivität auf. Im spektrometrischen Lipaseaktivitätstest wurde dieses ebenfalls bestätigt: Mit 35 % der WT-Lipaseaktivität ist die Aktivität der gemessenen Mutante deutlich reduziert. Laut Immunodetektion ist die Foldase- sowie die Lipase-Proteinmenge reduziert (Abb. 3.10). Durch die Mutation des Stoppcodons kommt es zu einer Verlängerung des LipH-Proteins um 67 AS, was - im Gegensatz zur heterologen - bei homologer Expression eine Reduzierung der Lipaseaktivität bewirkt. Da unter homologen Expressionsbedingungen kein Einzelaustausch zu einer Aktivitätssteigerung führte, beruht die Aktivitätssteigerung der Variante 3-49 auf beiden Austauschen.

Die aus den Austauschen S48P und Q138R bestehende ep-LipH-Variante 4-15 weist bei homologer Expression eine stark erhöhte Lipaseaktivität von 775 % auf. Trotz deutlich reduzierter LipH-Menge ist die Lipasemenge vergleichbar mit der der WT-Variante (Abb.3.5).

Die Ergebnisse der Indikatoragarplatte bei homologer Expression zeigen, dass die Austausche S48P und Q138R eine deutlich reduzierte Lipaseaktivität im Verhältnis zur Positiv-Kontrolle bewirken.

Die LipH-Mutante S48P (vgl. S. 52) zeigte bei homologer Expression auf der Indikatorplatte eine deutlich reduzierte Aktivität. Dem entspricht auch das Ergebnis der spektrometrisch bestimmten Lipaseaktivität: Die Lipaseaktivität ist auf 8 % des WT-Niveaus reduziert. Die LipH-Proteinmenge ist drastisch reduziert; das LipA-Protein konnte nicht detektiert werden (Abb. 3.10).

Die Mutante Q138R (vgl. S. 52) zeigte ebenfalls eine deutlich reduzierte Lipaseaktivität, sie ist auf 21 % reduziert. Obwohl die LipH-Menge nur leicht reduziert ist, konnte deutlich weniger LipA-Protein im Überstand im Vergleich zum WT detektiert werden (Abb. 3.10).

Im Gegensatz zur ep-LipH-Variante 4-15 mit einer um 775 % erhöhten Lipaseaktivität zeigt keiner der Einzelaustausche eine Aktivitätserhöhung. Die Aktivitätssteigerung beruht daher auf einem Zusammenspiel der zwei Austausche in der Variante 4-15.

Die aus den Austauschen R258H und R327C bestehende ep-LipH-Variante 4-25 weist bei homologer Expression eine stark reduzierte Lipaseaktivität von ca. 1 % auf. Obwohl LipH in einer der Positiv-Kontrolle vergleichbaren Menge vorliegt, konnte das Lipase-Protein nur im GZE detektiert werden und nicht im Überstand (Abb. 3.5). Eine Sekretion der Lipase blieb somit aus, was die nahezu nicht vorhandene Lipaseaktivität im Überstand erklärt.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Indikatoragarplatte bei homologer Expression, so zeigt der Austausch R258H eine vergleichbare Lipaseaktivität im Verhältnis zur WT-Variante und Einzelaustausch R327C eine deutlich reduzierte Lipaseaktivität.

Die LipH-Mutante R258H (vgl. S. 52) wies bei homologer Expression auf der Indikatorplatte eine zur Positiv-Kontrolle vergleichbare Aktivität auf. Das Ergebnis der spektrometrisch bestimmten Lipaseaktivität bestätigte dies, die Lipaseaktivität liegt bei 104 % des WT-Niveaus. Die jeweils detektierten Proteinmengen sind ebenfalls vergleichbar (Abb. 3.10).

Die Mutante R327C (vgl. S. 53) zeigte eine deutlich reduzierte Lipaseaktivität. Auch der spektrometrische Test ergab eine Reduktion der Aktivität auf 1 %. Obwohl die LipH-Proteinmenge vergleichbar mit dem WT-Niveau ist, konnte keine Lipase im Überstand detektiert werden (Abb. 3.10).

Beide Austausche in der Variante 4-25 bewirkten bei homologer Expression gemeinsam eine drastische Reduzierung der Lipaseaktivität auf 1 %. Diese Reduzierung ist auf den Verlust der starken Bindungsfähigkeit an Position 327 zur Lipase zurückzuführen. Daher ist der Austausch R327C für die Aktivitätsreduzierung verantwortlich.

Die aus den Austauschen R199H und E324G bestehende ep-LipH-Variante 4-32 weist bei homologer Expression eine stark reduzierte Lipaseaktivität von 0,3 % auf. Obwohl LipH in vergleichbarer Menge wie im WT vorliegt, konnte das Lipase-Protein nur im GZE detektiert werden und nicht im Überstand (Abb. 3.5). Eine Sekretion der Lipase blieb somit aus, was die fast nicht vorhandene Lipaseaktivität im Überstand erklärt.

Laut Indikatoragarplatte zeigen die Austausche R199H und E324G bei homologer Expression eine vergleichbare Lipaseaktivität im Verhältnis zur Positiv-Kontrolle.

Die LipH-Mutante R199H (vgl. S. 53) wies auf der Indikatorplatte eine mit der Positiv-Kontrolle vergleichbare Lipaseaktivität auf. Im spektrometrischen Lipaseaktivitätstest lag die

Aktivität mit 121 % leicht über WT-Niveau. Die LipH-Proteinmenge ist im Vergleich zum WT-Niveau deutlich, die der Lipase nur leicht erhöht (Abb. 3.10).

Die Mutante E324G (vgl. S. 53) zeigte eine mit der Positiv-Kontrolle vergleichbare Lipaseaktivität. Im spektrometrischen Test war sie mit 72 % leicht reduziert. Die LipH-Menge scheint laut Immunodetektion leicht reduziert zu sein, allerdings wurden deutlich mehr Abbauprodukte der Foldase detektiert, was auf eine geringere Stabilität hindeutet. Die Lipasemenge scheint ebenfalls leicht reduziert zu sein (Abb. 3.10).

Bei erneuter Betrachtung der beiden Einzelaustausche ist die Reduzierung der Lipaseaktivität bei homologer Expression der Variante 4-32 auf 0,3 % auf Austausch E324G zurückzuführen, wobei der Austausch R199H eine Verstärkung der Aktivitätsreduzierung bewirkt.

Die aus den Austauschen A132V, Q242L und E313G bestehende ep-LipH-Variante 4-37 weist bei homologer Expression eine stark erhöhte Lipaseaktivität von ca. 650 % auf. Sowohl die Foldase- als auch die Lipase-Proteinmengen sind mit dem WT-Niveau vergleichbar.

Betrachtet man die Ergebnisse der Indikatoragarplatte bei homologer Expression, so zeigen die Austausche A132V und E313G eine deutlich reduzierte Lipaseaktivität im Verhältnis zur Positiv-Kontrolle. Einzelaustausch Q242L weist eine leicht reduzierte Lipaseaktivität auf.

Die LipH-Mutante A132V (vgl. S. 54) zeigte bei homologer Expression auf der Indikatorplatte eine deutlich reduzierte Aktivität. Die spektrometrisch bestimmte Lipaseaktivität liegt jedoch bei 89 % des WT-Niveaus und ist daher nur leicht reduziert. Die detektierten Proteinmengen sind vergleichbar mit dem WT-Niveau (Abb. 3.10).

Die Mutante Q242L (vgl. S. 54) wies auf der Indikatorplatte eine leicht reduzierte Aktivität auf. Im spektrometrischen Lipaseaktivitätstest konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Die vorhandene LipH-Menge ist vergleichbar zum WT-Niveau; Die Lipase konnte immunologisch nicht im Überstand nachgewiesen werden.

Die Mutante E313G (vgl. S. 54) zeigte eine deutlich reduzierte Lipaseaktivität. Im spektrometrischen Test wurde dieses Ergebnis bestätigt, die Aktivität ist auf 35 % reduziert. Die Foldase sowie die Lipasemenge ist im Vergleich zum WT-Niveau deutlich verringert (Abb. 3.10).

Die Erhöhung der Lipaseaktivität bei heterologer Expression der Variante 4-37 auf 650 % kann nur auf ein Zusammenspiel der drei Austausche A132V, Q242L und E313G zurückgeführt werden, da jeder Austausch für sich eine mehr oder weniger starke Reduzierung der Lipaseaktivität mit sich bringt.

3.4 Isolierte Analyse ausgewählter LipH-Varianten in *in vitro*-Experimenten

Ablaufende Prozesse in einer Zelle sind nie voneinander getrennt zu sehen. Um dennoch eine isolierte Betrachtung der Lipase-Aktivierung zu ermöglichen, wurden bestimmte LipH-Varianten überexprimiert, aufgereinigt und in *in vitro*-Experimenten eingesetzt, um so gezielt deren Einfluss zu analysieren. Einige der eingeführten Einzel-Austausche bewirkten bei heterologer Expression eine Steigerung der Lipase-Aktivität, unter homologen Expressionsbedingungen allerdings eine deutliche Reduzierung. Um diese Varianten unabhängig von wirtsspezifischen Faktoren untersuchen zu können, wurden daher die LipH-Varianten V232G, Stopp341R und ep-LipH-Variante 3-49, die beide Austausche enthält, ausgewählt. Darüber hinaus wurde LipH-Variante S48P für *in vitro*-Experimente aufgereinigt, da dieser N-terminale Austausch eine Reduzierung der Lipase-Aktivität bewirkte.

3.4.1 Heterologe Überexpression und Reinigung von LipA als „inclusion-bodies“

Die Überexpression der *P. aeruginosa*-Lipase LipA wurde im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3)/pLipA-SS in LB-Medium durchgeführt. Dazu wurden die Zellen, wie unter 2.4.3 beschrieben, angezogen und die Expression der Lipase durch Zugabe von IPTG (0,4 mM Endkonzentration) induziert. Zwei Stunden nach Induktion der Überexpression wurde diese durch das Sedimentieren der Zellen gestoppt und der Erfolg der Überexpression über eine SDS-PAGE (2.18) analysiert (Abb. 3.11). Das Fehlen eines für die endgültige Sekretion essentiellen Xcp-Apparats führt zur zellulären Aggregation der Lipase. Die durch das gewählte Überexpressionssystem entstandenen „inclusion-bodies“ enthielten die ungefaltete Lipase, sodass nach Rückfaltung von LipA in den „nah nativen“ Zustand eine Interaktion mit dem Chaperon LipH möglich blieb. Dazu wurde die die LipA-„inclusion-bodies“ enthaltende Überexpressionskultur BL21(DE3)/pLipA-SS aufgeschlossen und die Proteinaggregate durch mehrere aufeinander folgende Wasch- und Zentrifugationsschritte aus dem GZE gereinigt (2.20). Der Erfolg der Extraktion der Lipase Zelleinschluss-Körper wurde über eine SDS-PAGE (2.18) überprüft (Abb. 3.11).

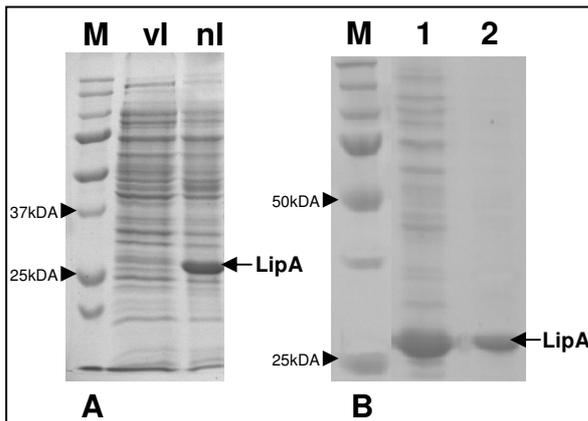


Abb. 3.11: Überexpression und Aufreinigung der Lipase LipA. **A:** SDS-PAGE der Überexpression der Lipase im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3). M: Marker, vl: GZE der *E. coli* BL21(DE3)/pLipA-SS-Überexpressions-Kultur vor Induktion. nl: GZE der *E. coli* BL21(DE3)/pLipA-SS-Überexpressions-Kultur nach 2 h Induktion. **B:** SDS-PAGE der Aufreinigung der Lipase, M: Marker, 1: GZE der *E. coli* BL21(DE3)/pLipA-SS-Überexpressions-Kultur nach 2 h Induktion., 2: Eluat. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580nm} = 0,15$).

Eine vollständige Denaturierung der LipA-„inclusion-bodies“ wurde durch Aufnahme in 8 M Harnstoff und anschließende Inkubation bei 37 °C für eine Stunde erzielt. Anschließend wurde die Lipase LipA direkt in Rückfaltungsexperimenten eingesetzt oder bei 4 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Eine anschließende Proteinquantifizierung über ein BCA-Assay gab Aufschluss über die gewonnene Menge Protein. Insgesamt wurden aus einer 100 ml Überexpressions-Kultur 4,5 mg LipA „inclusion-bodies“ für anschließende Experimente aufgereinigt.

3.4.2 Heterologe Überexpression und Reinigung von LipH als Poly-Histidin-Fusionsprotein

Um ausgewählte LipH-Varianten aufzureinigen, mussten diese in den His-Tag-Vektor pET19b umklont werden. Dazu wurde das jeweilige *lipH*-Gen mittels der Primer „Ht Up“ und „Ht Down“ amplifiziert. Als Template diente der jeweilige LipH-Varianten-Vektor pBBR1MCS/PA *lipA lipH X*, wobei das X für die jeweilige Variante steht. Über die angefügten Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* wurde das PCR-Produkt in den Vektor pET19b kloniert. Die Überexpression der Foldase-Varianten erfolgte im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3)/pET19b/PA *lipH X*. Diese Varianten wurden um den Membrananker verkürzt, sodass sie löslich vorliegen und tragen einen N-terminalen His-Tag, der die Ein-Schritt-Reinigung mittels IMAC (2.22) möglich macht.

Dazu wurden die Zellen, wie unter 2.4.3 beschrieben, in LB-Medium angezogen und die Foldase durch Zugabe von IPTG (0,4 mM Endkonzentration) überexprimiert. Zwei Stunden nach Induktion der Überexpression wurde diese durch das Sedimentieren der Zellen gestoppt und der Erfolg der Überexpression über eine SDS-PAGE (2.18) analysiert.

Die die His-Tag-LipH-Varianten überexprimierenden Kulturen BL21(DE3)/pET19b/PALipH X wurden aufgeschlossen und das LipH-Protein über den N-terminalen His-Tag mittels einer IMAC (2.22) gereinigt. Eine SDS-PAGE gab Aufschluss über den Reinigungserfolg.

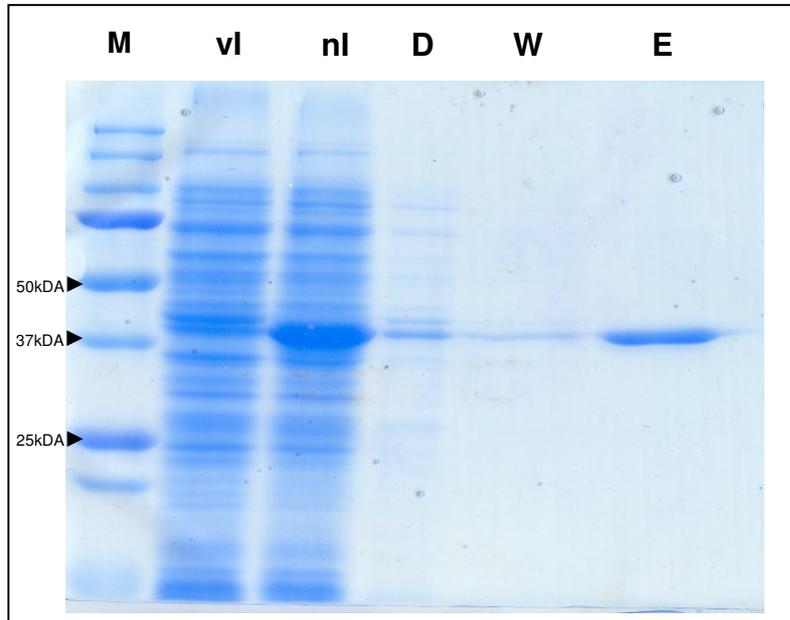


Abb. 3.12: SDS-PAGE der Überexpression und Aufreinigung der LipH-Variante His-LipH S48P. SDS-PAGE der Überexpression der Foldase im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3). M: Marker, vl: GZE der *E. coli* BL21(DE3)/pET19b/PALipH-Überexpressions-Kultur vor Induktion. nl: GZE der *E. coli* BL21(DE3)/pET19b/PALipH-Überexpressions-Kultur nach 2 h Induktion. D: Durchlauf. W: Waschfraktion. E: Eluat. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580nm} = 0,15$).

Eine anschließende Proteinquantifizierung über ein BCA-Assay gab Aufschluss über die gewonnene Menge Protein.

His -Protein	Konzentration µg/ml
His-LipH	650
His-LipH S48P	436
His-LipH V232G	563
His-LipH Stopp341R	675
His-LipH 3-49	531

Tab. 3.3: Übersicht der Proteinkonzentrationen der aufgereinigten LipH-Varianten.

3.4.3 *In vitro*-Renaturierung der *P. aeruginosa*-Lipase LipA

Es ist nicht bekannt, in welchem Faltungszustand sich die Lipase *in vivo* befindet, wenn sie im Periplasma der Zelle durch das LipH-Protein gefaltet wird. Sich in dem „nah nativen“ Zustand befindendes LipA kann mit einer Ausbeute von etwa 25 % in den nativen Zustand gebracht werden (Seuter, 1998).

Um Unterschiede der aufgereinigten LipH-Varianten in der *in vitro*-Renaturierung der Lipase LipA aus *P. aeruginosa* zu analysieren, wurden äquimolare Mengen Lipase und Foldase, wie unter 2.21 beschrieben, in 2 ml Rückfaltungspuffer aufgenommen. Dabei hatten die Lipase und die Foldase eine finale Konzentration von 4,25 µg/2 ml Rückfaltungspuffer. Nach einer Inkubation für drei Stunden bei 30 °C wurde die Lipaseaktivität nach der Methode von Winkler & Stuckmann (1979) analysiert. Als Probenvolumen dienten 20 µl des jeweiligen Renaturierungsansatzes.

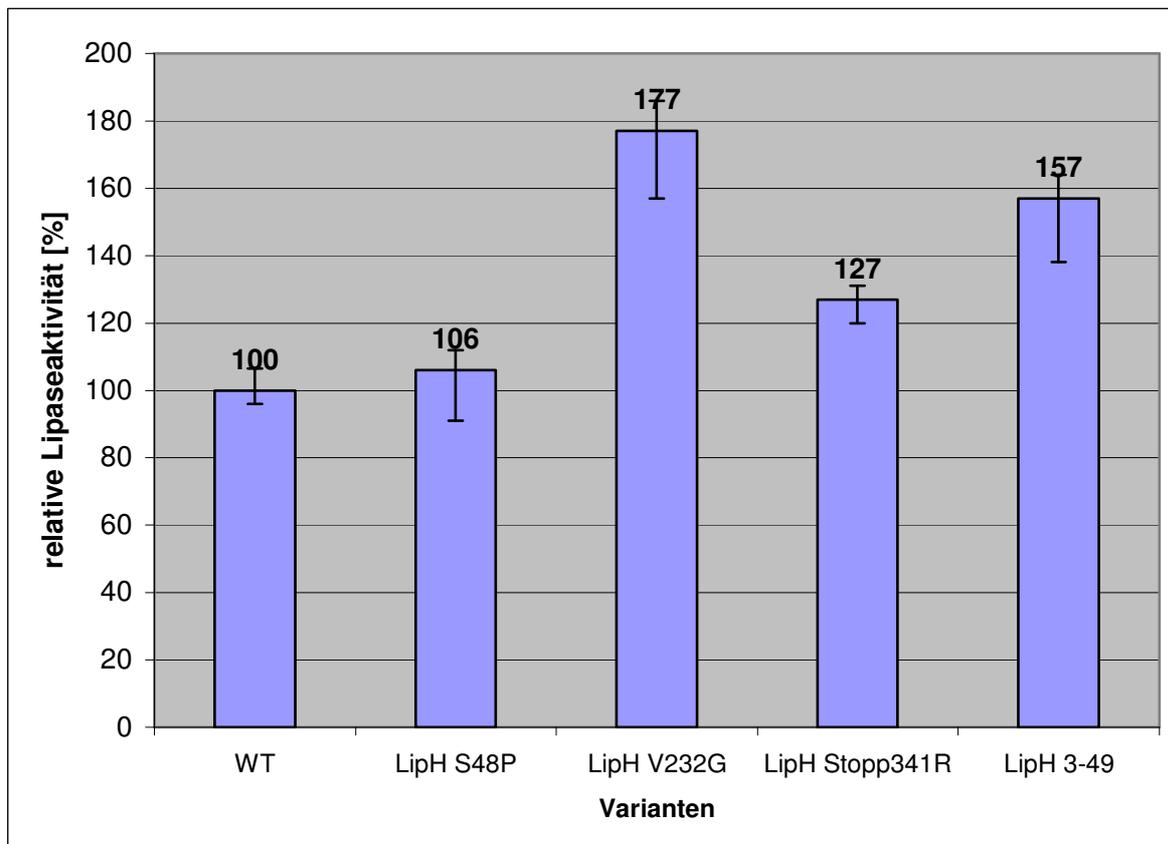


Abb. 3.13: Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase durch die LipH-Varianten. Die Lipaseaktivität wurde nach Winkler & Stuckmann (1979) analysiert. Als Proben-volumen dienten 20 µl des jeweiligen Renaturierungsansatzes. Die Lipaseaktivität des LipH-Renaturierungsansatzes wurde als 100 % Aktivität angesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Wie in Abb. 3.13 zu sehen, zeigt der Lipase-Renaturierungsansatz, der mit der LipH-Variante S48P inkubiert wurde, mit 106 % nahezu Lipaseaktivität in WT-Niveau.

Eine Inkubation des Lipase-Renaturierungsansatzes mit der LipH-Variante V232G resultierte in einer Aktivitätssteigerung auf 177 %.

Eine Aktivitätssteigerung wurde ebenfalls durch eine Inkubation des Lipase-Renaturierungsansatzes mit der LipH-Variante Stopp341R erlangt; Die Lipaseaktivität lag hier bei 127 % im Vergleich zum WT-Niveau.

Wurde der Lipase-Renaturierungsansatz mit der ep-LipH-Variante 3-49, die aus den Einzelaustauschen V232G und Stopp341R resultiert, inkubiert, wurde eine Lipaseaktivität von 157 % im Vergleich zur Positiv-Kontrolle bestimmt.

Die parallel als Negativ-Kontrollen angesetzten Renaturierungsansätze ohne LipH zeigten ausnahmslos keine lipolytische Aktivität (ohne Abb.).

3.4.4 Interaktionsversuche zwischen der Lipase LipA und den aufgereinigten LipH-Varianten

Bisher wurden bereits Unterschiede der einzelnen LipH-Varianten in der Lipaseaktivierung beobachtet. Ob es dabei auch zu Unterschieden in der Komplexbildung zwischen LipA und LipH kommt, wurde über so genannte Interaktionsexperimente zwischen der Lipase LipA und den aufgereinigten LipH-Varianten untersucht.

Um die Interaktion und deren Unterschiede zwischen dem LipA-Protein und den LipH-Varianten zu untersuchen, wurden die LipH-Varianten mittels Ni^{2+} -NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Hilden) immobilisiert. Nach einem Waschschrift wurde das immobilisierte LipH mit „nah nativem“ LipA für drei Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der LipAH-Komplex über eine erhöhte Imidazolkonzentration von den Ni^{2+} -NTA Magnetic Agarose Beads verdrängt und so eluiert.

Um eine Sättigung der Ni^{2+} -NTA Magnetic Agarose Beads zu erzielen, wurde die jeweilige LipH-Variante bzw. das WT-LipH in einem doppelten Überschuss mit den Beads inkubiert. Die eingesetzte Beads-Menge (500 μl) hat eine Bindekapazität von 150 μg Protein. Um eine Absättigung zu garantieren, wurden die Beads mit 300 μg Protein inkubiert. Die Lipase LipA wurde ebenfalls im Überschuss zu den Beads gegeben; 300 μg LipA-Protein konnten mit 150 μg immobilisiertem LipH interagieren. Die Interaktion wurde über entnommene Aliquots während des Experiments kontrolliert, welche mittels einer SDS-PAGE (2.18) analysiert wurden.

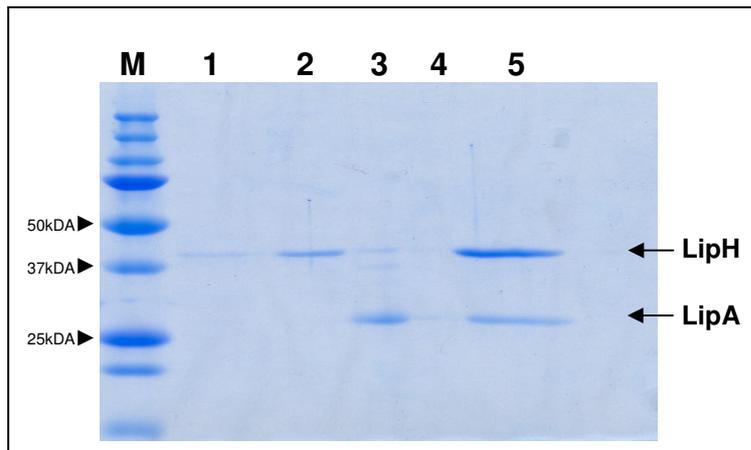


Abb. 3.14: SDS-PAGE des Interaktionsversuchs zwischen der Lipase LipA und der Foldase LipH.

M: Marker, 1: Durchlauf LipH, 2: Waschfraktion LipH, 3: Durchlauf LipA, 4: Waschfraktion LipA, 5: Eluat. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580nm} = 0,15$).

Da sich die Bandenmuster der verschiedenen LipH-Varianten im Interaktionsversuch nicht unterschieden, wurde exemplarisch nur eine SDS-PAGE abgebildet.

In Spur 1 und 2 ist gut zu erkennen, dass die jeweilige LipH-Variante in einem Überschuss zu den Ni^{2+} -NTA Magnetic Agarose Beads gegeben wurde, da im Durchlauf sowie in der Waschfraktion LipH auf einer Höhe von 37 kDa nachgewiesen werden konnte.

In Spur 3, dem Durchlauf der Lipase LipA, konnte auf Höhe von 29 kDa ebenfalls eine Bande detektiert werden, die dem überschüssigen LipA-Protein zugeordnet werden kann.

Nachdem in der folgenden Waschfraktion (Spur 4) nahezu kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte, wurde durch die Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM die jeweilige Foldase-Variante im Komplex mit der Lipase eluiert (Spur 5).

Allerdings wird der LipAH-Komplex durch die denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE aufgelöst, sodass jeweils eine Bande bei 37 kDa und eine bei 29 kDa detektiert wurde, die dem LipH- bzw. LipA-Protein entsprechen.

Mit den aufgefangenen Durchlauf- und Waschfraktionen sowie dem Eluat wurde ein Lipaseaktivitätstest durchgeführt, um eine Aussage über die Verteilung der Lipaseaktivität treffen zu können. Dazu wurde die Lipaseaktivität mit jeweils 10 μ l der jeweiligen Fraktion nach der Methode von Winkler & Stuckmann (1979) bestimmt.

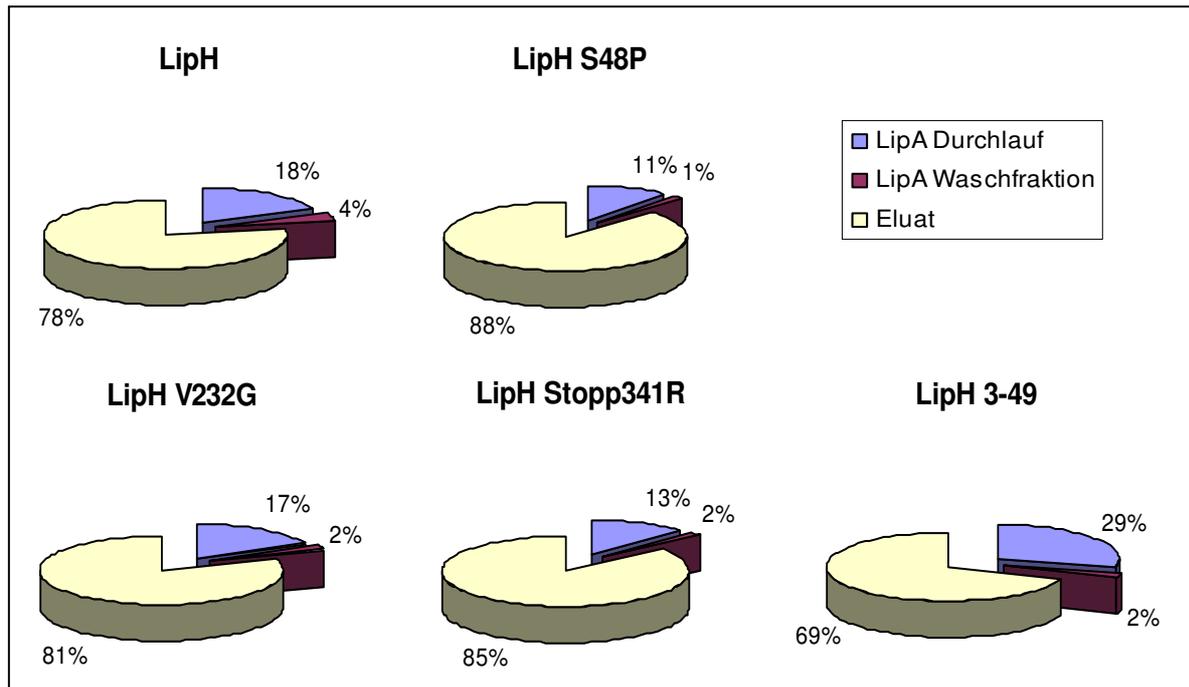


Abb. 3.15: Verteilung der Lipaseaktivität auf die einzelnen Fraktionen der LipH-Varianten. Die Lipaseaktivität wurde nach Winkler & Stuckmann (1979) mit 10µl der jeweiligen Fraktion bestimmt. Um die Lipaseaktivität der einzelnen Fraktionen besser vergleichen zu können, wurde die Lipaseaktivität aller Fraktionen des jeweiligen Renaturierungsansatzes addiert. Dieser Wert entsprach 100 % der Aktivität. Die Aktivität der jeweiligen Fraktion wurde dazu ins Verhältnis gesetzt. Auf die Darstellung der jeweiligen LipH-Durchlauf- und -Waschfraktion wurde verzichtet, da hier keine Lipaseaktivität detektiert wurde.

Wie in Abb. 3.15 zu sehen, ist die Lipaseaktivität der einzelnen Fraktionen der verschiedenen Renaturierungsansätze in etwa gleich verteilt. Der größte Teil der Lipaseaktivität wurde jeweils im Eluat detektiert: Zwischen 69 % und 88 % der Gesamtaktivität sind hier zu finden. Der Großteil der restlichen Aktivität, zwischen 11 % und 29 % der Gesamtaktivität, ist im LipA-Durchlauf detektiert worden. Die restliche Lipaseaktivität, zwischen 1 % und 4 %, ist in der LipA-Waschfraktion zu finden.

Zur Aktivierung der Lipase geht die Foldase mit dieser einen stabilen Komplex ein. Im durchgeführten Versuch lag die Foldase immobilisiert vor. Die zugeführte Lipase konnte während der drei-stündigen Inkubation den zur Aktivierung notwendigen Komplex mit der Foldase eingehen. Dieser Komplex ist unter den durchgeführten *in vitro*-Versuchsbedingungen irreversibel.

In der sich anschließenden LipA-Durchlauffraktion wurde jedoch eine, wenn auch nur geringe, Lipaseaktivität detektiert. Diese ist auf eine Komplexbildung der Lipase mit „frei“ vorliegendem LipH zurückzuführen. Zu „frei“ vorliegendem LipH kommt es auf Grund einer Überladung der Ni²⁺-NTA Magnetic Agarose Beads und eines nicht ausreichenden

Waschschrittes. Der Großteil der Lipaseaktivität wurde im Eluat detektiert. Durch die erhöhte Imidazolkonzentration von 250 mM im Elutionspuffer wurden die LipH-Varianten von den Ni²⁺-NTA Magnetic Agarose Beads verdrängt und der vorliegende LipAH-Komplex eluiert. Da der Hauptteil des LipAH-Komplexes somit im Eluat vorlag, war hier auch die höchste Lipaseaktivität zu erwarten.

In der Verteilung der Lipaseaktivität auf die einzelnen Fraktionen konnten keine wesentlichen Unterschiede ausgemacht werden. In dem vorangegangenen Renaturierungsversuch (2.21) lag die Foldase LipH bzw. die jeweilige LipH-Variante „frei“ im Rückfaltungspuffer vor. Dabei konnten Unterschiede in der Lipaseaktivität der einzelnen Renaturierungsansätze detektiert werden.

Um zu untersuchen, ob diese Aktivitätsunterschiede auch bei immobilisiertem LipH vorliegen, wurde die jeweilige prozentuale Gesamtaktivität bestimmt (siehe Abb. 3.16).

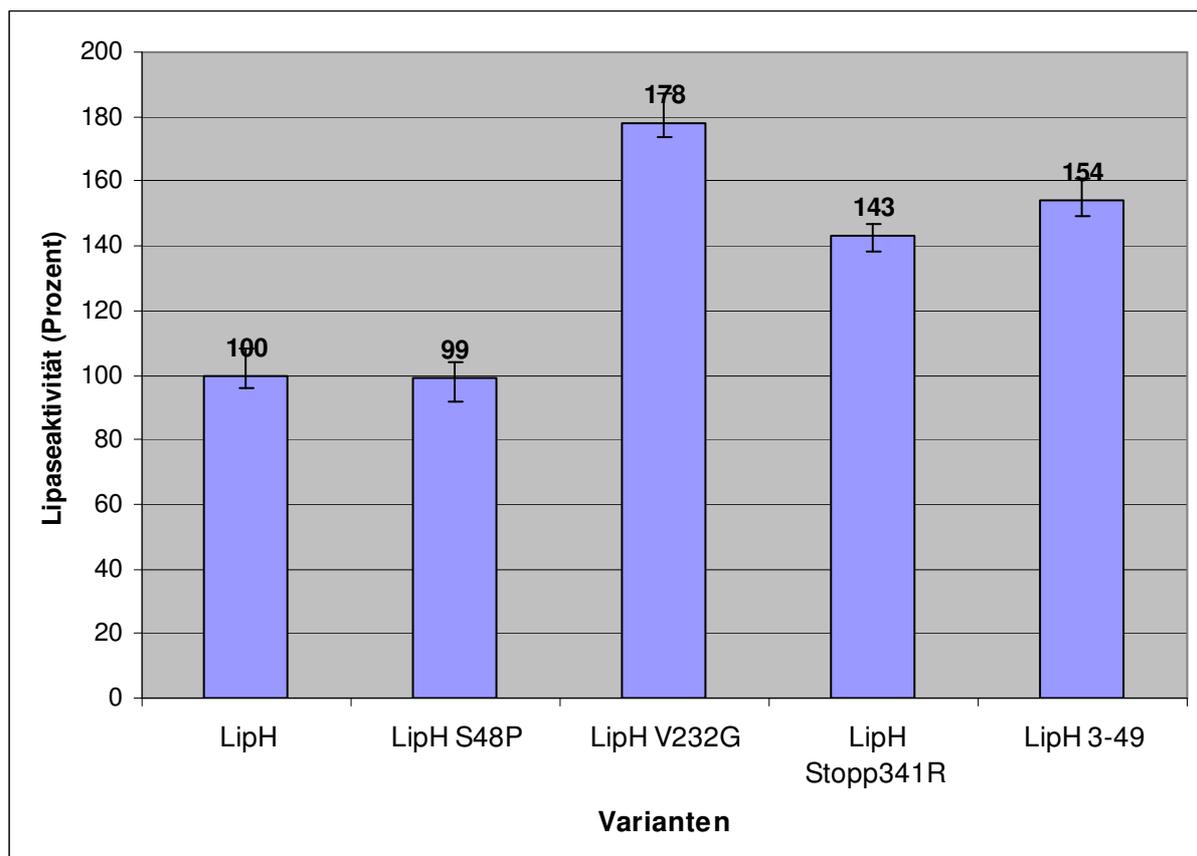


Abb. 3.16: Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase mit den LipH-Varianten im Interaktionsversuch. Um die Lipaseaktivität der verschiedenen Renaturierungsansätze vergleichen zu können, wurde die zuvor ermittelte Lipaseaktivität (Abb. 3.15) der einzelnen Fraktionen des LipH-Renaturierungsansatzes addiert und als 100 % der Aktivität angesetzt. Mit den anderen Renaturierungsansätzen wurde entsprechend verfahren und ihre addierte Aktivität in Verhältnis zur 100 %igen Aktivität des LipH-Renaturierungsansatzes gesetzt.

Wie in Abb. 3.16 ersichtlich, zeigt der Lipase-Renaturierungsansatz, der mit der immobilisierten LipH-Variante S48P inkubiert wurde, mit 99 % nahezu Lipaseaktivität im WT-Niveau. Dieses Ergebnis entspricht dem Ergebnis des Lipase-Renaturierungsansatzes, der mit der „freien“ LipH-Variante S48P inkubiert wurde (106 % Lipaseaktivität im Vergleich zum WT-Niveau). In *in vivo*-Versuchen wurde eine deutliche Reduzierung der Lipaseaktivität bei einer Aktivierung mit der LipH-Variante S48P festgestellt (8 % Lipaseaktivität im Vergleich zum WT-Niveau). Unter *in vitro*-Bedingungen konnte eine Verringerung der Lipaseaktivität nicht beobachtet werden. In den Immunodetektionen der *in vivo*-Versuche konnte immer nur eine sehr geringe Menge des LipH-Proteins detektiert werden, was für eine geringe Stabilität unter *in vivo*-Bedingungen spricht.

Eine Inkubation des Lipase-Renaturierungsansatzes mit der immobilisierten LipH-Variante V232G resultierte in einer Aktivitätssteigerung auf 178 %. Dieses Ergebnis weicht nur um einen Prozentpunkt von dem Ergebnis bei „frei“ vorliegendem LipH V232G ab: 177 % Lipaseaktivität im Vergleich zum WT-Niveau.

Eine Aktivitätssteigerung wurde ebenfalls durch eine Inkubation des Lipase-Renaturierungsansatzes mit der LipH-Variante Stopp341R erlangt. Die Lipaseaktivität lag hier bei 143 % im Vergleich zum WT-Niveau. Dies entspricht ebenfalls dem Ergebnis für „frei“ vorliegendes LipH Stopp341R: 127% Lipaseaktivität im Vergleich zum WT-Niveau.

Während diese Ergebnisse mit den *in vivo*-Versuchen im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) übereinstimmen, weichen sie von den *in vivo*-Versuchen im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 ab.

Im Fall der Variante V232G wurde die Lipaseaktivität bei zum WT vergleichbaren Proteinmengen auf 39 % des WT-Niveaus reduziert. Auch im Fall der Variante Stopp341R wurde die Lipaseaktivität reduziert, 35 % der WT-Aktivität, dies ist allerdings durch deutlich reduzierte Foldase- und Lipase-Proteinmengen begründet. Da es nur unter homologer Expression zu diesen Aktivitätsverlusten kam, scheinen wirtseigene Vorgänge dieses zu beeinflussen.

Wurde der Lipase-Renaturierungsansatz mit der immobilisierten ep-LipH-Variante 3-49, die aus den Einzelaustauschen V232G und Stopp341R resultiert, inkubiert, so wurde eine Lipaseaktivität von 154 % im Vergleich zum WT bestimmt. Dieses Ergebnis entspricht dem Ergebnis des Lipase-Renaturierungsansatzes, der mit der „freien“ LipH-Variante 3-49 inkubiert wurde (157 % Lipaseaktivität im Vergleich zum WT-Niveau), sowie den Ergebnissen der *in vivo*-Versuche.

Dieser „Bügel“ wird aus 23 AS, Nr. 228 bis 250, gebildet und hat direkten Kontakt zur Lipase LipA. Laut berechnetem Modell sowie der Strukturvorhersage wird diesem Bereich die Sekundärstruktur einer Helix vorhergesagt. Betrachtet man die AS-Sequenz genauer (Abb 3.17 B), fällt die AS Prolin auf. Das Vorkommen von Prolin in einer Helix ist eher untypisch; Prolin wird auch als „Helixbrecher“ bezeichnet. Aufgrund dieser speziellen Eigenschaft ist Prolin oft im „Turn“ einer Peptidkette zu finden. Denkbar wäre daher, dass die Spacer-Region zwei Zustandsformen annehmen kann. Besteht kein Kontakt zur Lipase, so bewirkt Prolin an der Position 234 einen „Turn“ des Peptidstrangs. Kommt es hingegen zur Interaktion mit der Lipase, so wird Prolin in die Helix eingefügt und drückt die Lipase durch diese Strukturänderung in die aktive Form. Jede Kristallstruktur stellt immer nur eine Momentaufnahme des Proteins dar. Dass es sich aber um ein dynamisches System handelt, darf dabei nicht außer Acht gelassen werden.

Über den Alaninscan war es jedoch schnell möglich, diesen Bereich auf Veränderungen bezüglich der Lipaseaktivität „abzuscannen“. Dazu wurden die vorhandenen Konstrukte der AS 228-250 im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) sowie im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 exprimiert.

Indikatoragarplatten

Das erste Screening fand, wie zuvor, bei heterologer Expression auf Tributyrinagar-Cm⁵⁰- bzw. bei homologer Expression auf Tributyrinagar-Cm³⁰⁰-Platten statt.

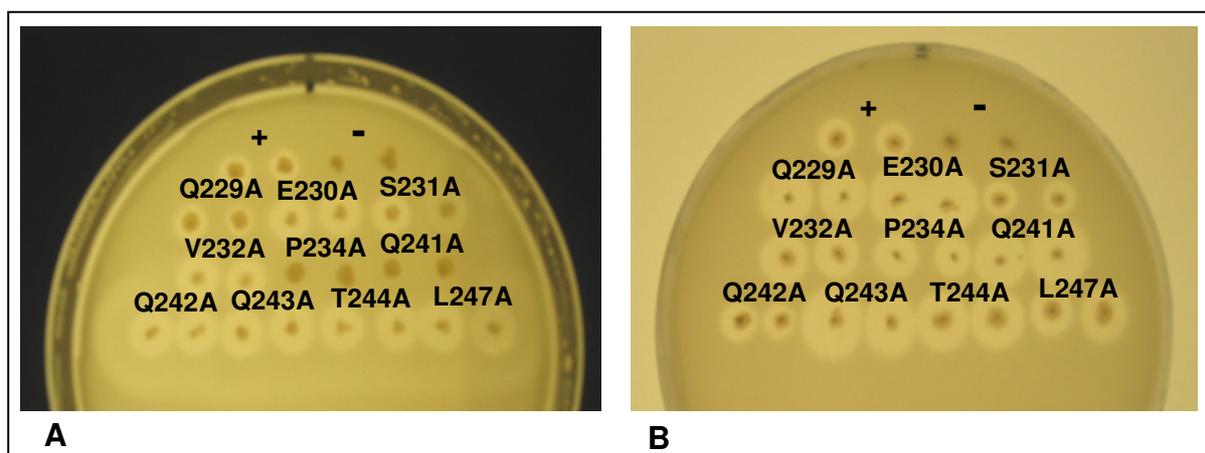


Abb. 3.18: Bestimmung der lipolytischen Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten der Spacer-Region auf Tributyrin-Agarplatten. Die Aktivität wird mittels Hofbildung detektiert und konnte im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) nach einer Inkubation bei 37° C üN und dreitägiger Inkubation bei 4 °C beobachtet werden (A). Im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 konnte die Hofbildung bereits nach einer Inkubation bei 37° C üN detektiert werden. Die Lipaseaktivität konnte über Kontrollen (+: Positiv-Kontrolle, -: Negativ-Kontrolle) ins Verhältnis gesetzt werden. Die Ergebnisse konnten in zwei unabhängigen Anzuchten verifiziert werden.

Abb 3.18 A zeigt, dass bei der heterologen Expression lediglich zwei AS-Austausche in der Spacer-Region zu einem Verlust der Lipaseaktivität führen, LipH-AS-Position 234 und 241. Die restlichen AS-Austausche bewirken eine Lipaseaktivität im WT-Niveau. Im Gegensatz dazu zeigen alle Varianten bei homologer Expression (Abb. 3.18 B) weiterhin Lipaseaktivität, wenn auch in ganz unterschiedlichem Ausmaß.

Spektrophotometrische Bestimmung der Lipaseaktivität

Um eine detailliertere Aussage über die Lipaseaktivität bei homologer Expression der Varianten zu erhalten, wurde diese zusätzlich spektrophotometrisch bestimmt.

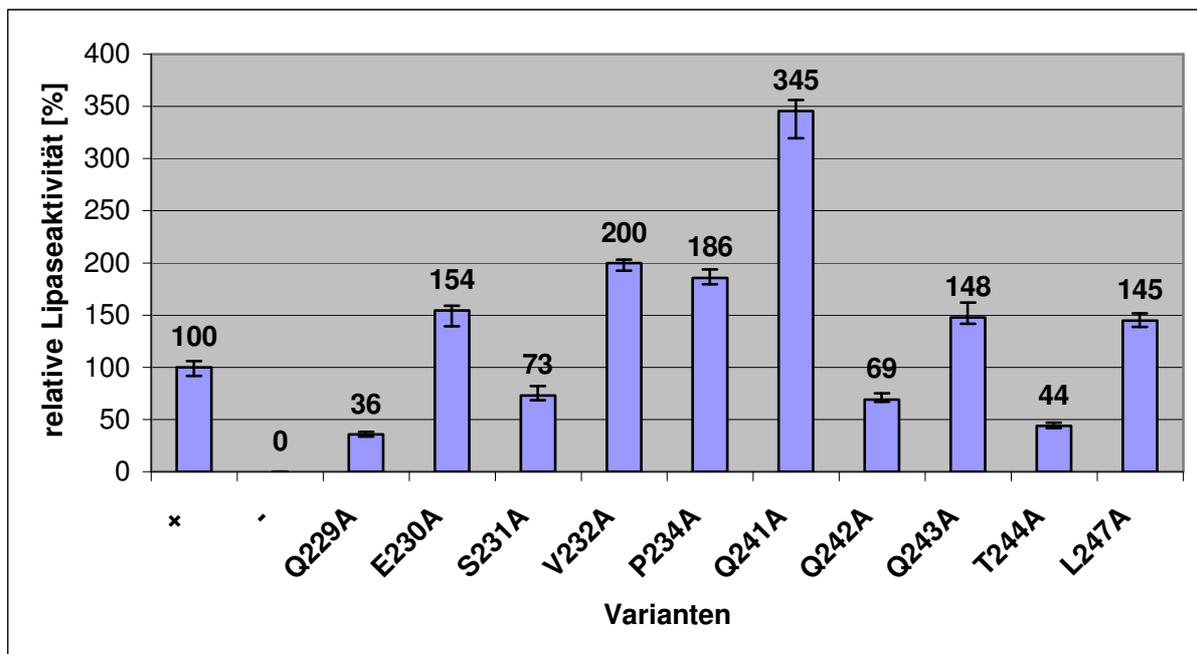


Abb. 3.19: Lipolytische Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten der Spacer-Region im homologen Wirt. Die Lipaseaktivität im Kulturüberstand wurde mit *pNPP* als Substrat bestimmt. Dargestellt ist die relative Lipaseaktivität im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit den Plasmiden zur Expression der ortsspezifischen LipH-Varianten im Operon mit der WT-Lipase nach 16 Wuchs. Die Werte von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit *pBBR1MCS//lipAH* (WT-Operon) wurden gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Wie bereits über die Indikatorplatte ermittelt, zeigen alle Varianten Lipaseaktivität. Diese schwankt bei den einzelnen Varianten allerdings zwischen 36 % und 345 % im Verhältnis zum WT-Niveau.

Immunologischer Nachweis des Chaperons LipH und der Lipase LipA

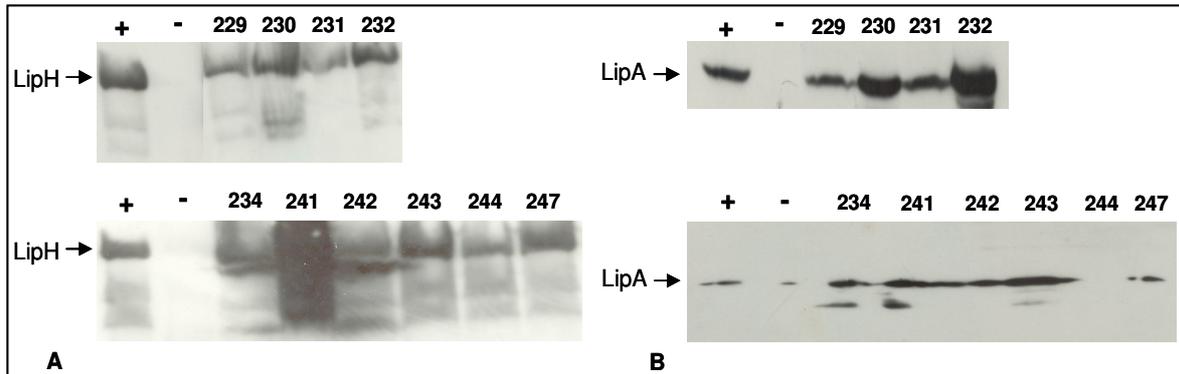


Abb. 3.20: Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei homologer Expression der ortsspezifischen LipH-Mutanten der Spacer-Region. Die Bakterien wurden für 16 h bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. +: Positivkontrolle *P.aeruginosa* PABST7.1/pBBRPA-*lipAH*, -:Negativ-Kontrolle *P.aeruginosa* PABST7.1/pBBR1MCS) **A:** Immunodetektion der Foldase LipH. Die auf das Gel aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580nm}= 0,15). Der Nachweis erfolgte mit einem LipH-spezifischen Antiserum. **B:** Immunodetektion der Lipase LipA im Kulturüberstand. Die Kulturvolumen, die einer O.D._{580nm}= 0,3 entsprachen, wurden mit TCA gefällt. Der Nachweis der Lipase erfolgte mit einem Lipase-spezifischen Antiserum.

Zeigte die bereits untersuchte AS-Position 232 bei einem Austausch von Valin zu Glycin noch eine reduzierte Lipaseaktivität, so wurde die Lipaseaktivität im Vergleich zum WT durch den Austausch zu Alanin auf 200 % gesteigert. Auf den ersten Blick unterscheiden sich Glycin und Alanin nicht sonderlich. Allerdings gibt es für jede AS eine Wahrscheinlichkeit, mit der sie generell in einer Helix vertreten ist, das sogenannte Helixpotential P_{α} . Liegt das Potential deutlich über 1, spricht man von „Helixbildnern“ und von „Helixbrechern“, wenn es deutlich kleiner ist (Schiffer & Edmundson, 1967; Chou & Fasman, 1978; Cohen & Parry, 1986; Kamtekar *et al.*, 1993). Die Position 232 ist mit der AS Valin besetzt. Diese ist mit einem $P_{\alpha} = 1,14$ mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in einer Helix zu finden. Durch den Austausch zu Glycin reduzierte sich die Lipaseaktivität. Mit $P_{\alpha} = 0,53$ kommt Glycin eher nicht in einer Helix vor. Durch den Austausch zu Alanin erhöhte sich die Lipaseaktivität. Diese AS kommt mit einem $P_{\alpha} = 1,45$ mit einer deutlich höheren Wahrscheinlichkeit in einer Helix vor als Glycin, aber auch als Valin, was die Aktivitätssteigerung aufgrund der verbesserten Helix-eigenschaften erklären könnte. Im Rahmen der Immunodetektion konnte für die Variante V232A eine vergleichbare Menge an LipH-Protein detektiert werden, allerdings eine deutlich erhöhte Lipase-Menge, was die Aktivitätssteigerung durch einen quantitativen Anstieg der Lipase im Kulturüberstand erklärt.

Sehr interessant sind die LipH-Varianten P234A und Q241A. Sie wiesen bei heterologer Expression keine Lipaseaktivität auf, unter homologen Expressionsbedingungen dagegen eine auf 186 % bzw. 345 % erhöhte Lipaseaktivität im Vergleich zum WT.

Im Sequenzvergleich erkennt man, dass die AS-Position 234 in den vier Familien nicht konserviert ist. Allerdings ist diese Position in der Familie I, zu der auch die *P. aeruginosa*-Foldase gehört, in vier von fünf Fällen mit Prolin besetzt. Durch den Austausch zu Alanin wird diese Position zwar wieder mit einer ungeladenen, unpolaren AS besetzt, allerdings weist diese – wie bereits beschrieben - völlig andere Eigenschaften auf. Die durch Prolin bewirkte Proteinstruktur in diesem Bereich wird durch Alanin nicht aufrechterhalten.

Ob das berechnete Modell in diesem Bereich mit der tatsächlichen Konformation übereinstimmt, ist allerdings fraglich. Das Modell basiert auf der LipAH-Komplex-Struktur aus *B. glumae*. In der Foldase aus *B. glumae* ist diese Position allerdings nicht mit Prolin besetzt, sondern mit Leucin. Durch die besondere Struktur des Prolins ist eine Abweichung zum berechneten Modell wahrscheinlich. Durch den Austausch zur Alanin ist eine Lipaseaktivität bei heterologer Expression nicht mehr nachweisbar, die homologe Expression bewirkt allerdings eine Erhöhung auf 186 % des WT-Niveaus. Dieser Anstieg kann durch eine erhöhte Lipase-Menge im Überstand erklärt werden, jedoch bei einer vergleichbaren Foldase-Menge im Verhältnis zum WT-Niveau (Abb.3.20). Die für diesen Bereich vorhergesagte Helixstruktur wird durch den Austausch zu Alanin wahrscheinlicher. Einen positiven Effekt auf die Lipaseaktivität hat dies allerdings nur im homologen und nicht im heterologen Wirt, in dem eine Lipaseaktivierung nicht mehr möglich ist.

Ein Austausch der Position 241 der Foldase von Glutamin zu Alanin bewirkt bei heterologer Expression eine nicht mehr nachweisbare Lipaseaktivität, bei homologer Expression allerdings eine starke Erhöhung auf 345 %. Diese kann durch einen starken Anstieg der Foldase- sowie der Lipase-Menge erklärt werden (Abb. 3.20). Die Position 241 ist nicht konserviert, allerdings ist in dieser Region Glutamin häufig und mehrfach vertreten. Glutamin liegt laut Modell in direkter Nähe zur Lipase. Eine Wechselwirkung mit AS aus der Lipase ist daher denkbar.

3.5.1 Sättigungsmutagenese der AS-Position 234

Um neben dem Austausch der Position 234 zu Alanin auch den Einfluß anderer AS zu untersuchen, wurde an dieser Position eine Sättigungsmutagenese durchgeführt. Dabei sollte

erneut die PCR-Methode von Baretino *et al.* (1994) zur Anwendung kommen, deren Anwendung und Durchführung bereits bei der Erstellung von ortsspezifischen Mutationen in das *lipH*-Gen (3.1.2) besprochen wurden.

Im Rahmen dieser Sättigungsmutagenese sollten an Position 234 der Foldase alle 18 anderen möglichen AS eingeführt werden. Es konnten 14 der 18 verbleibenden AS-Austausche an dieser Position eingebracht und kloniert werden. Die Austausche zu Arginin, Aspartat, Glycin und Isoleucin konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht erstellt werden. Die Analyse der Austausche erfolgte jeweils unter heterologen Expressionsbedingungen im Wirt *E. coli* BL21(DE3) sowie unter homologen Expressionbedingungen im Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1.

Indikatoragarplatten

Das erste Screening fand, wie zuvor, bei heterologer Expression auf Tributyrinagar-Cm⁵⁰- bzw. bei homologer Expression auf Tributyrinagar-Cm³⁰⁰-Platten statt.

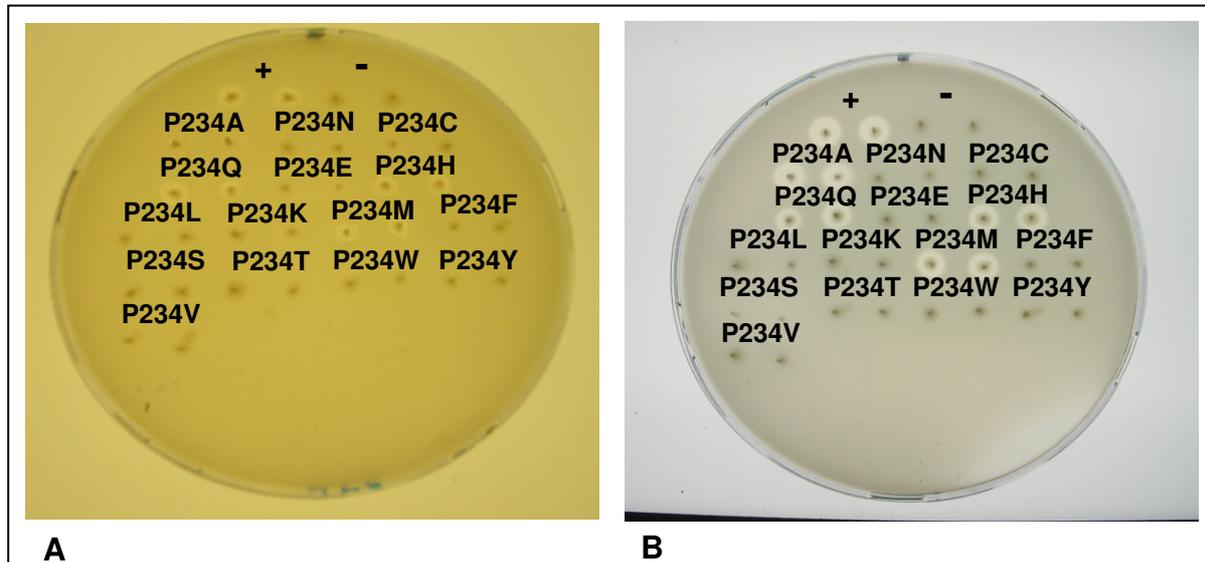


Abb. 3.21: Bestimmung der lipolytischen Aktivität der Sättigungsmutagenese-P234-LipH-Mutanten auf Tributyrin-Agarplatten. Die Aktivität wird mittels Hofbildung um die Kolonie herum detektiert und konnte im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) nach einer Inkubation bei 37° C üN und anschließender drei-tägiger Inkubation bei 4 °C über die klare Hofbildung um die Kolonien beobachtet werden (A). Im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 konnte die Hofbildung bereits nach einer Inkubation bei 37° C üN detektiert werden. Die Lipaseaktivität konnte über Kontrollen (+: Positiv-Kontrolle, -:Negativ-Kontrolle) ins Verhältnis gesetzt werden. Die Ergebnisse konnten in zwei unabhängigen Anzuchten verifiziert werden.

In Abb. 3.21 ist gut zu erkennen, dass die meisten AS-Austausche an Position 234 einen Verlust der Lipaseaktivierung bewirken. Lediglich drei AS-Austausche erlauben weiterhin die

Aktivierung der Lipase LipA. Dieses sind Glutamin (Q), Histidin (H) und Methionin (M). Das bereits zuvor erhaltene Ergebnis des AS-Austausches Alanin wurde bestätigt. Im Gegensatz zu Alanin erlauben die anderen drei AS eine Aktivierung der Lipase bei heterologer sowie bei homologer Expression. Alle vier AS haben einen $P_{\alpha} > 1$ und kommen daher mit großer Wahrscheinlichkeit in einer Helix vor.

Spektrophotometrische Bestimmung der Lipaseaktivität

Um eine genauere Aussage über die Lipaseaktivität bei homologer Expression der Varianten zu erhalten, wurde diese wiederum spektrophotometrisch bestimmt. Da nur die bereits über die Indikatorplatte identifizierten Varianten eine Lipaseaktivität aufwiesen, wurde auf die Darstellung der übrigen Varianten verzichtet.

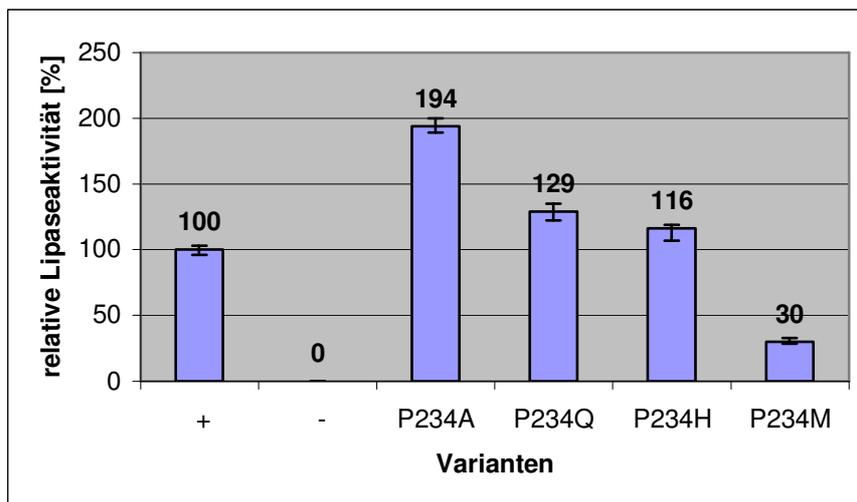


Abb. 3.22: Lipolytische Aktivität der Sättigungsmutagenese-P234-LipH-Mutanten der Spacer-Region im homologen Wirt. Die Lipaseaktivität im Kulturüberstand wurde mit *pNPP* als Substrat bestimmt. Dargestellt ist die relative Lipaseaktivität im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit den Plasmiden zur Expression der ortsspezifischen LipH-Varianten im Operon mit der WT-Lipase nach 16 Wuchs. Die Werte von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit *pBBR1MCS/lipAH* (WT-Operon) wurden gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Die meisten LipH-Varianten der Sättigungsmutagenese an Position 234 sind nicht mehr in der Lage, die Lipase LipA zu aktivieren. Allerdings gibt es drei LipH-Varianten, die eine Erhöhung der Lipaseaktivität bewirken. Dieses sind die Varianten mit den Austauschen von Prolin zu Alanin, Glutamin oder Histidin. Nach dem Austausch zu Methionin ist diese LipH-Variante zwar in der Lage, Lipase zu aktivieren, jedoch nur mit 30 % des WT-Niveaus.

Im Rahmen der immunologischen Detektion konnte in allen Sättigungsmutagenese-Varianten der Position 234 die Foldase LipH in etwa gleichen Verhältnissen nachgewiesen werden.

Die Lipase LipA konnte nur in den Protein-präzipitierten Kulturüberständen der LipH-Varianten P234A, P234Q, P234H und P234M nachgewiesen werden (ohne Abb.).

3.5.2 Sättigungsmutagenese der AS-Position 241

Um neben dem Austausch der Position 241 zu Alanin auch den Einfluß anderer AS zu untersuchen, wurde an dieser Position ebenfalls eine Sättigungsmutagenese durchgeführt.

Es konnten 14 der 18 verbleibenden AS-Austausche an dieser Position eingebracht und kloniert werden. Die Austausche zu Cystein, Glycin, Lysin und Tyrosin konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht erstellt werden. Die Analyse der Austausche erfolgte jeweils unter heterologen Expressionsbedingungen im Wirt *E. coli* BL21(DE3) sowie unter homologen Expressionbedingungen im Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1.

Indikatoragarplatten

Wie zuvor erfolgte das erste Screening bei heterologer Expression auf Tributyrinagar-Cm⁵⁰ bzw. bei homologer Expression auf Tributyrinagar-Cm³⁰⁰-Platten.

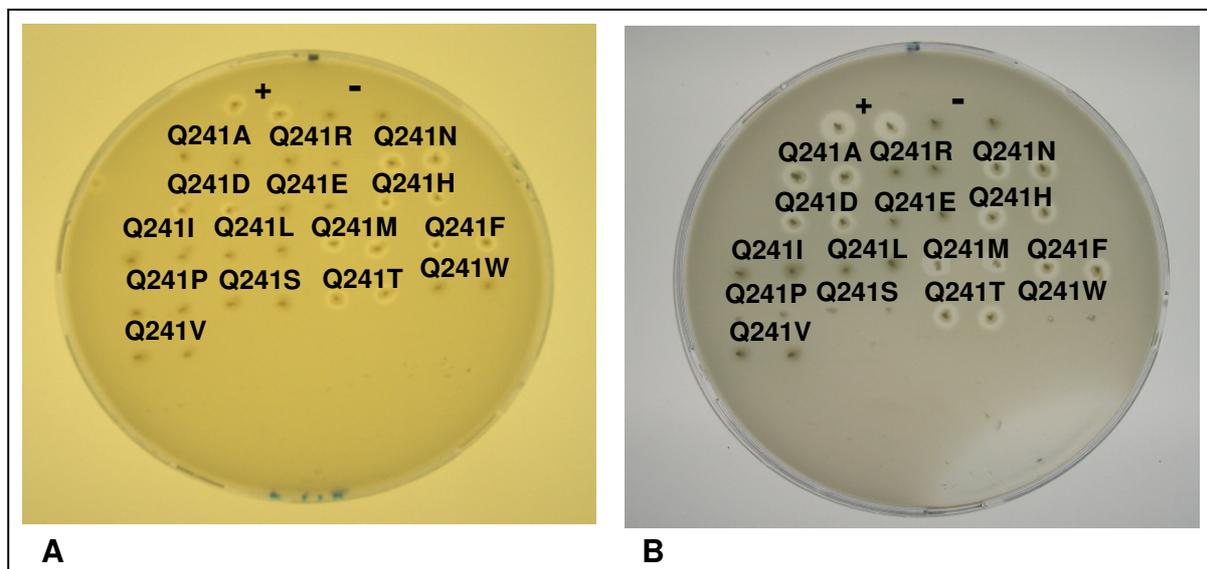


Abb. 3.23: Bestimmung der lipolytischen Aktivität der Sättigungsmutagenese-Q241-LipH-Mutanten auf Tributyrin-Agarplatten. Die Aktivität wird mittels Hofbildung um die Kolonie herum detektiert und konnte im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) nach einer Inkubation bei 37° C üN und anschließender drei-tägiger Inkubation bei 4 °C über die klare Hofbildung um die Kolonien beobachtet werden (A). Im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 konnte die Hofbildung bereits nach einer Inkubation bei 37° C üN detektiert werden. Die Lipaseaktivität konnte über Kontrollen (+: Positiv-Kontrolle, -:Negativ-Kontrolle) ins Verhältnis gesetzt werden. Die Ergebnisse konnten in zwei unabhängigen Anzuchten verifiziert werden.

In Abb 3.23 ist gut zu erkennen, dass die meisten AS-Austausche an Position 241 einen Verlust der Lipaseaktivierung bewirken. Lediglich 6 AS-Austausche erlauben weiterhin die Aktivierung der Lipase LipA. Diese sind Asparagin (N), Aspartat (D), Histidin (H), Methionin (M), Phenylalanin (F) und Threonin (T). Das bereits zuvor erhaltene Ergebnis des AS-Austausches Alanin wurde bestätigt. Im Gegensatz zu Alanin erlauben die anderen sechs AS eine Aktivierung der Lipase bei heterologer sowie bei homologer Expression.

Spektrophotometrische Bestimmung der Lipaseaktivität

Auch hier wurde zusätzlich eine spektrophotometrische Bestimmung vorgenommen, um eine detaillierte Aussage über die Lipaseaktivität bei homologer Expression der Varianten zu erhalten. Da nur die bereits über die Indikatorplatte identifizierten Varianten eine Lipaseaktivität aufwiesen, wurde auf die Darstellung der übrigen Varianten verzichtet.

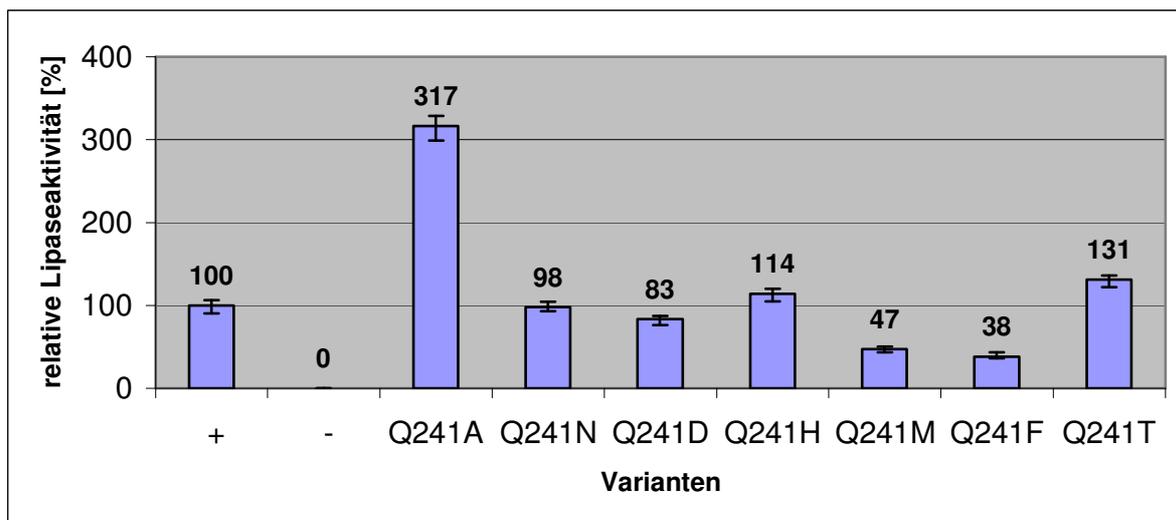


Abb. 3.24: Lipolytische Aktivität der Sättigungsmutagenese-Q241-LipH-Mutanten der Spacer-Region im homologen Wirt. Die Lipaseaktivität im Kulturüberstand wurde mit *pNPP* als Substrat bestimmt. Dargestellt ist die relative Lipaseaktivität im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit den Plasmiden zur Expression der ortsspezifischen LipH-Varianten im Operon mit der WT-Lipase nach 16 Wuchs. Die Werte von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit pBBR1MCS/*lipAH* (WT-Operon) wurden gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

In Abb. 3.24 ist gut zu erkennen, dass die Lipaseaktivitäten der Ansätze deutlich variieren. Zeigen die Kulturüberstände der Varianten PABST7.1/pBBR1MCS/PA *lipA lipH* Q241N, Q241D und Q241H mit Lipaseaktivitäten zwischen 83 % und 114 % nahezu WT-Niveau, so zeigen andere Ansätze eine deutlich reduzierte bzw. gesteigerte Lipaseaktivität. Eine deutlich

erhöhte Lipaseaktivität zeigt die Variante PABST7.1/pBBR1MCS/PA *lipA lipH* Q241A mit 317 % im Vergleich zur Positiv-Kontrolle. Eine ebenfalls, jedoch deutlich geringere, Erhöhung der Lipaseaktivität zeigt die Variante PABST7.1/pBBR1MCS/PA *lipA lipH* Q241T mit 131 %. Im Gegensatz dazu wiesen die Varianten PABST7.1/pBBR1MCS/PA *lipA lipH* Q241M und Q241F mit Lipaseaktivitäten von 47 % bzw. 38 % eine deutlich verringerte Lipaseaktivität auf. Im Rahmen der immunologischen Detektion konnte in allen Sättigungsmutagenese-Varianten der Position 234 die Foldase LipH in etwa gleichen Verhältnissen nachgewiesen werden. Die Lipase LipA konnte nur in den Protein-präzipitierten Kulturüberständen der LipH-Varianten Q241A, Q241N, Q241D, Q241H, Q241M, Q241F und Q241T nachgewiesen werden (ohne Abb.).

3.6 Screening der N-terminalen AS 22-69

Der Austausch einzelner AS hatte in den untersuchten Varianten oftmals einen gravierenden Einfluss auf die Lipaseaktivität. Der zuvor untersuchte Bereich der Spacer-Region (AS 228-250) wurde aufgrund des Austausches V232G genauer untersucht. Im Folgenden wurde der Bereich um die AS-Position 48 analysiert. Wie im Rahmen des Screenings der ep-LipH-Bank gezeigt werden konnte, haben AS-Austausche im N-terminalen Bereich des LipH einen Einfluss auf die LipH-Funktion. Der Austausch von Serin an Position 48 des LipH-Proteins zu Prolin bewirkte sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression eine drastische Reduzierung der Lipaseaktivität. Anhand der erstellten Mutagenesebank wurde untersucht, ob auch andere AS-Austausche im N-terminalen Bereich des Foldaseproteins einen Einfluss auf die Lipase-Aktivierung haben.

Durch das Zugreifen auf die vorhandenen Konstrukte des Alaninscans war dieses schnell möglich. Dazu wurden die vorhandenen Konstrukte der AS 22-69 im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) sowie im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 exprimiert.

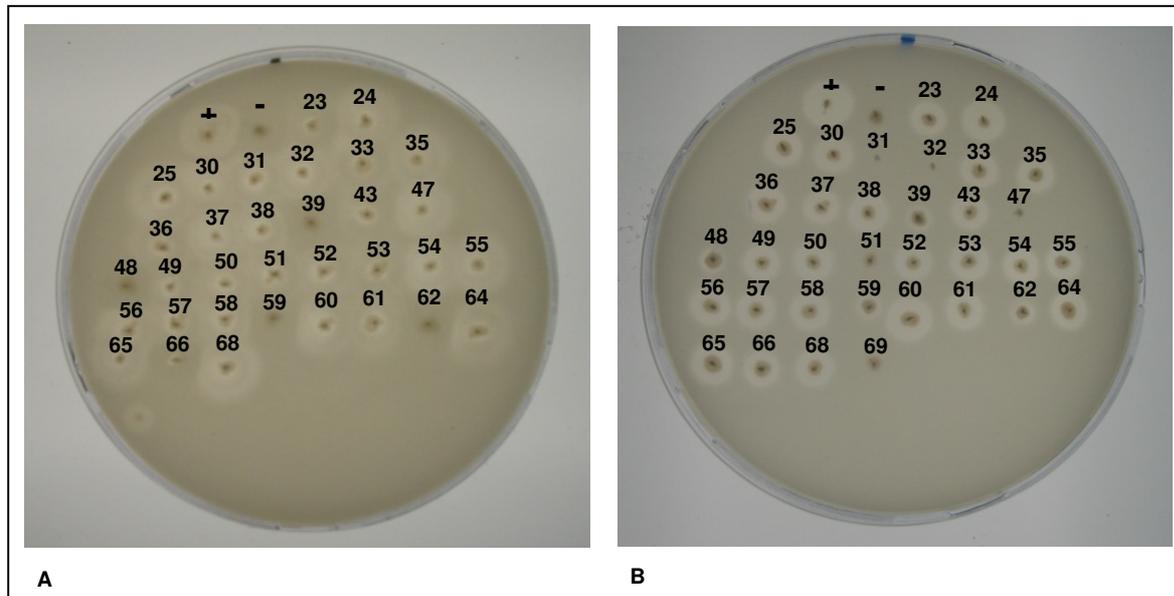
Indikatoragarplatten

Abb. 3.25: Bestimmung der lipolytischen Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten des N-Terminus auf Tributyrin-Agarplatten. Die Aktivität wird mittels Hofbildung um die Kolonie herum detektiert und konnte im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) nach einer Inkubation bei 37° C üN und anschließender drei-tägiger Inkubation bei 4 °C über die klare Hofbildung um die Kolonien beobachtet werden (A). Im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 konnte die Hofbildung bereits nach einer Inkubation bei 37° C üN detektiert werden. Die Lipaseaktivität konnte über Kontrollen (+: Positiv-Kontrolle, -:Negativ-Kontrolle) ins Verhältnis gesetzt werden. Die Ergebnisse konnten in zwei unabhängigen Anzuchten verifiziert werden.

Wie anhand der Hofbildung erkennbar ist, bleibt das LipH-Protein in den meisten Fällen funktionell aktiv. Nur in wenigen Fällen ist eine drastische Reduzierung der Lipaseaktivität sichtbar.

Spektrophotometrische Bestimmung der Lipaseaktivität

Die Lipaseaktivität bei homologer Expression aller ortsspezifischen LipH-Mutanten wurde zusätzlich spektrophotometrisch bestimmt.

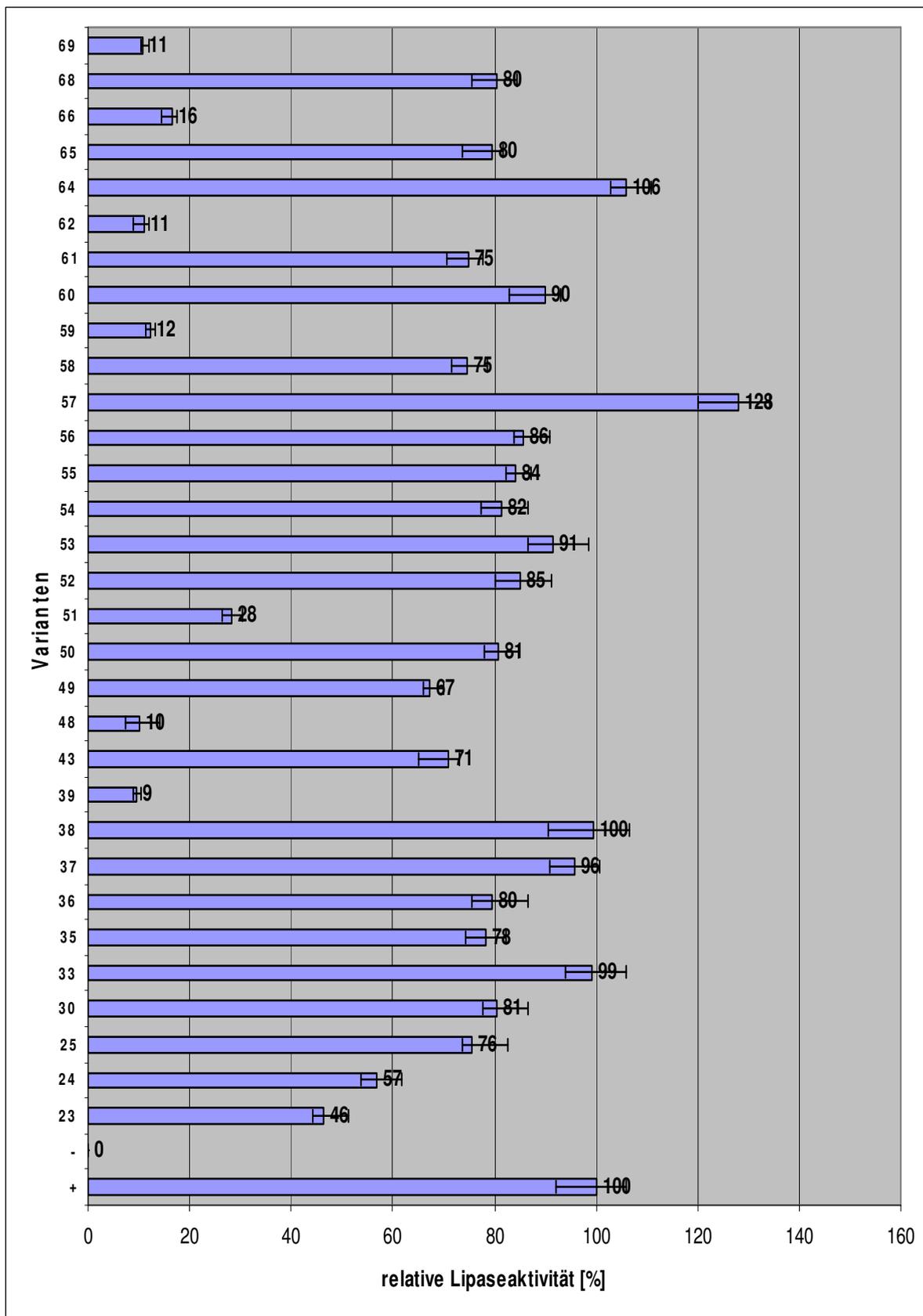


Abb. 3.26: Lipolytische Aktivität der ortsspezifischen LipH-Mutanten des N-Terminus. Die Lipaseaktivität im Kulturüberstand wurde mit pNPP als Substrat bestimmt. Dargestellt ist die relative Lipaseaktivität im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit den Plasmiden zur Expression der ortsspezifischen LipH-Varianten im Operon mit der WT-Lipase nach 16 Wuchs. Die Werte von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit pBBR1MCS/lipAH (WT-Operon) wurden gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Die Lipaseaktivität der meisten Austauschvarianten liegt zwischen 80 % und 106 % der WT-Aktivität (Abb. 3.26). Nur wenige LipH-Varianten zeigen eine stark reduzierte Lipaseaktivität. Dazu zählen die Varianten mit den AS-Austauschen G39A, S48A, E51A, M59A, K62A, L66A und S69A. Lediglich zwei der sieben Positionen sind konserviert, dies sind die Positionen 66 und 69.

Immunologischer Nachweis des Chaperons LipH und der Lipase LipA

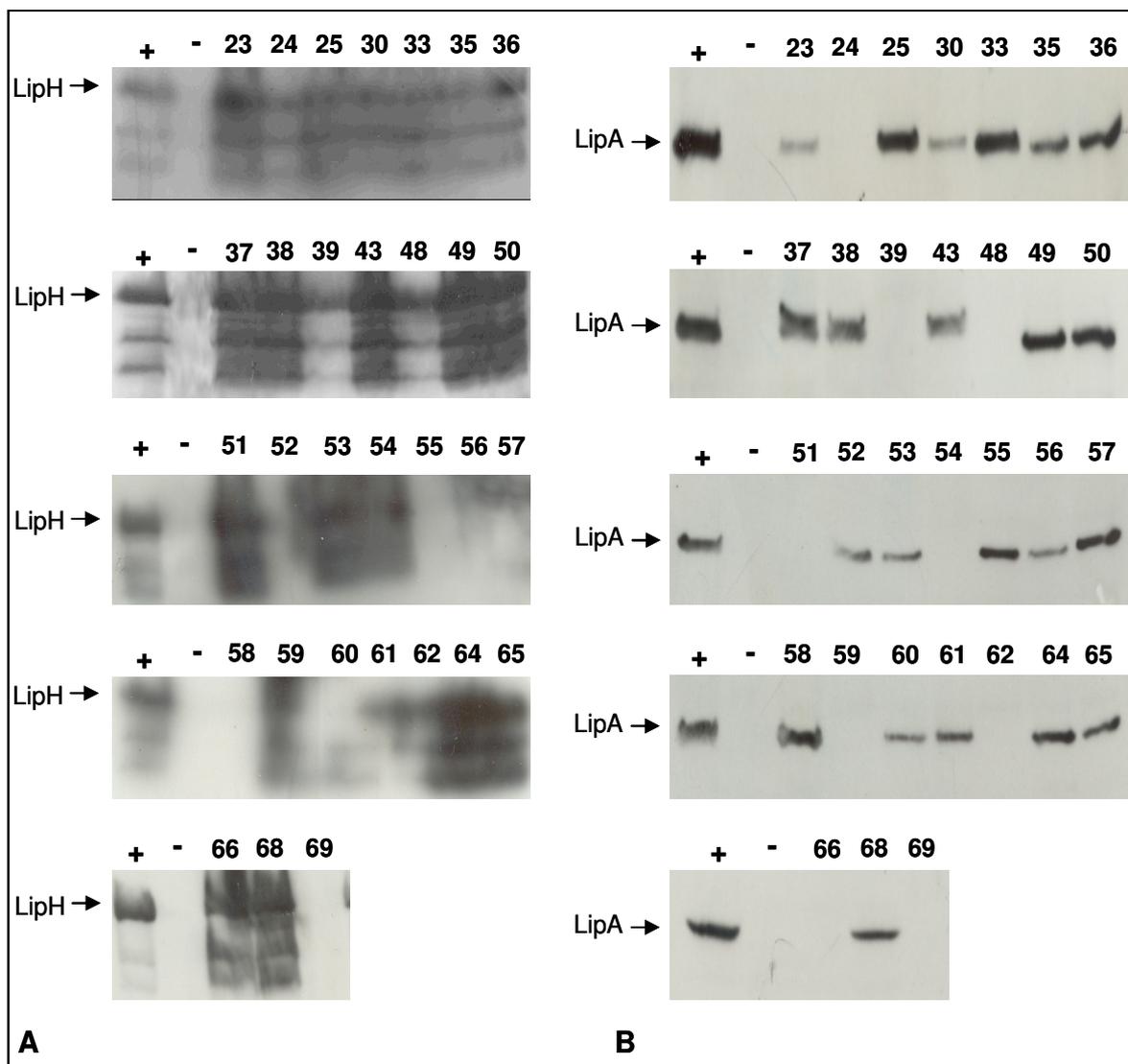


Abb. 3.27: Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei homologer Expression der ortsspezifischen LipH-Mutanten des N-Terminus. Die Bakterien wurden für 16 h bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. +: Positivkontrolle *P.aeruginosa* PABST7.1/pBBRPA-*lipAH*, -:Negativ-Kontrolle *P.aeruginosa* PABST7.1/pBBR1MCS) **A:** Immunodetektion der Foldase LipH. Die auf das Gel aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D_{580nm} = 0,15$). Der Nachweis erfolgte mit einem LipH-spezifischen Antiserum. **B:** Immunodetektion der Lipase LipA im Kulturüberstand. Die Kulturvolumen, die einer $O.D_{580nm} = 0,3$ entsprachen, wurden mit TCA gefällt. Der Nachweis der Lipase erfolgte mit einem Lipase-spezifischen Antiserum.

Bei Betrachtung der Immunodetektion der Varianten mit einer deutlich reduzierten Lipaseaktivität bei homologer Expression (G39A, S48A, E51A, M59A, K62A, L66A und S69A) lässt sich feststellen, dass trotz exprimierter Foldase keine Lipase detektiert werden konnte, was die drastische Reduzierung der Lipaseaktivität erklärt. Eine Ausnahme stellt die LipH-Variante S69A dar, hier konnte die Foldase immunologisch nicht nachgewiesen werden.

Erneut konnten Positionen im N-terminalen Drittel des LipH-Proteins identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Lipaseaktivität haben. Werden diese Positionen gegen Alanin ausgetauscht, so wird die Sekretion der Lipase in das Medium unterbunden und führt dadurch zu einer drastisch verringerten Lipaseaktivität.

3.7 *In vitro*-Experimente mit ausgewählten LipH-Varianten des N-Terminus

Die weitere Analyse beschränkt sich auf die AS-Austausche im LipH, die sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression der LipH-Variante eine drastische Reduzierung der Lipaseaktivität bewirken. Dazu gehören die Positionen 39, 48, 51, 59, 62 und 69.

Für eine detaillierte Analyse dieser Positionen wurden diese Varianten überexprimiert und aufgereinigt. Dazu mussten die LipH-Varianten in den His-Tag-Vektor pET19b umklont werden. Dieses geschah, wie bereits unter 3.4.2 beschrieben, mittels der Amplifizierung der jeweiligen LipH-Variante durch die Primer „Ht Up“ und „Ht Down“ und anschließender Ligation des restringierten PCR-Produkts in den über *NdeI* und *BamHI* verdauten Vektor pET19b. Nach heterologer Überexpression wurden die Varianten über den His-Tag durch eine IMAC (2.22) aufgereinigt. Sowohl der Erfolg der Überexpression als auch der Aufreinigung wurde über eine SDS-PAGE analysiert (ohne Abb.).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten lediglich die LipH-Varianten 39 und 51 erfolgreich überexprimiert und aufgereinigt werden. Die Überexpression und Aufreinigung der übrigen vier Varianten war nicht erfolgreich, da entweder die Überexpression eine zu geringe Ausbeute hervorbrachte oder der Verlust während der Aufreinigung zu hoch war.

Eine anschließende Proteinquantifizierung über ein BCA-Assay gab Aufschluss über die gewonnene Menge Protein.

His-Protein	Konzentration µg/ml
His-LipH G39A	350
His-LipH E51A	666

Tab. 3.4: Übersicht der Proteinkonzentrationen der aufgereinigten LipH-Varianten G39A und E51A

3.7.1 *In vitro*-Renaturierung der *P. aeruginosa*-Lipase LipA

Um Unterschiede der aufgereinigten LipH-Varianten in der *in vitro*-Renaturierung der Lipase LipA aus *P. aeruginosa* zu analysieren, wurden äquimolare Mengen Lipase und Foldase wie unter 2.21 beschrieben in Rückfaltungsexperimenten eingesetzt.

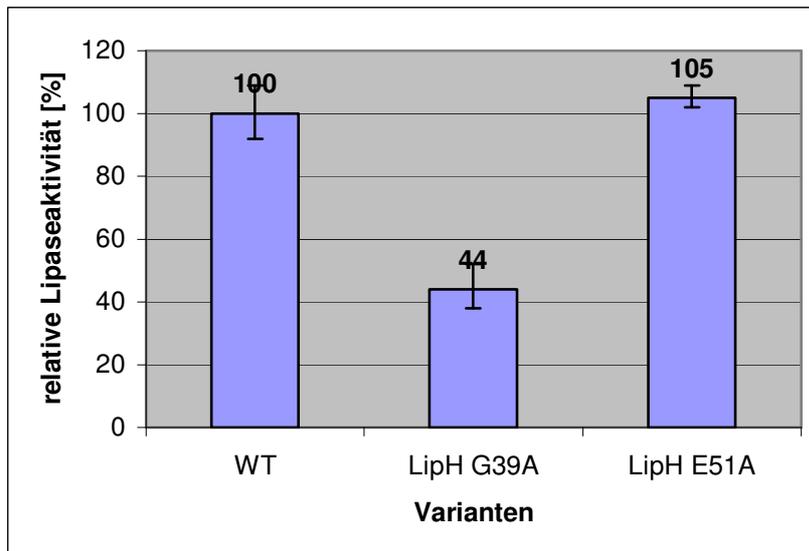


Abb. 3.28: Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase durch die LipH-Varianten G39A und E51A. Die Lipaseaktivität wurde nach Winkler & Stuckmann (1979) analysiert. Als Proben-volumen dienten 20 µl des jeweiligen Renaturierungsansatzes. Die Lipaseaktivität des LipH-Renaturierungsansatzes wurde als 100 % Aktivität angesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Der Renaturierungsansatz mit der LipH-Variante E51A zeigt im *in vitro*-Versuch mit 105 % nahezu WT-Lipaseaktivität. Die fehlende Aktivität im *in vivo*-Versuch könnte auf die fehlende Sekretion der aktiven Lipase unter homologen Expressionsbedingungen zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zur LipH-Variante E51A zeigt die Variante G39A auch im *in vitro*-Versuch eine deutlich reduzierte Lipaseaktivität. Wurde LipA im Renaturierungsansatz mit der LipH-Variante G39A inkubiert, wies dieser Ansatz eine auf 44 % verringerte Lipaseaktivität im Vergleich zum WT-Niveau auf.

3.7.2 Interaktionsversuche zwischen der Lipase LipA und den aufgereinigten LipH-Varianten

An die Renaturierungsexperimente schlossen sich Interaktionsexperimente zwischen der Lipase LipA und den aufgereinigten LipH-Varianten G39A und E51A an.

Um die Interaktion und deren Unterschiede zwischen dem LipA-Protein und den LipH-Varianten zu untersuchen, wurden die LipH-Varianten auch hier mittels Ni^{2+} -NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Hilden) immobilisiert. Die Interaktion wurde über entnommene Aliquots während des Experiments kontrolliert, welche mittels einer SDS-PAGE (2.18) analysieren wurden (ohne Abb.).

Da sich die Bandenmuster der LipH-Varianten im Interaktionsversuch nicht von den zuvor durchgeführten Interaktionsversuchen unterschieden, wurde auf eine erneute Abbildung verzichtet (siehe Abb. 3.14).

Erneut wurde mit den aufgefangenen Durchlauf- und Waschfraktionen sowie mit dem Eluat ein Lipaseaktivitätstest durchgeführt, um so eine Aussage über die Verteilung der Lipaseaktivität treffen zu können. Dazu wurde die Lipaseaktivität mit jeweils 10 μl der jeweiligen Fraktion nach der Methode von Winkler & Stuckmann (1979) bestimmt.

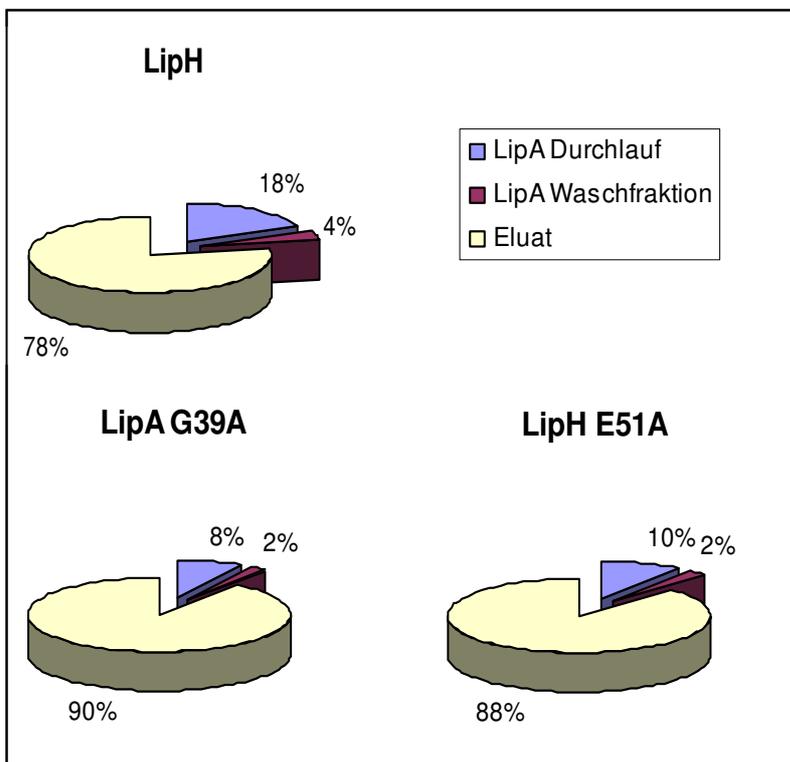


Abb. 3.29: Verteilung der Lipaseaktivität auf die einzelnen Fraktionen der LipH-Varianten G39A und E51A. Die Lipaseaktivität wurde nach Winkler & Stuckmann (1979) mit 10 μl der jeweiligen Fraktion bestimmt. Um die Lipaseaktivität der einzelnen Fraktionen besser vergleichen zu können, wurde die Lipaseaktivität aller Fraktionen des jeweiligen Renaturierungsansatzes addiert. Dieser Wert entsprach 100 % der Aktivität. Die Aktivität der jeweiligen Fraktion wurde dazu ins Verhältnis gesetzt. Auf die Darstellung der jeweiligen LipH-Durchlauf- und -Waschfraktion wurde verzichtet, da hier keine Lipaseaktivität detektiert wurde.

In der Verteilung der Lipaseaktivität auf die einzelnen Fraktionen konnten keine wesentlichen Abweichungen ausgemacht werden. In dem vorangegangenen Renaturierungsversuch (2.21) lag die Foldase LipH bzw. die jeweilige LipH-Variante „frei“ im Rückfaltungspuffer vor. Dabei konnten Unterschiede in der Lipaseaktivität der einzelnen Renaturierungsansätze detektiert werden. Um zu untersuchen, ob diese Aktivitätsunterschiede auch bei immobilisiertem LipH vorliegen, wurde die jeweilige prozentuale Gesamtaktivität bestimmt.

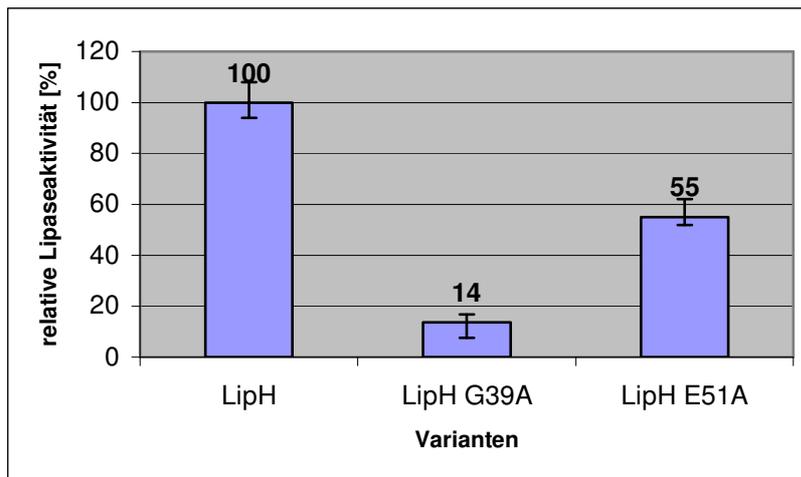


Abb. 3.30: Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase mit den LipH-Varianten G39A und E51A im Interaktionsversuch. Um die Lipaseaktivität der verschiedenen Renaturierungsansätze vergleichen zu können, wurde die zuvor ermittelte Lipaseaktivität (Abb. 3.29) der einzelnen Fraktionen des LipH-Renaturierungsansatzes addiert und als 100 % der Aktivität angesetzt. Mit den anderen Renaturierungsansätzen wurde entsprechend verfahren und ihre addierte Aktivität in Verhältnis zur 100 %igen Aktivität des LipH-Renaturierungsansatzes gesetzt.

In Abb. 3.30 ist gut zu erkennen, dass die Gesamtaktivität der Lipase, welche mit der immobilisierten LipH-Variante G39A inkubiert wurde, stark reduziert ist. Lag die Lipaseaktivität des Renaturierungsansatzes bei „frei“ vorliegendem LipH bei 44 % im Verhältnis zum WT-Niveau, so liegt diese nun bei 14 %. Die Immobilisierung der LipH-Variante bewirkt folglich eine weitere Reduzierung der Lipaseaktivität.

Während der Renaturierungsansatz mit „frei“ vorliegendem LipH E51A noch WT-Niveau in der Lipaseaktivität (105 %) zeigte, wird diese bei der Immobilisierung des LipH E51A halbiert; Die Gesamtaktivität belief sich auf 55 %. Im Gegensatz zur LipH Variante G39A ist die Lipaseaktivität bei einer Inkubation mit der LipH Variante E51A nur dann reduziert, wenn die Foldase immobilisiert vorliegt.

3.8 Verkürzung der Foldase LipH um 63AS

In der Literatur ist beschrieben, dass die C-terminalen zwei Drittel hinreichend für die Faltungsaktivität der Foldaseproteine sind. Für die Lif-Proteine aus *P. aeruginosa* PAO1, *P. spec.* 109 und *B. glumae* (Schneidinger, 1997; Shibata *et al.*, 1998 b, El Khattabi *et al.*, 1999) wurde gezeigt, dass die Membranankersequenzen für die Aktivierung der jeweiligen Lipasen nicht essentiell sind. Auch die Deletion großer Teile der variablen Domänen führte nicht zu einem Funktionsverlust der Lif-Proteine aus *P. aeruginosa* TE3285 und *B. cepacia* (Ihara *et al.*, 1995; Quyen *et al.*, 1999), wobei diese Aussagen allerdings auf Experimenten zur *in vitro*-Aktivierung von Lipasen beruhen.

Verschiedene Mutation im Bereich AS 22-69 der Foldase aus *P. aeruginosa* hatten allerdings in Experimenten der *in vivo*- sowie der *in vitro*-Aktivierung der Lipase eine drastische Reduzierung der Aktivität zur Folge.

Um den Einfluss des N-Terminus der Foldase LipH aus *P. aeruginosa* auf die Aktivierung der Lipase zu untersuchen, wurde das LipH-Protein am N-Terminus um die ersten 63 AS verkürzt.

Dies wurde über eine Amplifizierung des *lipH*-Gens mit den Oligonukleotiden „LipH Up Verkürzt“ und „M13 Down“ erzielt. Als Template diente der Vektor pBBR1MCS/PA *lipAH*. Durch die gewählten Oligonukleotide wurden die Restriktionsschnittstelle *NdeI* in das bei der PCR gewonnenen Genprodukt eingeführt bzw. die im Template vorhandene *BamHI*-Restriktionsschnittstelle mit amplifiziert. Das so restringierte Genprodukt wurden in den mit den gleichen Schnittstellen geöffneten His-Tag-Vektor pET19b kloniert (siehe Abb. 8.3).

Die Überexpression der verkürzten LipH-Variante erfolgte im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3)/pET19b/PA verk. LipH. Der N-terminale His-Tag ermöglicht die einfache Reinigung durch eine IMAC (2.22). Die Überexpression und Aufreinigung entspricht dem Vorgehen unter Punkt 3.4.2.

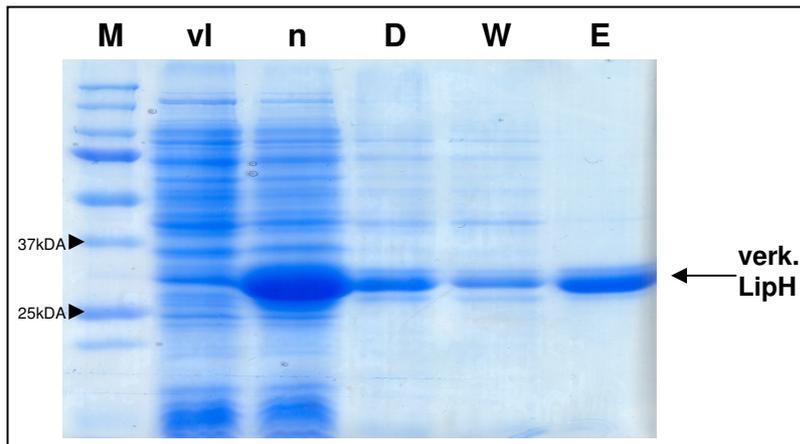


Abb. 3.31: SDS-PAGE der Überexpression und Aufreinigung der verkürzten LipH-Variante. SDS-PAGE der Überexpression der Foldase im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3). M: Marker, vl: GZE der *E. coli* BL21(DE3)/pET19b/PALipH-Überexpressions-Kultur vor Induktion. nI: GZE der *E. coli* BL21(DE3)/pET19b/PALipH-Überexpressions-Kultur nach 2 h Induktion. D: Durchlauf. W: Waschfraktion. E: Eluat. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580nm} = 0,15).

Insgesamt wurden aus einer 100 ml Überexpressions-Kultur 5,72 mg verkürztes LipH für anschließende Experimente aufgereinigt.

3.8.1 *In vitro*-Renaturierung der *P. aeruginosa*-Lipase LipA mit der verkürzten LipH-Variante

Im Folgenden wurde der Einfluss einer N-terminalen Verkürzung der Foldase LipH aus *P. aeruginosa* um 63 AS auf die *in-vitro*-Renaturierung der „nah nativen“ Lipase untersucht.

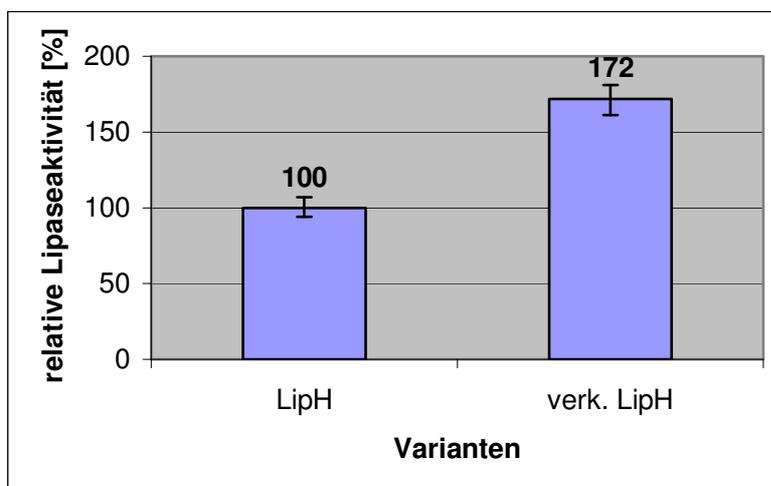


Abb. 3.32: Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase durch die verkürzte LipH-Variante. Die Lipaseaktivität wurde nach Winkler & Stuckmann (1979) analysiert. Als Proben-volumen dienten 20 µl des jeweiligen Renaturierungsansatzes. Die Lipaseaktivität des LipH-Renaturierungsansatzes wurde als 100 % Aktivität angesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Die Inkubation des Lipase-Renaturierungsansatzes hat mit der um 63 AS verkürzten LipH-Variante eine Aktivitätssteigerung auf 172 % zur Folge (Abb. 3.32).

3.8.2 Interaktionsversuche zwischen LipA und der verkürzten LipH-Variante

An das Renaturierungsexperiment schloss sich das Interaktionsexperiment zwischen der Lipase LipA und dem aufgereinigten verkürzten LipH an. Die Interaktion wurde wiederum über während des Experiments entnommene Aliquots kontrolliert, welche mittels einer SDS-PAGE (2.18) analysiert wurden.

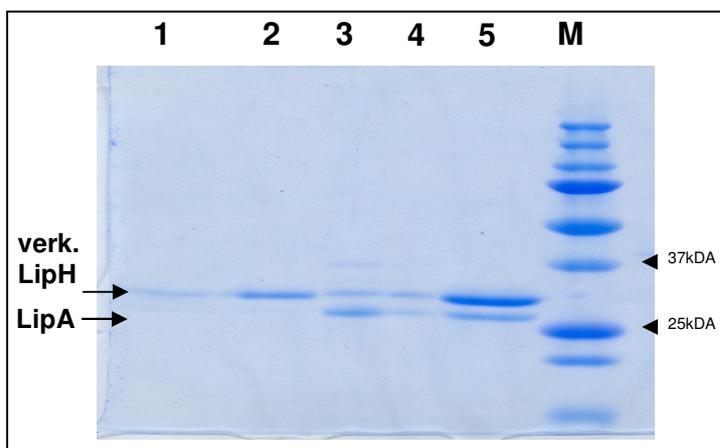


Abb. 3.33: SDS-PAGE des Interaktionsversuchs zwischen der Lipase LipA und der verkürzten LipH-Variante.

M: Marker, 1: Durchlauf LipH, 2: Waschfraktion LipH, 3: Durchlauf LipA, 4: Waschfraktion LipA, 5: Eluat. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($O.D._{580nm} = 0,15$).

Die verkürzte LipH-Variante wurde in einem Überschuss zu den Ni^{2+} -NTA Magnetic Agarose Beads gegeben, was anhand der Bande bei ca. 33 kDa im Durchlauf sowie in der Waschfraktion deutlich zu erkennen ist. In Spur 3, dem Durchlauf der Lipase LipA, konnte auf Höhe von 29 kDa ebenfalls eine Bande detektiert werden, die dem überschüssigen LipA-Protein zugesprochen werden kann. Nachdem in der folgenden Waschfraktion (Spur 4) nahezu kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte, wurde durch die Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM die verkürzte Foldase-Variante im Komplex mit der Lipase eluiert. Allerdings wird der LipAH-Komplex durch die denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE aufgelöst, sodass jeweils eine Bande bei 33 kDa und 29 kDa detektiert wurde, die dem verkürzten LipH- bzw. LipA-Protein entspricht.

Mit den aufgefangenen Durchlauf- und Waschfraktionen sowie mit dem Eluat wurde ein Lipaseaktivitätstest durchgeführt, um eine Aussage über die Verteilung der Lipaseaktivität treffen zu können.

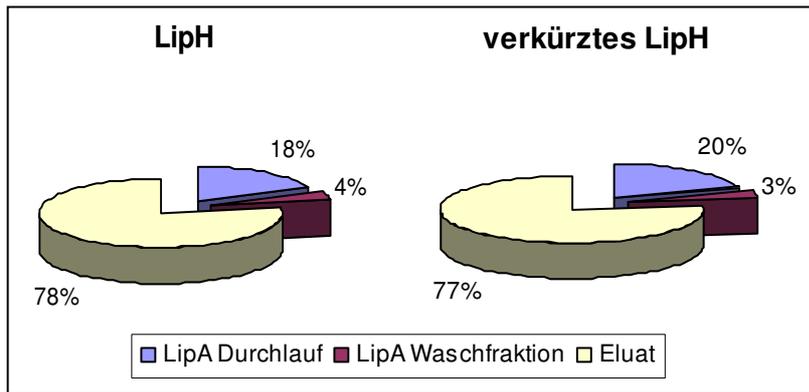


Abb. 3.34: Verteilung der Lipaseaktivität auf die einzelnen Fraktionen der verkürzten LipH-Variante. Die Lipaseaktivität wurde nach Winkler & Stuckmann (1979) mit 10 µl der jeweiligen Fraktion bestimmt. Um die Lipaseaktivität der einzelnen Fraktionen besser vergleichen zu können, wurde die Lipaseaktivität aller Fraktionen des jeweiligen Renaturierungsansatzes addiert. Dieser Wert entsprach 100 % der Aktivität. Die Aktivität der jeweiligen Fraktion wurde dazu ins Verhältnis gesetzt. Auf die Darstellung der jeweiligen LipH-Durchlauf- und -Waschfraktion wurde verzichtet, da hier keine Lipaseaktivität detektiert wurde.

Die Lipaseaktivität der einzelnen Fraktionen beider Renaturierungsansätze ist in etwa gleich verteilt (Abb. 3.34). Wie zuvor wurde der größte Teil der Lipaseaktivität im Eluat detektiert; Zwischen 77 % und 78 % der Gesamtaktivität sind hier zu finden. Der Großteil der übrigen Aktivität, zwischen 18 % und 20 %, ist im LipA-Durchlauf detektiert worden. Die verbleibenden 3 %- 4 % der Gesamt-Lipaseaktivität sind in der LipA-Waschfraktion zu finden.

Das „frei“ vorliegende verkürzte LipH bewirkte in der *in vitro*-Renaturierung der „nah nativen“ Lipase LipA eine Lipaseaktivitätssteigerung auf 172 %. Um zu untersuchen, ob diese Aktivitätsunterschiede auch beim immobilisierten verkürzten LipH vorliegen, wurde die jeweilige prozentuale Gesamtaktivität bestimmt (siehe Abb. 3.35).

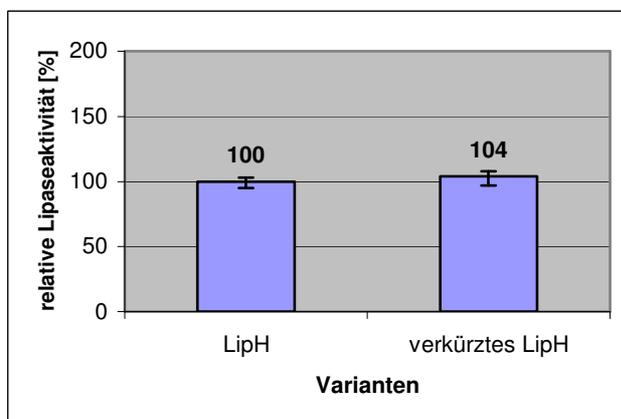


Abb. 3.35: Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase mit der verkürzten LipH-Variante im Interaktionsversuch. Um die Lipaseaktivität der verschiedenen Renaturierungsansätze vergleichen zu können, wurde die zuvor ermittelte Lipaseaktivität (Abb. 3.34) der einzelnen Fraktionen des LipH-Renaturierungsansatzes addiert und als 100% angesetzt. Mit dem anderen Renaturierungsansatz wurde entsprechend verfahren und ihre addierte Aktivität in Verhältnis zur 100%igen Aktivität des LipH-Renaturierungsansatzes gesetzt.

Im Gegensatz zur „frei“ vorliegenden verkürzten LipH-Variante ist bei einer Immobilisierung des verkürzten LipH keine Aktivitätssteigerung der Lipase LipA im Gegensatz zum WT-Niveau festzustellen. Liegt das verkürzte LipH immobilisiert vor, so erreicht die Lipaseaktivität nur noch WT-Niveau.

Um die Unterschiede in der LipA-Aktivierung bei „frei“ vorliegendem verkürztem LipH zu analysieren, wurden weitere *in vitro*-Renaturierungen der *P. aeruginosa*-Lipase LipA mit der verkürzten LipH-Variante durchgeführt. Bei der Standard-Renaturierung von LipA wurden die Foldase sowie die Lipase in einem äquimolaren Verhältnis von jeweils 4,25 µg/2 ml Rückfaltungspuffer eingesetzt. In den folgenden Renaturierungsversuchen wurden diese Konzentrationen variiert. Neben dem üblichen 1:1 Verhältnis von Foldase und Lipase wurde in der Renaturierung ein 1:2 bzw. 2:1 Verhältnis eingestellt. Das entspricht einer Endkonzentration von 4,25 µg Foldase zu 8,5 µg Lipase bzw. 8,5 µg Foldase zu 4,25 µg Lipase pro 2 ml Rückfaltungspuffer. Eine zusätzliche Abwandlung bestand in dem anfänglichen 1:1 Verhältnis, welches nach der Hälfte der Rückfaltungsinubation, also nach 1,5 Stunden, auf ein 2:1 Verhältnis eingestellt wurde; Dieses entspricht einem Verhältnis von 8,5 µg Foldase zu 4,25 µg Lipase nach 1,5 Stunden Inkubation.

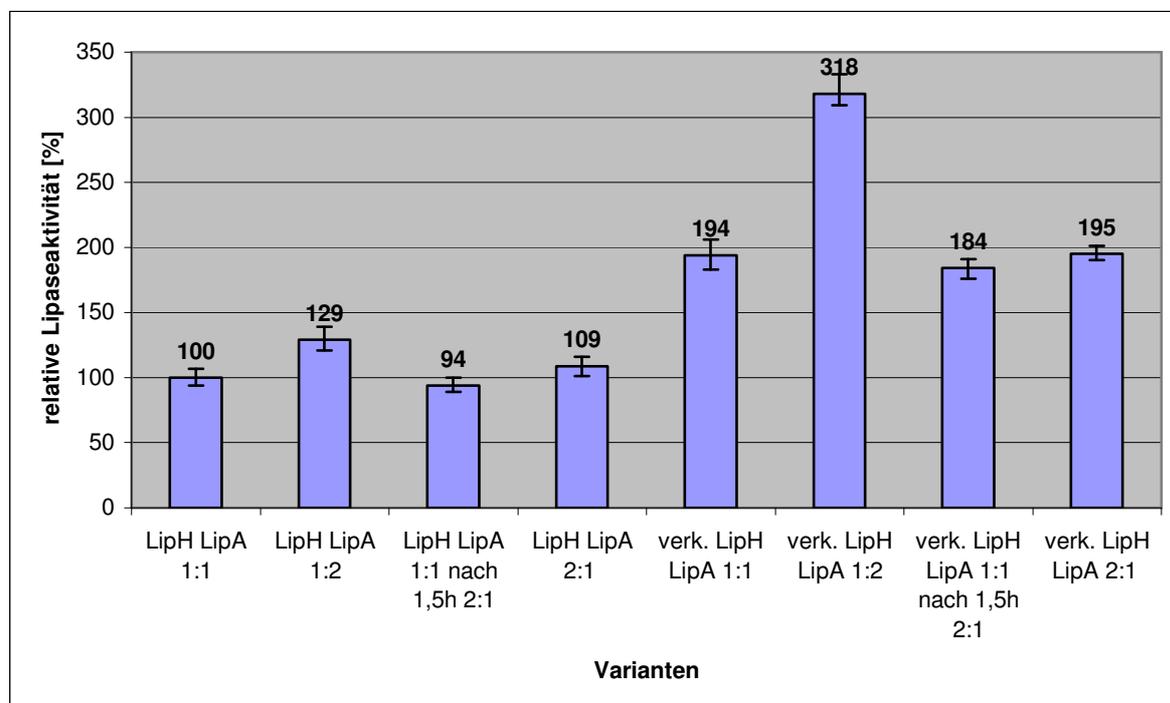


Abb. 3.36: Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipase durch die verkürzte LipH-Variante in variierenden Konzentrationen. Die Lipaseaktivität wurde nach Winkler & Stuckmann (1979) analysiert. Als Proben-volumen dienten 20 µl des jeweiligen Renaturierungsansatzes. Die Lipaseaktivität des LipH-Renaturierungsansatzes wurde als 100 % Aktivität angesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Wie bereits zuvor zeigt der Renaturierungsansatz der verkürzten LipH-Variante im Gegensatz zum WT-LipH-Ansatz eine Erhöhung der Lipaseaktivität. Eine Steigerung der Lipaseaktivität durch eine erhöhte LipH-Konzentration war weder im LipH-Renaturierungsansatz noch im verkürzten LipH-Renaturierungsansatz zu beobachten. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Foldasekonzentration von Anfang an erhöht war oder erst nach 1,5 Stunden erhöht wurde. Die gesteigerte Lipaseaktivität des verkürzten LipH-Renaturierungsansatzes blieb allerdings bestehen. Die Erhöhung der Lipasekonzentration auf ein 1:2 Verhältnis hatte im LipH-Renaturierungsansatz eine leichte Steigerung der Lipaseaktivität auf 129 % zur Folge. Eine Erhöhung der Lipasekonzentration im verkürzten LipH-Renaturierungsansatz führte zu einer Lipaseaktivitätssteigerung auf 318 % im Verhältnis zum LipH-Renaturierungsansatz. Angesichts der erhöhten Lipaseaktivität im verkürzten LipH-Renaturierungsansatz entspricht die Aktivitätssteigerung durch eine Erhöhung der Lipasekonzentration einer Steigerung um 164 % im Verhältnis zum verkürzten LipH-Renaturierungsansatz mit äquimolaren Proteinmengen.

3.8.3 Auswirkungen der Verkürzung der Foldase auf die Spezifität

Die Wirkung der Foldasen ist spezifisch für ihre korrespondierende Lipase. Eine Ausnahme stellt die Lipase aus einer eng verwandten Spezies, *P. alcaligenes*, dar. Bei einer Expression im heterologen Wirt *E. coli* kann sie durch das Lif-Protein aus *P. aeruginosa* aktiviert werden (El Khattabi *et al.*, 1999). Die Aktivierung einer heterologen Lipase ist daher möglich. Bei entfernt verwandten Spezies ist dies anders. Die *P. aeruginosa* Foldase konnte nicht die Funktion der Foldase aus *B. glumae* übernehmen und die *B. glumae* Lipase aktivieren (El Khattabi *et al.*, 1999). Ob die Verkürzung der Foldase Einfluss auf die Spezifität hat, wurde im Folgenden untersucht.

3.8.4 Überexpression und Aufreinigung heterologer Lipasen

Die Wahl der heterologen Lipasen fiel zum einen auf die Lipase aus *P. alcaligenes*. Da bereits bekannt ist, dass diese durch die heterologe Foldase aus *P. aeruginosa* aktiviert werden kann, konnten auf diese Weise Unterschiede in der Aktivierung durch die verkürzte LipH-Variante festgestellt werden. Zum anderen wurde die Lipase aus *B. glumae* gewählt. Eine Aktivierung

durch die *P. aeruginosa* Foldase ist nicht möglich, dies könnte sich jedoch durch die Verkürzung der Foldase geändert haben.

Um *in vitro*-Versuche mit heterologen Lipasen durchführen zu können, mussten diese zunächst überexprimiert und aufgereinigt werden. Für die Expression beider Gene wurden die von Janosch (2002) gefertigten Konstrukte pBBR1MCS/PAL *lipA* und pBBR1MCS/BG *lipA* verwendet. Diese wurden in den Expressionstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Nach der erfolgreichen Expression wurden beide Lipasen, wie zuvor für die Lipase LipA aus *P. aeruginosa* beschrieben, aufgereinigt. Der Erfolg der Überexpression und Aufreinigung wurde über eine SDS-PAGE analysiert (ohne Abb.).

Insgesamt wurden jeweils aus einer 100 ml Überexpressions-Kultur 2,4 mg *P. alcaligenes*-LipA „inclusion bodies“ und 1,3 mg *B. glumae*-LipA „inclusion bodies“ für anschließende Experimente aufgereinigt.

3.8.5 *In vitro*-Renaturierung der *P. alcaligenes*-Lipase und der *B. glumae*-Lipase

Erneut wurden äquimolare Mengen Lipase und Foldase wie unter Punkt 3.4.3 beschrieben in Renaturierungsversuchen eingesetzt.

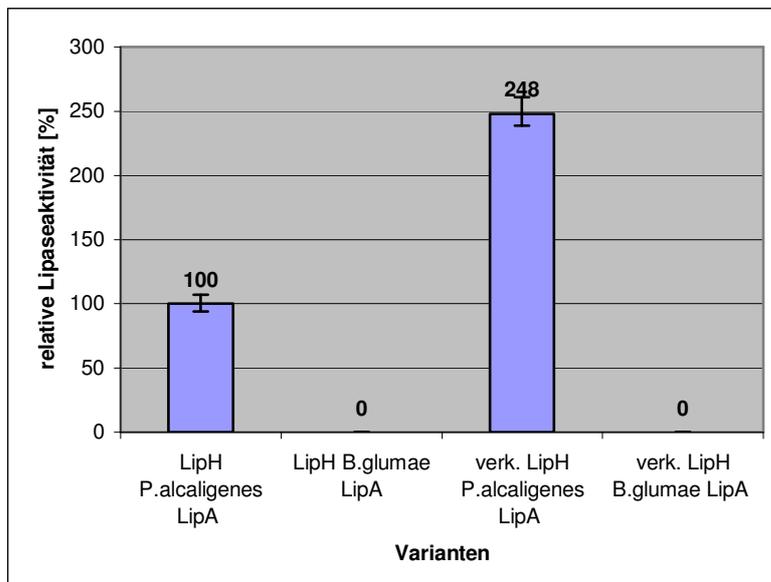


Abb. 3.37: Lipaseaktivität nach Renaturierung der Lipasen aus *P. alcaligenes* und *B. glumae* durch die verkürzteLipH-Variante. Die Lipaseaktivität wurde nach Winkler & Stuckmann (1979) analysiert. Als Proben-volumen dienten 20 µl des jeweiligen Renaturierungsansatzes. Die Lipaseaktivität des LipH-Renaturierungsansatzes wurde als 100 % Aktivität angesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Wie in Abb. 3.37 zu sehen ist, zeigt der *P. alcaligenes*-Lipase-Renaturierungsansatz der mit *P. aeruginosa*-LipH inkubiert wurde, Aktivität. Wurde die *P. alcaligenes*-Lipase mit der verkürzten LipH-Variante inkubiert, wies der Renaturierungsansatz eine um 248 % erhöhte

Lipaseaktivität auf. Damit ist der Faktor der gesteigerten Lipaseaktivität mit 2,48 bei der *P. alcaligenes*-LipA-Aktivierung deutlich höher als der Faktor 1,72 bei der *P. aeruginosa*-LipA-Aktivierung.

Eine Aktivierung der *B. glumae*-Lipase mit der *P. aeruginosa*-Foldase war erwartungsgemäß nicht möglich. Allerdings konnte die verkürzte *LipH*-Variante die *B. glumae*-Lipase ebenfalls nicht aktivieren.

3.8.6 Expression der verkürzten Foldase LipH im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1

In den vorangegangenen *in vitro*-Renaturierungsversuchen mittels der verkürzten LipH-Variante kam es zu Unterschieden in der Lipaseaktivität. Lag das verkürzte LipH „frei“ im Renaturierungsansatz vor, so kam es zu einer Erhöhung der Lipaseaktivität auf 172 % des WT-Niveaus. War es, wie im durchgeführten Interaktionsversuch, immobilisiert, so lag die Lipaseaktivität mit 104 % im WT-Niveau. Wie sich die Immobilisierung des verkürzten LipH-Proteins in *in vivo*-Versuchen auswirkt, wurde im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 untersucht.

Um eine Immobilisierung des verkürzten LipH zu erreichen, wurde der Membrananker, bestehend aus den ersten 21 AS des LipH-Proteins, unmittelbar vor das um 63 AS verkürzte LipH kloniert. Aufgrund der kleinen Größe wurde auf die Amplifizierung des Membranankers mittels einer PCR verzichtet. Der Membrananker wurde aus zwei synthetisierten Oligonukleotiden erstellt, die mittels Hybridisierung zum vollständigen, doppelsträngigen Membrananker zusammengefügt wurden. Dazu wurden äquimolare Mengen der Oligonukleotide „Membrananker Up“ und „Membrananker Down“ für 15 Minuten auf 98 °C erhitzt und dann auf RT abgekühlt. Der nun doppelsträngige Membrananker wurde über die angefügten *Xba*I- und *Nde*I-Überhänge in den mit den gleichen Schnittstellen geöffneten Vektor pET19b/PA verk. LipH kloniert. Nach der Ligation war die genutzte *Nde*I-Schnittstelle nicht mehr existent. Eine Klonierung der Membrananker- und verkürzten LipH-Sequenz in den Expressionsvektor erfolgte über die angefügte *Nde*I- und die vorhandene *Bam*HI-Schnittstelle in den mit den gleichen Schnittstellen geöffneten Vektor pBBRPA-*lipAH/ccdB*. Der so entstandene Vektor wurde als pBBR1MCS/PA *lipA MA+* verk. *lipH* bezeichnet.

Die Expression der verkürzten LipH-Variante mit Membrananker erfolgte im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1/pBBR1MCS/PA *lipA* MA+ verk. *lipH*. Dazu wurden Hauptkulturen (2.4.3) der LipH-Varianten und der entsprechenden Kontrollen in 10 ml LB-Cm³⁰⁰-Medium angeimpft und bei 37 °C üN inkubiert. Zur photometrischen Lipaseaktivitätsbestimmung wurde der Kulturüberstand analysiert.

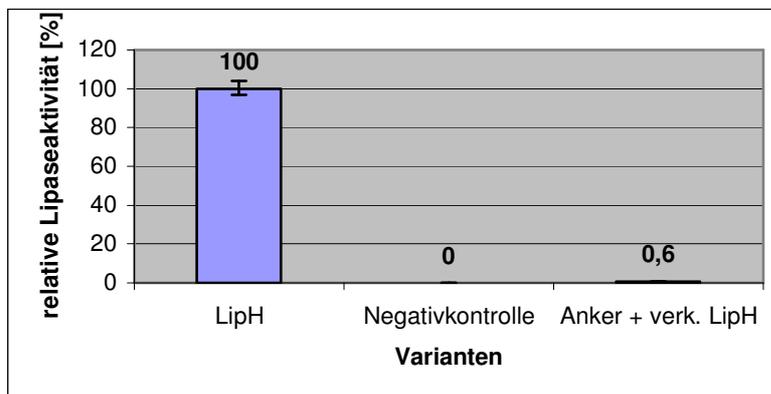


Abb. 3.38: Lipolytische Aktivität der verkürzten LipH-Varianten im homologen Wirt. Die Lipaseaktivität im Kulturüberstand wurde mit pNPP als Substrat bestimmt. Dargestellt ist die relative Lipaseaktivität im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit den Plasmiden zur Expression der ep-LipH-Varianten im Operon mit der WT-Lipase nach 16 Wuchs. Die Werte von *P. aeruginosa* PABST7.1 mit pBBR1MCS/*lipAH* (WT-Operon) wurden gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.

Wie in Abb. 3.38 zu sehen ist, zeigt die „Anker + verkürztes LipH“-Variante im Überstand nahezu keine Lipaseaktivität. Über eine Immunodetektion der Proteins LipH im GZE wurde dessen Expression nachgewiesen. Parallel dazu wurde eine LipA-Immunodetektion mit dem jeweiligen Kulturüberstand durchgeführt.

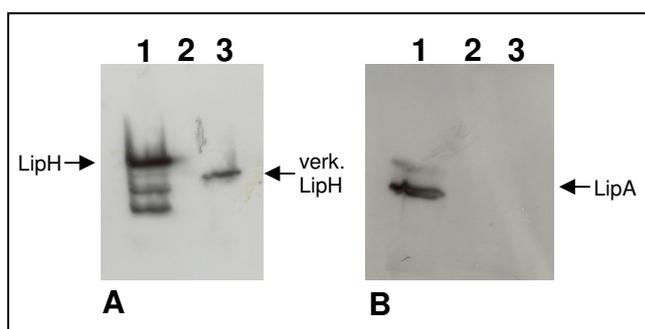


Abb. 3.39: Immunodetektion der Proteine LipH und LipA bei homologer Expression der verkürzten LipH-Variante. Die Bakterien wurden für 16 h bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. 1: Positivkontrolle *P.aeruginosa* PABST7.1/pBBRPA-*lipAH*, 2:Negativ-Kontrolle *P.aeruginosa* PABST7.1/pBBR1MCS), 3: *P.aeruginosa* PABST7.1/ pBBR1MCS/PA *lipA* MA+ verk. *lipH* **A:** Immunodetektion der Foldase LipH in der Membranfraktion. Die auf das Gel aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580nm}= 0,15). Der Nachweis erfolgte mit einem LipH-spezifischen Antiserum. **B:** Immunodetektion der Lipase LipA im Kulturüberstand. Die Kulturvolumen, die einer O.D._{580nm}= 0,3 entsprachen, wurden mit TCA gefällt. Der Nachweis der Lipase erfolgte mit Lipase-spezifischen Antiserum.

Wie in Abb. 3.39 A zu erkennen ist, wurde die verkürzte LipH-Variante im homologen Wirt exprimiert. Einen Nachweis für die Immobilisierung der verkürzten LipH-Variante mittels Membrananker in die Membran wurde über eine weitere Immunodetektion der Membranfraktion erbracht (ohne Abb.). Entsprechend dem Lipaseaktivitätstest konnte im Kulturüberstand kein LipA-Protein detektiert werden (Abb. 3.39 B).

Daher wurde die Lipaseaktivität des GZE dieser Variante bestimmt. Hier konnte Lipaseaktivität detektiert werden.

4. Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit war die Aufklärung von Struktur- und Funktionsbeziehungen der Foldase LipH aus *P. aeruginosa*, um so ein Verständnis von den molekularen Grundlagen verschiedener Eigenschaften des Chaperons zu erhalten.

Ein essentieller Schritt für die Produktion enzymatisch aktiver und in das extrazelluläre Medium sekretierter Lipase ist die periplasmatische Faltung und der sich daran anschließende Export über die äußere Membran. Die Faltung sekretorischer Proteine erfolgt im Periplasma unter der Mitwirkung sowohl spezifischer als auch unspezifischer periplasmatischer Faltungsmediatoren bei gleichzeitiger Bildung enzymatisch aktiver periplasmatischer Intermediate (Hamood *et al.*, 1990; Pugsley, 1992; Frenken *et al.*, 1993 a/b; Lu *et al.*, 1993; Bortoli-German *et al.*, 1994; Hardie *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 1996).

Die Foldase LipH stellt einen solchen spezifischen Faltungshelfer dar und ist neben der Faltung vermutlich auch an dem Export der Lipase beteiligt (Filloux *et al.*, 1998; Sandkvist, 2001; Filloux, 2004; Pauwels *et al.*, 2006).

Es stellt sich die Frage, wieso es überhaupt einer Lipaseaktivierung bedarf, da andere α - β -Hydrolasen keine Aktivierung benötigen. Fraglich ist auch, weshalb die Foldase mit der Lipase einen stabilen Komplex bildet, ob die Foldase die Lipase dabei inhibiert und was in diesem Fall ein Substrat der Lipase im Periplasma wäre. Oder dient der Komplex aus Lipase und Foldase nur der effizienten Sekretion der Lipase? Steht die Foldase dabei in direktem Kontakt zur Sekretions-Maschinerie oder präsentiert die immobilisierte Foldase die Lipase nur dem Sekretionsapparat?

4.1 *In vitro* Evolution des Chaperons LipH

Vorteile eines Alaninscans

In der vorliegenden Arbeit sollte die Foldase LipH einem vollständigen Alaninscan unterzogen werden. Diese vollständige Mutagenese-Bank sollte eine gezielte Analyse definierter Bereiche des LipH-Proteins auf ihre Beteiligung an der Aktivierung bzw. Sekretion der Lipase hin ermöglichen. Auf diese Weise können „hot spot“-Positionen eines Proteins lokalisiert und identifiziert werden (Cunningham & Wells, 1989; Weiss *et al.*, 2000).

Der Alaninscan ermöglicht es, wie alle „Directed Evolution“-Verfahren, die Eigenschaften eines Proteins wie z. B. die spezifische Aktivität, die Substratspezifität, die Enantioselektivität oder die Stabilität zu verändern und bestenfalls zu verbessern (Petrounia & Arnold, 2000; Reetz & Jaeger, 2002; Cherry & Fidantsef, 2003; Jaeger & Eggert, 2004; Robertson & Steer, 2004). Dazu sollte jede einzelne Position des Chaperons gegen Alanin ausgetauscht werden. War diese schon mit Alanin besetzt, so wurde diese gegen Prolin ausgetauscht. Dadurch konnte die Beteiligung jeder einzelnen Seitenkette an einem bestimmten Vorgang untersucht werden.

Ein hydrophobes Transmembran-Segment am N-Terminus verankert die Foldase in der inneren Membran und exponiert diese zum Periplasma (Frenken *et al.*, 1993; Schneidinger, 1997). Dass N-terminal verkürzte oder modifizierte Lip-Proteine ihre Fähigkeit beibehalten, die Faltung der Lipase *in vitro* zu katalysieren, könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Membrananker selbst nicht für die *in vitro*-Faltungsaktivität gebraucht wird (Shibata *et al.*, 1998; Quyen *et al.*, 1999; El Khattabi *et al.*, 2000). Daher wurde der Membrananker (AS 1-21) keiner Mutagenese unterzogen.

Da der Alaninscan eine labor- und kostenintensive Strategie darstellt, musste in Anbetracht der Anzahl von 319 durchzuführenden PCR-Reaktionen auf eine Optimierung jedes einzelnen Ansatzes verzichtet werden. Für die Erstellung des Alaninscans wurde die „Megaprimer“-Methode nach Baretino *et al.* (1994) erfolgreich abgewandelt (vgl. 3.1.2). Durch die bei Baretino *et al.* in der PCR eingesetzten Oligonukleotide ist es nötig, die in der ersten PCR gewonnenen Megaprimer durch Agarose-Gel-Elektrophorese zu isolieren und zu reinigen. Dieser Vorgang wäre bei allen 319 PCR-Reaktionen sehr zeitaufwendig und erübrigte sich durch die geschickte Auswahl der universellen Oligonukleotide. In allen PCR-Ansätzen konnte der sogenannte Megaprimer erstellt werden, welcher bereits die gewünschte Substitution trägt. Die Amplifizierung des Volllängenproduktes mit Hilfe des jeweiligen Megaprimers im Rahmen der zweiten PCR gestaltete sich allerdings deutlich schwieriger. 174 der 319 gewünschten AS-Austausche konnten als Volllängenprodukt amplifiziert werden. Dabei war die Einbringung der AS-Austausche in die N-terminale Hälfte deutlich erfolgreicher als die der C-terminalen Hälfte. Konnten N-terminal lediglich 30 Substitutionen nicht als Volllängenprodukt amplifiziert werden, so waren es C-terminal 115 Substitutionen. Die erhaltenen 46 C-terminalen Substitutionen konnten allerdings nur nach der Linearisierung des Templates eingebracht werden, was auf eine starke Ausbildung von Sekundärstrukturen in diesem Template-Konstrukt hindeutet.

Letztendlich konnten deutlich mehr als die Hälfte der gewünschten Einzel-Substitutionen als Vollängenprodukt amplifiziert und anschließend in den Vektor pBBRPA-*lipAH/ccdB* inseriert werden. Die 174 mutagenisierten LipH-Varianten liegen mit der Lipase im Operon unter Kontrolle des T7-Promotors vor, sodass diese sowohl im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) als auch im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 untersucht werden können. Zur dauerhaften Aufbewahrung werden Aliquots der erstellten Konstrukte bei -20 °C gelagert und stehen weiterhin für Screening-Anwendungen auf verschiedene Eigenschaften zur Verfügung.

Fehlerhafte PCR (epPCR)

Proteine sind durch die Sequenz ihrer AS definiert. Diese gibt die Faltung in eine dreidimensionale Struktur vor und bestimmt so die Funktion des Proteins (Branden & Tooze, 1991). Trotz intensiver Untersuchungen der grundlegenden Prinzipien der Proteinfaltung gibt es noch große Wissenslücken über die Zusammenhänge zwischen der Sequenz und der Struktur eines Proteins einerseits und zwischen der Struktur und der Funktion andererseits (Arnold, 1996). Heute erlauben es die molekularbiologischen Methoden, die Mechanismen der natürlichen Evolution im „Reagenzglas“ nachzuahmen und so vorhandene Wissenslücken bei der Gewinnung neuer, interessanter Varianten zu umgehen bzw. zu schließen. Prinzipiell sind keine Kenntnisse von der Beziehung zwischen Struktur und Funktion des Proteins nötig, um biotechnologisch interessante Proteinvarianten z. B. für die Industrie zu erzeugen. Verbindet man allerdings die durch gerichtete Evolution eines Proteins gewonnenen Erkenntnisse mit den strukturellen Grundlagen, so kann dies in außergewöhnlicher Weise zur Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen eines Proteins beitragen. Denn immer wieder zeigte die Anwendung evolutiver Mechanismen zur Entwicklung unterschiedlichster Eigenschaften, dass die die Veränderung bewirkenden AS-Austausche auf rationaler Basis nicht vorhersagbar waren (Chen & Arnold, 1993; You & Arnold, 1994; Moore & Arnold, 1996; Moore *et al.*, 1997).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit neben dem beschriebenen „rationalen“ ein auf gerichtete Evolution basierender Ansatz gewählt. Im Gegensatz zum Alaninscan stellte die Methode der fehlerhafte PCR eine schnelle Möglichkeit dar, Punktmutationen über das gesamte Gen zu verteilen. Austausche in der AS-Sequenz können so zu einer Veränderung der Faltungseigenschaften führen, ohne sich dabei auf bestimmte Regionen festzulegen. So

können AS-Positionen lokalisiert werden, die nicht in bekannten „hot spot“-Regionen liegen aber trotzdem einen Einfluss auf die Proteinaktivität haben (Liebeton *et al.*, 2000; Bocola *et al.*, 2004; Reetz *et al.*, 2007). Ein zweiter Grund für die Wahl eines solchen Ansatzes war die Klärung der grundlegenden Fragestellung, ob die *in vitro* Evolution prinzipiell geeignet ist, die Aktivität eines Enzyms durch die gerichtete Evolution seines sterischen Chaperons zu erhöhen. Wie bereits zuvor erwähnt, konnten bereits Enzyme durch unmittelbare gerichtete Evolution in ihrer spezifischen Aktivität verbessert werden, jedoch konnte dies nicht über die gerichtete Evolution des Chaperons gezeigt werden.

Bei der epPCR nutzt man die fehlende Korrekturlesefähigkeit der Taq-Polymerase, welche aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde (Tindall & Kunkel, 1988; Eckert & Kunkel, 1990). Die Fehlerrate kann durch Zugabe weitere Additive in den PCR-Ansatz weiter erhöht werden (Zakour & Loeb, 1982; Beckmann *et al.*, 1985; Lehtovaara *et al.*, 1988; Leung *et al.*, 1989; Liao & Wise, 1990).

Im vorliegenden Fall wurde die Fehlerrate durch eine erhöhte MgCl₂-Konzentration und die Zugabe von MnCl₂ in den PCR-Ansatz bewirkt (Cadwell & Joyce, 1992). In Vorversuchen wurde die Fehlerrate auf drei Basenaustausche pro 1 kb eingestellt, was bei einer Gengröße von 1023 bp ca. drei AS-Austauschen pro LipH-Protein entspricht. Ein Grund für die begrenzte Mutationsrate bestand in der Annahme, dass auch für die Foldase aus *P. aeruginosa* die meisten Mutationen einen neutralen Effekt haben und nur wenige Mutationen sich positiv oder auch negativ auf die spezifische Aktivität der Foldase auswirken, wie dies im Allgemeinen für die Wirkung von Mutationen angenommen wird (Arnold & Moore, 1997). Um eine zu hohe Maskierung interessanter Mutationen durch neutrale Mutationen zu umgehen, musste das gleichzeitige Auftreten von zu vielen Mutationen in einem Molekül durch Begrenzung der Fehlerrate verhindert werden. Um darüber hinaus eine hohe Diversität der eingeführten Mutationen zu sichern, wurde das PCR-Produkt von zehn Ansätzen vereint.

4.2 Expression der Foldase-Varianten

Ausgehend von dem T7-Überexpressions-Plasmid pBBRPA-*lipAH* für das Lipase/Foldase-Operon (Janosch, 2002) wurde die singuläre *Eco72I*-Restriktionsschnittstelle in *lipH* genutzt, um eine *ccdB*-Kassette in das WT-*lipH* zu inserieren. Das *ccdB*-Gen kodiert für einen Gyrasehemmer, der in herkömmlichen Klonierungsstämmen wie DH5 α zu einer Veränderung der DNA-Topologie führt, indem dieser mit der DNA-Topoisomerase II (Produkt des *ccdB*-

Gens) interagiert. Dadurch sind die Zellen nicht lebensfähig (Bernard & Couturier, 1992; Miki *et al.*, 1992).

Zur Konstruktion dieses Vektors musste der *E. coli*-Stamm DB3.1 verwendet werden, da er eine Mutation im *ccdA*-Gen trägt und so das CcdB-Protein keinen Einfluss auf die Topoisomerase II hat. Der neue Vektor wurde als pBBRPA-*lipAH/ccdB* bezeichnet. Die Expression sämtlicher LipH-Varianten erfolgte ausgehend von diesem Vektor. Dazu wurden die mutagenisierten PCR-Fragmente über die das *lipH*-Gen flankierenden Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *PpuMI* und *BamHI* in den mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdauten Vektor pBBRPA-*lipAH/ccdB* inseriert. Durch die Restriktion des Vektors fällt das *lipH*-Gen samt inserierter *ccdB*-Kassette aus. Wird nun ein mutagenisiertes *lipH*-Gen eingefügt, so kann das Konstrukt wieder im Klonierungsstamm DH5 α replizieren. Wird allerdings das *lipH/ccdB*-Fragment erneut inseriert, so sind diese Zellen nicht lebensfähig.

Als heterologer Expressionsstamm diente *E. coli*-Stamm BL21(DE3), als homologer Expressionsstamm der Lipase/Foldase-defiziente *P. aeruginosa*-Stamm PABST7.1. Dieser Stamm trägt zusätzlich eine chromosomal integrierte Kopie des Gens der T7-RNA-Polymerase, deren Expression wiederum unter der Kontrolle des *lacUV5/lacI^q*-Elementes steht und die Induktion der Expression mit IPTG ermöglicht (Jaeger *et al.*, 1997).

Die ortsspezifischen LipH-Varianten, die im Rahmen des Alaninscans erstellt wurden, wurden wie beschrieben in den Vektor pBBRPA-*lipAH/ccdB* inseriert und der Klonierungsstamm DH5 α mit diesen Konstrukten transformiert. Die so erstellten 174 LipH-Konstrukte wurden isoliert und bei -20 °C gelagert, sodass sie dauerhaft für Screening-Anwendungen auf verschiedene Eigenschaften zur Verfügung stehen.

Mit der erstellten zufällig generierten ep-LipH-Bank wurde der Klonierungsstamm *E. coli* DH5 α transformiert, die Bank wurde aus dem Klonierungsstamm isoliert und der heterologe Expressionsstamm BL21(DE3) mit ihr transformiert. Die ep-LipH-Bank steht dauerhaft für Screeninganwendungen auf verschiedene Eigenschaften zur Verfügung und hat eine Größe von 797.760.000 Transformanden, was anhand von Verdünnungsreihen ermittelt wurde. Die Größe von 8×10^8 Transformanden entspricht dem erwarteten Ergebnis von 10^6 - 10^9 Transformanden (S. Becker, TU Darmstadt, persönliche Mitteilung).

4.3 Charakterisierung erzeugter Varianten der Foldase aus *P. aeruginosa*

Im Rahmen der Mutagenese ist eine Vielzahl von LipH-Varianten entstanden, welche nun auf ihre Eigenschaften getestet wurden. Das sterische Chaperon LipH dient der Lipase LipA aus *P. aeruginosa* als Faltungshelfer. Im Screening der LipH-Varianten stellte daher die Lipaseaktivität den Indikator für funktionales LipH dar.

Lipolytische Aktivität lässt sich quantitativ auf Testmedien (2.4.2) nachweisen. Der Nachweis erfolgt dabei visuell. Auf den Tributyrin-Platten entstehen um die Bakterienkolonien klare Höfe, welche auf die Hydrolyse des Tributyrins durch die Lipase zurückzuführen sind.

Screening der ep-LipH-Bank

Zur Klärung der grundlegenden Fragestellung, ob die *in vitro*-Evolution prinzipiell geeignet ist, die Aktivität eines Enzyms durch die gerichtete Evolution seines sterischen Chaperons zu erhöhen, wurde zuerst der auf der gerichteten Evolution basierende Ansatz der ep-LipH-Bank analysiert. Die anfängliche Expression im heterologen Wirt ermöglichte ausschließlich die Betrachtung der Gesamtlipaseaktivität, ohne dabei auf Unterschiede in der Sekretion einzugehen. Die ep-LipH-Bank wurde so verdünnt, dass nach einer Inkubation der Tributyrin-Platten bei 37 °C üN Einzelkolonien vorlagen. Der Expressionswirt *E. coli* BL21(DE3) verfügt nicht über den notwendigen Sekretionsmechanismus, den Xcp-Apparat. Die lipolytische Aktivität der Varianten konnte somit erst bestimmt werden, wenn die Lyse der Zellen einsetzte bzw. das Tributyrin in die Zellen diffundierte. Dieses war nach einer Lagerung der Tributyrinplatten bei 4 °C für drei Tage der Fall.

90 % der analysierten Foldase-Varianten zeigten keine Lipaseaktivität mehr. Die Ursachen hierfür waren vermutlich die Entstehung von selten verwendeten Codons (Airaksinen & Hovi, 1998; Georgescu, 2003; Wong *et al.*, 2006), Stoppcodons, instabilen oder inaktiven LipH-Varianten bzw. fehlgefalteten und somit instabilen oder inaktiven Lipasen im Rahmen der epPCR. Der tatsächliche Ursprung für die fehlende Hofbildung und die damit fehlende Lipaseaktivität dieser Varianten ist ohne weitere Analysen nicht ersichtlich. Da die Zahl der „uninteressanten“ Varianten (z. B. durch falsche Codon-Usage) gegenüber der Zahl der „interessanten“ Varianten (z. B. ein inaktiver LipAH-Komplex) vermutlich in der Masse überwiegt, wurden diese Varianten nicht weiter analysiert.

Kolonien, die eine Hofbildung und somit Lipaseaktivität zeigten, wurden in dem folgenden Screening in Doppelbestimmung auf eine Tributyrinplatte übertragen. Durch die

entsprechenden Positiv- und Negativ-Kontrollen konnte die Lipaseaktivität der Klone nach der entsprechenden Inkubation eingeordnet werden.

Die meisten Varianten zeigten eine zur WT-Variante vergleichbare Hofbildung, was auf eine vergleichbare Lipaseaktivität schließen lässt. Es war durchaus zu erwarten, dass eine Vielzahl der Mutationen keinen Einfluss auf die Lipaseaktivität haben würde. Zum einen können stille Mutationen die Ursache sein, bei denen die AS-Sequenz unverändert bleibt. Zum anderen können Austausche aufgrund der Art der ausgetauschten AS und ihrer Lage keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben.

Nur wenige Varianten zeigten eine Hofbildung, die sich von der WT-Variante unterschied. Es konnten Varianten mit reduzierter und auch mit vergrößerter Hofbildung detektiert werden. Die Bestimmung von Enzymaktivitäten über Indikatorplatten, in diesem Fall Tributyrin-Agarplatten, kann immer nur als erster Schritt des Screenings angesehen werden. Die Aussagekraft ist z. B. durch Unterschiede in der Koloniegröße begrenzt. Aufgrund der Größe der ep-LipH-Bank ist diese Methode jedoch prädestiniert, da so eine schnelle Vorauswahl der „interessanten“ Varianten möglich ist.

Die bisher erhaltenen Ergebnisse beruhen auf einer heterologen Expression im Wirt *E. coli* BL21(DE3). Diese Ergebnisse können jedoch nicht 1:1 auf eine Expression im homologen Wirt *P. aeruginosa* PABST7.1 übertragen werden. Die Freisetzung enzymatisch aktiver bakterieller Lipasen in das Kulturmedium stellt sich als ein komplexer Vorgang dar, an dem die verschiedensten zellulären Vorgänge beteiligt sind. Angefangen bei der Transkription entsprechender Strukturgene, über die Translation der resultierenden mRNA bis zur Translokation des Proteins über die innere und äußere Membran im Falle Gram-negativer Bakterien, kann jeder Schritt einer Regulation durch die Zelle unterliegen.

Nachdem die Zahl der „interessanten“ Varianten so drastisch eingeengt wurde, wurden diese Varianten auch im homologen Wirt PABST7.1 analysiert. Die folgende Diskussion behandelt die Ergebnisse der heterologen und homologen Expression gemeinsam, um so besser auf expressionsbedingten Unterschiede und Gemeinsamkeiten eingehen zu können.

Zur Erfassung einer potentiellen Korrelation der zellulären LipH-Konzentration mit der Lipaseproduktion wurden die jeweiligen Lipase- und Foldasemengen immunologisch verglichen. Des Weiteren wurden die ep-LipH-Varianten sequenziert, um so Informationen darüber zu erhalten, welche AS-Positionen im LipH betroffen sind und zu welchen AS sie ausgetauscht wurden.

Auf dieser Basis wurden die Varianten nacheinander mit allen Aspekten aus heterologer und homologer Expression, immunologischer Detektion und Sequenzierung analysiert.

4.4 Die C-terminale Verkürzung der Foldase bewirkt eine drastische Reduzierung der Lipaseaktivität

Zwei Varianten, ep-LipH-Variante 2-58 und 3-73, wiesen sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression eine drastische Reduktion der Lipaseaktivität auf.

Während die Variante 2-58 noch ca. 1 % Lipaseaktivität im Vergleich zur WT-Variante aufwies, waren es im Fall der Variante 3-73 noch 6 %. Aufgrund eines während der epPCR inserierten Stoppcodons kam es zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation, was die drastische Verringerung der Lipaseaktivität erklärt. Hybrid-Foldasen aus *P. aeruginosa* und *B. glumae* konnten nur dann die *B. glumae*-Lipase aktivieren, wenn sie den C-terminalen Bereich von mindestens 138 AS der *B. glumae*-Foldase enthielten (El Khattabi *et al.*, 1999). Durch den vorzeitigen Abbruch der Translation ist ebenfalls die Immunodetektion des LipH-Proteins schlüssig, da kein Volllängenprodukt nachgewiesen werden konnte.

Die C-terminale Verkürzung der Foldase um 171 AS im Fall von Variante 2-58 führt sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression zum nahezu vollständigen Funktionsverlust des LipH-Proteins.

Es konnte immunologisch kein Lipaseprotein detektiert werden, was vermutlich auf die Degradation ungefalteter Proteine durch Proteasen zurückzuführen ist.

Auch durch die C-terminale Verkürzung der Foldase um 62 AS im Fall von Variante 3-73 ist die Lipaseaktivität sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression drastisch reduziert. Im Gegensatz zur Variante 2-58 konnte das verkürzte LipH-Protein allerdings immunologisch detektiert werden, jedoch mit dem zu erwarteten „Shift“ nach unten.

Im Fall der heterologen Expression konnte trotz der drastisch reduzierten Aktivität das Lipaseprotein in vergleichbarer Menge zur WT-Variante detektiert werden. Trotz der nahezu fehlenden Faltung der Lipase durch die Foldase scheint diese weiterhin in der Lage zu sein, einen Komplex mit der Lipase einzugehen und diese so vor einer Degradation zu schützen.

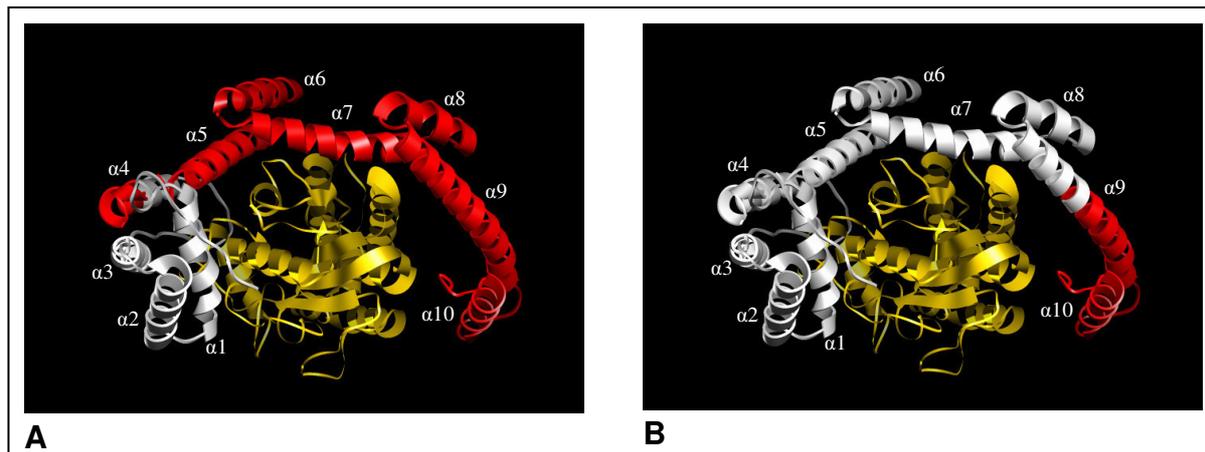


Abb. 4.1: 3D-Strukturmodell zur Deletion der Foldase. Die Foldase (grau-rot abgebildet) bildet mit der Lipase (gelb abgebildet) einen Komplex. Durch ein während der epPCR eingefügtes Stoppcodon kam es in zwei LipH-Varianten zu einer Deletion von 171 AS (**A**) bzw. 62 AS (**B**) der Foldase (rot markiert).

In Abb. 4.1 ist gut zu erkennen, welche Bereiche der Foldase von der Deletion (rot markierte Struktur) betroffen sind. Die Foldase ist in zwei Minidomänen aufgeteilt ($\alpha 1$ – $\alpha 3$ und $\alpha 9$ – $\alpha 10$), die durch ein ausgedehntes helikales Motiv getrennt werden ($\alpha 4$ – $\alpha 8$) (Pauwels *et al.*, 2006). Durch die Verkürzung der Foldase um 171 AS (Abb. 4.1 A), kommt es zum Verlust der C-terminalen Minidomäne sowie des fast kompletten helikalen Motivs, welches die Spacer-Region beinhaltet. Das konservierte Motiv ($Rx_1x_2FDY(F/C)L(S/T)A$) (Rosenau *et al.*, 2004), welches sich in der N-terminalen Minidomäne in Helix $\alpha 1$ befindet, bleibt erhalten, ist für eine Aktivierung der Lipase im WT-Niveau allerdings nicht ausreichend. Die Verkürzung der Foldase um 62 AS führt zu einem Verlust des C-Terminus bis Helix $\alpha 9$. Im Gegensatz zur Foldase-Verkürzung um 171 AS mit 1 % Lipaseaktivität weist diese Variante eine Lipaseaktivität von 6 % auf, obwohl es durch die Verkürzung zum nahezu vollständigen Verlust der C-terminalen Minidomäne kommt. Je kürzer jedoch die Deletion ist, desto höher ist die verbleibende Lipaseaktivität. Allerdings sind die jeweiligen Funktionen der einzelnen Domänen noch nicht geklärt. Neben der Komplexbildung mit und der Faltung der Lipase, ist auch die Vermittlung der Sekretion eine gängige Hypothese (Filloux *et al.*, 1998; El Khattabi, 2001; Sandkvist, 2001, Filloux, 2004). Durch die gerichtete Evolution des *lipH*-Gens kam es zu zwei zufälligen Verkürzungen der Foldase. Eine Untersuchung der Domänenstruktur durch eine systematische Verkürzung der Foldase könnte helfen, die Funktion der einzelnen Domänen aufzuklären.

- **Die C-terminale Verkürzung der Foldase führt zur drastischen Reduzierung der Lipaseaktivität.**
- **Je kürzer die Deletion ist, desto höher ist die verbleibende Lipaseaktivität.**

4.5 Reduzierung der Lipaseaktivität nach Zufallsmutagenese des Chaperons LipH

Im vorliegenden Fall wurden mit der Methode der fehlerhafte PCR Mutationen in das Chaperon LipH inseriert. Eine Vielzahl dieser Mutationen bewirkte eine Veränderung der Eigenschaften des Proteins. Wie bereits erwähnt, waren mehr als 90 % der so erstellten LipH-Varianten inaktiv bezüglich ihrer Faltungseigenschaft gegenüber der Lipase, was sich aus einer fehlenden Hofbildung um die jeweilige Kolonie ergab. Einige Varianten zeigten allerdings eine Hofbildung, was mit der Produktion aktiver Lipase einhergeht. Die Hofbildung mancher Varianten war im Verhältnis zum WT allerdings (zum Teil deutlich) reduziert. Dies deutet auf eine verringerte Aktivität der Lipase und somit indirekt der Foldase hin. Werden Positionen identifiziert, die eine Reduzierung der Foldaseaktivität bewirken, so können diese zur Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen der Foldase beitragen. Ausgehend von den ep-LipH-Varianten mit einer im Vergleich zur WT-Variante reduzierten Lipaseaktivität, konnten so durch die Einbringung der jeweiligen ortsspezifischen Mutationen AS-Positionen identifiziert werden, die für die Funktion der Foldase notwendig sind.

Die ep-LipH-Variante 4-25, bestehend aus den Austauschen R258H und R327C, weist bei heterologer Expression eine stark verringerte Lipaseaktivität von ca. 3 % auf. Bei homologer Expression ist diese ebenfalls auf 1 % im Vergleich zur Positiv-Kontrolle reduziert. Die Immunodetektion lässt auf gleiche Proteinmengen im Verhältnis zur WT-Variante schließen, allerdings konnte die Lipase LipA bei homologer Expression nur im GZE nachgewiesen werden.

Der Austausch R258H als ortsspezifische Mutationen in der Foldase zeigte sowohl bei heterologer Expression als auch mit 104 % bei homologer Expression eine leicht erhöhte Lipaseaktivität. Die detektierte LipH-Proteinmenge ist dabei mit der Positiv-Kontrolle vergleichbar.

Obwohl R258 konserviert ist, bewirkt ein Austausch zu Histidin nahezu keine Veränderung in der Lipaseaktivierung. Arginin zählt zu den AS mit polaren, geladenen Seitenketten, in diesem Fall einem positiv geladenen Harnstoffrest, und kann starke Bindungen zu anderen negativ geladenen und somit polaren AS aufbauen. Betrachtet man unter diesem Aspekt die Lage von Arginin im Modell, so kommt Glutamat²⁷⁴ als Bindungspartner in Frage. Zwar ist in der Sequenz in unmittelbarer Nähe des Arginins ein Glutamat vorhanden, E²⁵⁵, in dem berechneten Modell erkennt man jedoch, dass dieses Glutamat auf Grund seiner Orientierung eher R²⁷⁸ als Bindungspartner nutzt. Zwar ist Histidin im Verhältnis zu Arginin etwas

kleiner, jedoch kommt Glutamat²⁷⁸ weiterhin als Bindungspartner in Frage, was einen Erhalt der Lipaseaktivität erklärt. Beide Salzbrücken wirken stabilisierend auf die Struktur der Foldase. In der Struktur der *B. glumae*-Foldase, einem Vertreter der Familie II, fehlen beide der oben erwähnten Salzbrücken, was auf strukturelle Unterschiede der beiden Foldasen in diesem Bereich hindeutet (K. Pauwels, Vrije Universiteit Brussel, Belgien, persönliche Mitteilung).

Der Austausch R327C zeigte bei heterologer Expression eine vergleichbare, eher leicht erhöhte Lipaseaktivität im Verhältnis zur WT-Variante. Bei homologer Expression war die Lipaseaktivität mit 1 % deutlich reduziert. Die detektierte LipH-Proteinmenge ist dabei mit der Positiv-Kontrolle vergleichbar (Abb. 3.10). Im Fall der homologen Expression konnte bei einer Lipaseaktivierung mittels der Foldase LipH R327C allerdings keine Lipase im Überstand detektiert werden, was die drastisch verringerte Lipaseaktivität erklärt.

Bei Betrachtung der Position 327 im Sequenzvergleich, wird ersichtlich, dass Arginin³²⁷ konserviert ist, darunter auch die Familie I, zu der die *P. aeruginosa*-Foldase gehört. Im Modell liegt Arginin in einem Peptidstrang in direkter Nähe zur Lipase. Als direkter Bindungspartner kommt das Glutamat an Position 58 der Lipase in Frage. Diese Position ist in den Lipasen verschiedener Familien konserviert. Durch den Austausch zu Cystein wird die Position 327 mit einer AS mit polarer aber ungeladener Seitenkette besetzt. Cysteine bilden untereinander Disulfid-Brücken aus, deren Bildung im Periplasma durch Dsb-Proteine katalysiert werden (Bardwell, J.C., 1994, Urban *et al.*, 2001; Liebeton *et al.*, 2001). LipH weist jedoch kein weiteres Cystein auf, welches als Bindungspartner dienen könnte. Allerdings resultierte die Inserierung von Cystein an Position Y99 der Foldase LipB aus *P. aeruginosa* TE3285 in einer Dimerisierung der Foldasen untereinander (Shibata *et al.*, 1998 c). Die Position 327 ist zugänglich für andere Proteine an der Oberfläche lokalisiert. Daher ist auch im vorliegenden Fall eine Dimerisierung mit einem weiteren Foldaseprotein denkbar. In *P. aeruginosa* TE3285 bewirkt die Dimerisierung der Foldase ein Ausbleiben der Lipaseaktivierung, was auch hier die fehlende Lipaseaktivität im Überstand erklären würde. Der Erhalt der Lipaseaktivierung unter heterologen Bedingungen spricht allerdings für eine Dimerisierung mit einem anderen wirtsspezifischen Protein, z. B. einem Protein des TypII-Sekretionssystems. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der C-Terminus neben der Lipase mit weiteren Proteinen interagiert und so möglicherweise direkt an der Vermittlung der Sekretion der Lipase beteiligt ist (Filloux, 2004). Für einen Sekretionsdefekt spricht auch die im Periplasma der Variante detektierte Lipaseaktivität.

Da bei der heterologen Expression keiner der Einzelaustausche eine Reduzierung der Lipaseaktivität bewirkte, ist ein Zusammenspiel des Austausches an Position 258 und Position 327 für die Aktivitätsreduzierung verantwortlich. Bei der homologen Expression ist der Verlust der Lipaseaktivität auf den Austausch R327C zurückzuführen, welcher eine potentielle Dimerisierung mit einem wirtsspezifischen Protein ermöglicht und so die Lipasesekretion unterbindet.

Die ep-LipH-Variante 4-32, bestehend aus den Austauschen R199H und E324G, wies bei heterologer Expression eine stark reduzierte Lipaseaktivität von ca. 21 % auf. Die Foldase konnte in der Immunodetektion nicht oder nur sehr schwach als Volllängenprodukt nachgewiesen werden. Lediglich im deutlich kleineren kDa-Bereich konnten spezifische Signale detektiert werden, die vermutlich Abbauprodukte der Foldase darstellen. Die Lipase LipA konnte nicht detektiert werden.

Bei homologer Expression wies die Variante ebenfalls eine stark reduzierte Lipaseaktivität von nur 0,3 % auf. Obwohl LipH in der der WT-Variante vergleichbaren Menge vorliegt, konnte das Lipase-Protein nur im GZE und nicht im Überstand detektiert werden (Abb. 3.5). Eine Sekretion der Lipase blieb somit aus, was die nahezu nichtvorhandene Lipaseaktivität im Überstand erklärt.

Einzelaustausch R199H in der Foldase zeigte bei heterologer Expression keine Lipaseaktivität. Bei homologer Expression zeigte dieser Austausch eine mit 121 % leicht erhöhte Lipaseaktivität. Während die LipH-Proteinmenge im Vergleich zum WT-Niveau deutlich erhöht ist, ist die Proteinmenge der Lipase im Verhältnis nur leicht erhöht (Abb. 3.10).

Arginin199 ist in mehr als zwei der vier Familien konserviert. Im Modell liegt die AS in einer Helix in unmittelbarer Nähe zur Lipase. Ein Kontakt wäre laut Modell über Leucin23 der Lipase möglich. Durch den Austausch zu Histidin, ebenfalls einer polaren, geladenen AS, kommt es bei heterologer Expression zum Aktivitätsverlust der Lipase, bei der homologen Expression allerdings zu einer leichten Aktivitätssteigerung. Dieses verdeutlicht erneut die Unterschiede der heterologen und homologen Genexpression. Liegt die Foldase „frei“ im heterologen Wirt vor, so kann ein AS-Austausch einen anderen Effekt haben, als bei der homologen Expression, wo weitere wirtsspezifische Faktoren einfließen.

Der Austausch E324G in der Foldase zeigte bei heterologer Expression eine leicht reduzierte Lipaseaktivität. Betrachtet man das Ergebnis der homologen Expression, zeigt der Austausch E324G mit 72 % ebenfalls eine leicht reduzierte Lipaseaktivität im Verhältnis zur WT-

Variante. Die LipH-Menge scheint laut Immunodetektion leicht reduziert zu sein, allerdings wurden deutlich mehr Abbauprodukte der Foldase detektiert, was auf eine geringere Stabilität hindeutet. Korrelierend dazu scheint die Lipasemenge ebenfalls leicht reduziert zu sein (Abb. 3.10). Diese AS-Position ist nicht konserviert, in Familie I jedoch in vier von fünf Fällen mit einem Glutamat besetzt, im fünften Fall mit einem Aspartat, ebenfalls einer AS mit negativ geladener Seitenkette.

Im Modell ist eine Interaktion nicht erkennbar. Einige Faktoren sprechen allerdings für eine Interaktion mit Arginin286 der Foldase. Dafür gibt es zwei Gründe: Zum einen ist die Vorhersage einer Interaktion an Position 324 noch sehr ungenau, da das Modell an Position 326 endet. Zum anderen ist die Position 324 zwar nicht konserviert, aber anhand des Sequenzvergleichs ist erkennbar, dass in Familie II Glutamat – wenn auch um eine Position versetzt - konserviert ist. Hier interagiert Glutamat340 in der *B. glumae*-Sequenz mit Arginin302 der Foldase und bildet so eine Salzbrücke. Eine Ausbildung der Salzbrücke ist daher auch in *P. aeruginosa* wahrscheinlich, zumal weitere Strukturähnlichkeiten in diesem Bereich zu erwarten sind: In *B. glumae* gibt es in der Foldase eine Überlappung bzw. Interaktion zwischen Tryptophan299 und Arginin343 was in der *P. aeruginosa*-Sequenz vermutlich Tryptophan283 und Arginin327 entspricht (K. Pauwels, Vrije Universiteit Brussel, Belgien, persönliche Mitteilung).

Durch den Austausch E324G ist die Ausbildung einer Salzbrücke mit R286 nicht möglich. Dies führt zu einer Reduzierung der Stabilität, die eine verstärkte Degradation, z. B. durch die periplasmatischen Proteasen Prc und CtpA (Windgassen,2000; Grützmaker, 2003), nach sich ziehen kann (vgl Abb. 3.10) und so indirekt eine Verringerung der Lipaseaktivität bewirkt. Bei erneuter Betrachtung der beiden Einzelaustausche ist die Reduzierung der Lipaseaktivität bei heterologer Expression der Variante 4-32 auf 21 % auf beide Austausche zurückzuführen, wobei der Austausch R199H mehr ins Gewicht fällt, da die Stabilitätsveränderung durch den Austausch E324G nur eine leichte Reduzierung der Lipaseaktivität bewirkte.

Bei homologer Expression der Variante 4-32 war die Lipaseaktivität auf 0,3 % reduziert. Da der Austausch R199H eine leichte Erhöhung der Aktivität und der Austausch E324G lediglich eine Verringerung der Aktivität auf 72 % bewirkt, müssen beiden Austausche in Kombination die drastische Aktivitätsreduzierung hervorrufen.

Die zwei bisher besprochenen ep-LipH-Varianten wiesen sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression eine Reduzierung der Lipaseaktivität auf, auch wenn sich die ortsspezifischen Einzelaustausche zum Teil abhängig vom Expressionswirt in ihrer Wirkung

unterschieden. Die folgenden zwei Varianten bewirken bei der heterologen Expression eine deutliche Reduzierung, im homologen Wirt allerdings eine Steigerung der Lipaseaktivität.

In der Variante 2-65 wurde Histidin182 gegen Prolin ausgetauscht. Dieser Austausch bewirkte bei heterologer Expression in *E. coli* BL21(DE3) eine Reduzierung der Lipaseaktivität auf 5 %, bei homologer Expression in *P. aeruginosa* PABST7.1 eine Erhöhung auf 160 %. Die Analyse des zugehörigen LipH- und LipA-Blots lässt vergleichbare Protein-Mengen erkennen, sodass Unterschiede in der Expression als Ursache für die Aktivitätsveränderung ausgeschlossen werden können.

Die AS-Position 182 sitzt außen in einem „Loop“, was für die relativ große AS Histidin typisch ist, jedoch ohne direkten Kontakt zur Lipase. Trotzdem zeigt die heterologe Expression gegenüber der homologen Expression deutliche Unterschiede in der Lipaseaktivität. Ein wichtiger Unterschied der homologen Expression ist die Sekretion der Lipase mittels eines Multi-Protein-Komplexes, dem Xcp-Apparat, ins Medium. Bei der heterologen Expression verbleibt die Lipase intrazellulär. Durch die Mutation von Histidin182 zu Prolin wurde der an dieser Stelle ausgebildeten „Loop“ gebeugt.

Bei heterologer Expression ist die Lipaseaktivität dadurch deutlich, auf 5 %, reduziert. Zur Aktivierung der Lipase bildet die Lipase LipA einen Komplex mit ihrem Chaperon LipH. Ist durch die eingeführte Beugung die Interaktion mit der Lipase im heterologen Wirt gestört, so kann nur eine sehr geringe Lipaseaktivität bestimmt werden.

Bei homologer Expression ist die Lipaseaktivität dagegen erhöht, 160 % der WT-Lipaseaktivität. Im Gegensatz zur heterologen Expression wird die Lipase bei homologer Expression sekretiert. Es wird postuliert, dass diese über den Xcp-Apparat durchgeführte Sekretion durch das Chaperon LipH vermittelt wird (Filloux, 2004; Sandkvist, 2001 und 2006). Auch im Fall der Elastase aus *P. aeruginosa* ist das Propeptid an der Vermittlung der Sekretion über die TypII-Maschinerie beteiligt (Braun *et al.*, 2001). Im Fall der Lipase wird vermutet, dass das Sekretionssignal nicht aus einem linearen Bereich besteht, sondern vielmehr die Konformation aus Lipase und Foldase das Sekretionssignal bildet und die Sekretion durch den direkten Kontakt zu den Xcp-Proteinen XcpP und XcpQ initiiert wird. Ist der Kontakt des LipH-Proteins zum Xcp-Apparat verbessert, so ist die Sekretion aktiver Lipase in das Medium effizienter und die Lipaseaktivität höher. Die Durchführung von sogenannten „Floating“-Experimenten – hier mit dem Protein XcpP-, die der Aufklärung von Interaktionen dienen, könnte helfen, detailliertere Ergebnisse zu erlangen.

Die ep-LipH-Variante 4-37, bestehend aus den Austauschen A132V, Q242L und E313G, weist bei heterologer Expression eine stark reduzierte Lipaseaktivität von ca. 36 % auf. Laut Immunodetektion der Foldase scheint die Proteinmenge im Vergleich zum WT jedoch nur geringfügig reduziert zu sein. Die Lipase LipA konnte immunologisch nicht detektiert werden.

Bei homologer Expression dagegen weist die Variante eine stark erhöhte Lipaseaktivität von ca. 650 % auf. Sowohl die Foldase- als auch die Lipase-Proteinmengen sind mit dem WT-Niveau vergleichbar.

Der Einzelaustausch A132V in der Foldase weist bei heterologer Expression eine Reduzierung der Lipaseaktivität auf. Die Variante zeigt bei homologer Expression eine Lipaseaktivität von 89 % im Vergleich zur Positiv-Kontrolle und ist daher ebenfalls reduziert. Die detektierten Proteinmengen sind vergleichbar mit dem WT-Niveau (Abb. 3.10).

Position 132 ist in mehr als zwei der vier Familien konserviert. Bei allen Vertretern der ersten drei Familien, bis auf eine Ausnahme, ist diese Position mit einem Alanin besetzt. Laut Modell liegt A132 in einer Helix ohne direkte Nähe zur Lipase. Da A132 scheinbar nicht an der Oberfläche liegt, was mit dem Hydrophobizitäts-Index von 1,8 übereinstimmen würde, ist eine Interaktion mit anderen Proteinen unwahrscheinlich. Alanin befindet sich in einer hydrophoben Umgebung. Ein Austausch zu Valin, einer ebenfalls hydrophoben AS jedoch mit einem deutlich höheren Hydrophobizitäts-Index von 4,2, könnte daher leichte sterische Veränderung zur Folge haben. Eventuell kommt es durch den Austausch zu Valin zu einer veränderten Orientierung der Helix.

Der Austausch Q242L in der Foldase zeigt bei heterologer Expression ebenfalls eine reduzierte Lipaseaktivität. Auch bei homologer Expression ist die Lipaseaktivität auf der Indikatorplatte verringert. Im spektrometrischen Lipaseaktivitätstest konnte allerdings keine Aktivität nachgewiesen werden. Die vorhandene LipH-Menge ist vergleichbar zum WT-Niveau; die Lipase konnte immunologisch nicht im Überstand nachgewiesen werden.

Vier der fünf Vertreter der Familie I sowie beide Vertreter aus Familie III haben Glutamin an dieser Position. Laut Modell sitzt Q242 in einer Helix, die eine Art Bügel zwischen den zwei Minidomänen des LipH darstellt. Durch den Austausch zu Leucin wird diese Position mit einer ungeladenen, unpolaren AS besetzt. Leucin ist etwas kleiner und orientiert sich eher zum Proteininneren. Durch die Lage an der Oberfläche ist eine Interaktion mit anderen Proteinen denkbar, die durch den Austausch zu Leucin erschwert bzw. unterbunden wird. Durch diese fehlende Interaktion erfolgt im homologen Wirt keine Sekretion der Lipase. Im Überstand konnte keine Lipaseaktivität bestimmt werden. Da die Indikatorplatte allerdings

eine Hofbildung aufwies, muss aktive Lipase im Periplasma vorliegen, was durch Zellyse oder Diffusion des Tributyrins zu einer Hofbildung führte. Der Austausch Q242L deutet somit auf einen Sekretionsdefekt dieser Variante hin. Es ist noch nicht bekannt, was genau das Signal für die Sekretion der Lipase in das extrazelluläre Medium ist. Seit langem wird eine Beteiligung der Foldase am Sekretionssignal postuliert (Sandkvist, 2001; Filloux, 2004), wie dies auch bei anderen Chaperonen der Fall ist (Braun *et al.*, 2001). Der Austausch in der Spacer-Region deutet ebenfalls auf eine Beteiligung der Foldase an der Vermittlung der Lipasesekretion hin und könnte so zu einer genaueren Lokalisierung des Sekretionssignals beitragen.

Der Einzelaustausch E313G zeigt bei heterologer Expression eine leichte Erhöhung der Lipaseaktivität. Im homologen Wirt ist die Lipaseaktivität auf 35 % reduziert. Dort ist auch die Foldase- sowie die Lipasemenge im Vergleich zum WT-Niveau deutlich reduziert (Abb. 3.10).

Glutamat313 ist sechsmal in den Familien I und II vertreten. Im Modell liegt Glutamat in einer Helix an der Oberfläche. Dieser gesamte Bereich ist sehr beweglich. Glutamat bildet über die polaren Ladungen Bindungen zu anderen polaren AS aus. Ein Kontakt zu anderen Proteinen ist daher wahrscheinlich. Der ungeladene, unpolare AS-Austausch Glycin beteiligt sich nur selten an chemischen Reaktionen. Im Fall der heterologen Expression scheint die Interaktion des Glutamats nicht erforderlich, sondern sogar hinderlich gewesen zu sein. Da die Lipaseaktivität bei homologer Expression jedoch auf 35 % reduziert ist, ist eine notwendige wirtsspezifische Interaktion denkbar, die durch Glycin gehemmt wird. Ob dies eine Interaktion mit Teilen der Sekretions-Maschinerie oder anderen Proteinen ist, ist nicht erkennbar, allerdings ist die Sekretion aufgrund der verringerten Lipasemenge im Überstand zumindest indirekt betroffen.

Es ist wahrscheinlich, dass die Reduzierung der Lipaseaktivität bei heterologer Expression der Variante 4-37 auf 36 % durch die Austausche A132V und Q242L bewirkt wird. Die leichte Erhöhung der Aktivität durch den Austausch E313G wird so kompensiert. Die Erhöhung der Lipaseaktivität bei homologer Expression der Variante 4-37 auf 650 % kann nur auf ein Zusammenspiel der drei Austausche A132V, Q242L und E313G zurückgeführt werden, da jeder Austausch für sich eine mehr oder weniger starke Reduzierung der Lipaseaktivität mit sich bringt.

- **Es konnten sowohl ep-LipH-Varianten als auch spezifische Einzelaustausche identifiziert werden, die eine deutliche Reduzierung der Lipaseaktivität und somit der Foldaseaktivität bewirken.**
- **Dabei können sich Austausche komplett in ihrer Wirkung unterscheiden, je nach dem, ob sie einzeln oder im Kontext mit anderen Austauschen vereint sind.**
- **Die Art der Expression, heterolog oder homolog, kann die Wirkung der Austausche ebenfalls verändern.**
- **AS-Position H182 weist auf eine Beteiligung der Foldase in der Vermittlung der Sekretion hin.**
- **Austausche in der Spacer-Region haben ebenfalls einen Einfluss auf die Lipaseaktivierung und weisen auf eine Beteiligung an der Lipaseaktivierung und eventuell der Sekretion hin.**
- **Die Austausche E313G und R327C weisen auf eine Interaktion des C-Terminus mit anderen Proteinen hin, eventuell mit Komponenten der Xcp-Maschinerie.**

4.6 Die gerichtete Evolution der Foldase bewirkt eine Steigerung der Lipaseaktivität

Durch die zufällige Inserierung von Mutationen in das *lipH*-Gen war es möglich, die Lipaseaktivität im Vergleich zur WT-Variante zu verändern. Das Bemerkenswerte und biotechnologisch Interessante in diesem Fall ist, dass die gerichtete Evolution eines Chaperons eine Aktivitätssteigerung des Enzyms bewirkt. In vielen Fällen konnten durch gerichtete Evolution bereits eine oder mehrere Eigenschaften eines Enzyms verbessert oder optimiert werden (Ness *et al.*, 1999; Miyazaki, *et al.*, 2000; Glieder *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2004; Van Loo *et al.*, 2004; Greene *et al.*, 2007; Ivancic *et al.*, 2007). Allerdings konnte noch nie die Eigenschaft eines Enzyms über die gerichtete Evolution des Chaperons optimiert werden. Im Fall der heterologen Expression der Lipase im Operon mit den ep-LipH-Varianten konnte die Aktivität auf bis zu 622 % im Vergleich zur WT-Variante gesteigert werden, im Fall der homologen Expression sogar auf bis zu 893 %.

Eine Lipaseaktivitätssteigerung auf 703 % bei heterologer Expression konnte nach der immunologischen Bestimmung der Proteinverhältnisse nur auf eine proportional entsprechende Erhöhung der Foldase- sowie der Lipasemenge zurückgeführt werden. Der Anstieg der Lipaseaktivität beruhte somit lediglich auf einem Expressionsunterschied. Zu Unterschieden in der Expression kann es aufgrund des degenerierten genetischen Codes kommen, da einige der 64 möglichen Basentriplets bevorzugt werden und andere kaum zugänglich sind (Eggert *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2006). Diese Expressionsunterschiede sind nur von geringem Interesse, da bekannt ist, dass eine erhöhte Foldaseexpression in einem beachtlichen Anstieg der Lipasemenge und somit auch der Lipaseaktivität resultiert (El

Khatabi *et al.*, 2003). Worauf die Expressionsunterschiede beruhen, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht ausgemacht werden. Diese Variante wurde daher auch nicht weiter untersucht.

Die ep-LipH-Variante 1-16 wies sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression eine stark erhöhte Lipaseaktivität auf; 622 % im heterologen und 789 % im homologen Wirt im Vergleich zum WT. Die detektierte LipH-Menge ist sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression vergleichbar mit der Positiv-Kontrolle. In beiden Fällen konnte jedoch eine erhöhte Lipasemenge detektiert werden. Aktuell ist ungeklärt, ob es sich bei der Lipaseaktivierung um eine 1:1-Stöchiometrie handelt oder es sich um einen „Multi-Turnover“-Umsatz handelt (Gerritse *et al.*, 1998; Shibata *et al.*, 1998; El Khatabi 1999; El Khatabi *et al.*, 2000). Das vorliegende Ergebnis deutet jedoch auf einen „Multi-Turnover“-Umsatz hin. Der erhöhte Umsatz der Lipase durch die Foldase würde die Menge aktiver Lipase erhöhen und die Degradation ungefalteter bzw. fehlgefalteter Lipase so reduzieren, dass sowohl eine höhere Lipasemenge als auch -aktivität detektiert werden konnte. Anhand der Sequenzierung konnten drei AS-Austausche identifiziert werden. Die Austausche A103T, L133S und D152G.

Die LipH-Variante A103T zeigte bei heterologer Expression mit der Lipase eine zur WT-Variante leicht reduzierte Lipaseaktivität. Bei homologer Expression ist diese auf 40 % reduziert. In der LipH-Immunodetektion der Variante wurde ein vergleichbares Signal wie im WT detektiert, was auf vergleichbare Mengen des Proteins schließen lässt. Die Lipasemenge scheint laut Immunodetektion jedoch leicht verringert zu sein.

Obwohl an Position 103 Alanin konserviert ist, wird bei einem Austausch zu Threonin weiterhin aktive Lipase gebildet, wenn auch - wie bei homologer Expression - deutlich reduziert auf 40 %. Threonin findet sich an dieser Position die in Familie IV im Stamm *Vibrio vulnificus* CMCP6 wieder. Der Austausch zu einer AS mit einer ungeladenen, polaren Seitenkette als Rest an dieser Position lässt eine zum Teil reduzierte Produktion aktiver Lipase zu. Interessanterweise ist die Position 103 Teil eines konservierten Motivs, (R_{X1}X₂FDY(F/C)L(S/T)A) (Rosenau *et al.*, 2004), das in Helix α 1 in direkter Nähe zur Lipase lokalisiert ist. Zwei Positionen dieses Motivs konnten als essentiell für die Foldaseaktivität identifiziert werden. Foldase-Varianten, die an den Positionen Y99 und S102 Mutationen aufwiesen waren inaktiv (Shibata *et al.*, 1998). Auch die Position A103 scheint für eine zur Positiv-Kontrolle vergleichbare Foldaseaktivität essentiell zu sein. Im Gegensatz zu den Positionen Y99 und S102 ist jedoch weiterhin eine Aktivierung der Lipase möglich. Da die

Lipaseaktivität sowohl bei heterologer als auch homologer Expression reduziert ist, ist Position A103 vermutlich direkt an der Interaktion zwischen Lipase und Foldase beteiligt.

Die LipH-Variante L133S zeigte bei der heterologen Expression mit der Lipase keine Lipaseaktivität. Auch bei homologer Expression war diese deutlich reduziert, auf 35 % im Vergleich zur Positiv-Kontrolle. Dies ist auf eine verringerte Lipasemenge im Überstand zurückzuführen, obwohl das LipH-Protein in vergleichbarer Menge zum WT vorliegt (siehe Abb. 3.10).

Die AS-Position 133 ist anhand des Sequenzvergleichs nicht konserviert. Allerdings findet sich an dieser Position Leucin in acht der 17 verglichenen Stämme wieder. In Familie I weisen vier der fünf Stämme ein Leucin auf. Der fünfte Stamm dieser Familie hat an dieser Position Isoleucin, ebenfalls eine ungeladene, unpolare AS. Beide AS haben unpolare kettenförmige Kohlenwasserstoffe als Rest, Leucin eine 2-Methylpropyl-Gruppe und Isoleucin eine Butylgruppe. Aufgrund ihrer gemeinsamen Summenformel, $C_6H_{13}NO_2$, werden sie als Konstitutionsisomere bezeichnet. Diese unpolaren Reste bilden die geringsten Bindungen untereinander aus. Zahlreiche Proteine weisen eine Konformation auf, in der die unpolaren Reste im Innern des Moleküls liegen, wo sie nicht mit Wassermolekülen oder anderen polaren Substanzen wechselwirken und die polaren Reste nach außen zeigen. Der hohe Hydrophobizitäts-Index (Leucin = 3,8, Isoleucin = 4,5) lässt ebenfalls auf eine Orientierung der AS in das Proteininnere schließen. Das Modell bestätigt dies. L133 liegt in einem Helix-Turn-Helix-Motiv und ist nach innen orientiert.

Durch den Austausch zu Serin wird die Position 133 mit einer AS mit polarer aber ungeladener Seitenkette, der Hydroxymethylgruppe, besetzt. Diese Gruppe von AS bewirkt, wie bereits erörtert, den Großteil der Stabilität von Strukturen. Durch den Austausch der AS Leucin zu Serin kommt es bei heterologer Expression zum Verlust der Lipaseaktivität. Bei Betrachtung des Austausches der Position 133 zu Serin im Modell, ist eine Interaktion mit der AS 117, einem Arginin, wahrscheinlich. Dadurch kommt es vermutlich zur Ausbildung einer strukturverändernden zusätzlichen H-Brücke.

Bei heterologer Expression zeigte die LipH-Variante D152G eine zur Positiv-Kontrolle reduzierte Lipaseaktivität. Bei homologer Expression wies die Variante 99 % der WT-Lipaseaktivität auf. Laut Immunodetektion kann jeweils von gleichen, allenfalls leicht verringerten Proteinmengen der Proteine LipA und LipH im Verhältnis zum WT-Niveau ausgegangen werden (Abb. 3.10).

Aspartat152 ist im Sequenzvergleich der Familien der Lip-Proteine nicht konserviert. Die AS-Position 152 liegt in einem „Loop“ und ist vermutlich nicht direkt an der Interaktion zwischen Lipase und Foldase beteiligt. Allerdings liegt in diesem Loop auch ein potentieller Bindungspartner des Aspartats, das Arginin, mehrfach vor. Als Bindungspartner ist Arginin163 am wahrscheinlichsten. Der Austausch vom Aspartat zu Glycin erlaubt weiterhin die Produktion aktiver Lipase, bedeutet aber zugleich den Verlust der stabilisierenden Salzbrücke. Der Turn des „Loops“ wird durch den Austausch möglicherweise steiler, jedoch auch flexibler.

Im Gegensatz zur ep-LipH-Variante 1-16 zeigte keiner der Einzelaustausche eine Aktivitätserhöhung. Die Aktivitätssteigerung muss daher auf einem Zusammenspiel der drei Austausche in der Variante 1-16 beruhen.

Die ep-LipH-Variante 1-36 wies ebenfalls sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression eine deutlich erhöhte Lipaseaktivität auf; 396 % bei heterologer und sogar 892 % bei homologer Expression. In beiden Fällen war die Foldasemenge vergleichbar zur WT-Variante. Die Sequenzierung ergab, dass zwei AS-Austausche vorlagen; R151H und F195L. Eine detaillierte Aussage, welche AS für den Effekt verantwortlich ist oder ob es sich um ein Zusammenspiel handelt, konnte ebenfalls nur durch eine ortsspezifische Mutagenese geklärt werden.

Dabei zeigte die LipH-Variante R151H bei heterologer Expression keine Aktivität der Lipase. Im Gegensatz dazu wies die Variante bei der homologen Expression eine mit 105 % dem WT vergleichbare Lipaseaktivität auf. Laut Immunodetektion ist die Foldasemenge leicht erhöht, die Lipasemenge hingegen mit dem WT-Niveau vergleichbar (Abb. 3.10).

Im Modell liegt die AS-Position 151 in einem mobilen „Loop“. Sie ist nicht konserviert, allerdings meistens mit einer polaren, geladenen AS besetzt, zu denen auch Arginin zählt. Arginin hat einen Hydrophobizitäts-Index von -4,5, was auf eine Orientierung zum Proteinäußeren schließen lässt. Durch den Austausch zu Histidin wird die Position 151 ebenfalls mit einer polaren, geladenen AS besetzt. Trotzdem zeigt diese Variante bei heterologer Expression keine Hofbildung. Im Gegensatz dazu weist die Variante bei homologer Expression eine zur Positiv-Kontrolle vergleichbare Lipaseaktivität auf. Ein plausibler Grund für diesen Unterschied ist nicht offensichtlich.

Der zweite AS-Austausch in der ep-LipH-Variante 1-36 ist an Position 195. In *P. aeruginosa* belegt Phenylalanin diese Position, welche in der Familie I an vier der fünf Positionen

konserviert ist. Phenylalanin ist eher zum Proteininneren lokalisiert. Laut Modell ist die AS-Position 195 in der ersten Helix eines Helix-Turn-Helix-Motiv lokalisiert und zur entsprechenden zweiten Helix ausgerichtet. Durch den Austausch wird die relativ große AS Phenylalanin gegen die etwas kleinere AS Leucin ausgetauscht. Im Sequenzvergleich fällt auf, dass Leucin an dieser Position in der Familie IV konserviert ist. Der Austausch von einem ringförmigem zu einem kettenförmigem Rest an Position 195 in der Foldase bewirkt bei heterologer Expression eine deutliche höhere Lipaseaktivität. Auch bei homologer Expression ist die Lipaseaktivität mit 139 % deutlich angestiegen. Die Erhöhung der Lipaseaktivität geht allerdings laut Immunodetektion mit einer deutlich gesteigerten Menge an Foldase- sowie Lipase-Protein einher (Abb. 3.10).

Beide Austausche, R151H und F195L, bewirken zusammen in der ep-LipH-Variante 1-36 eine deutliche Aktivitätserhöhung der Lipase. Da der Einzelaustausch R151H bei heterologer Expression jedoch keine Lipaseaktivität zeigt und bei homologer Expression nur das Niveau der Positiv-Kontrolle erreicht, ist der Austausch an der Position 195 für die Aktivitätssteigerung verantwortlich; Der Austausch R151H kann diese Steigerung im Zusammenspiel jedoch verstärken.

Auch die ep-LipH-Variante 1-37 wies in beiden Expressions-Wirten eine erhöhte Lipaseaktivität auf: Im Fall der heterologen Expression 526 % und im Fall der homologen Expression 777 %. In beiden Fällen ist die Foldasemenge vergleichbar mit der WT-Variante. Die Lipasemenge ist im Vergleich zur Positiv-Kontrolle ebenfalls nicht erhöht, was entweder auf einen erhöhten Anteil aktiver Lipase an der Gesamtproteinmenge oder auf eine „aktivere“ Lipase zurückgeführt werden kann. Die Einbringung einer ortsspezifischen Mutation ist allerdings nicht notwendig, da in diesem Fall laut Sequenzierung nur ein AS-Austausch vorlag: A282V.

Die AS-Position 282 liegt im Modell nicht in direkter Lage zur Lipase LipA. Stimmt das berechnete Modell in dieser Region mit der Realität überein, so ist eine Interaktion zwischen AS-Position 282 und LipA-Aminosäuren auf den ersten Blick nicht offensichtlich. Allerdings handelt es sich bei 3D-Strukturen immer nur um eine Momentaufnahme des Proteins, die sich in anderen Momenten geändert haben kann. Eine Aussage darüber, ob die AS-Position 282 direkt mit AS des LipA-Proteins interagiert, kann daher nicht abschließend getroffen werden. Aufgrund des größeren Restes von Valin ist allerdings eine Veränderung der LipH-Proteinstruktur wahrscheinlich. Da bei vermeintlich gleichen LipA-Mengen die Lipaseaktivität deutlich erhöht ist, könnte dies ein erster Hinweis darauf sein, dass auch

inaktive Lipase sekretiert wird. Der Anteil aktiver Lipase am Gesamtprotein ist nicht erkennbar. Aktuell geht man davon aus, dass nur aktives Protein über den TypII-Sekretionsweg sekretiert wird (Braun *et al.*, 2001; Sandkvist, 2001; Johnson 2006). Es ist möglich, dass das Sekretionssignal aus einem Übergangszustand der Lipase während der Faltung besteht (Filloux, 2004) und somit auch inaktives Protein sekretiert werden könnte.

Die ep-LipH-Variante 3-49, bestehend aus den Austauschen V232G und Stopp341R, wies bei heterologer Expression eine erhöhte Lipaseaktivität von 130 % auf. Die Immunodetektion der Foldase dieser Variante zeigte im Blot einen „Shift“ zu höherem Molekulargewicht auf, was sich nach der Sequenzierung durch die Verlängerung des LipH-Proteins erklärt. Im Vergleich zum WT wurde zwar eine deutlich erhöhte LipH-Menge, allerdings nur eine leicht erhöhte LipA-Menge detektiert. Bei homologer Expression zeigte die Variante ebenfalls einen Anstieg der Lipaseaktivität auf 150 %. Obwohl hier die LipH-Menge laut Immunodetektion im Gegensatz zur heterologen Expression deutlich reduziert ist, ist die Lipasemenge im Überstand vergleichbar mit dem WT-Niveau.

Der Einzelaustausch V232G in der Foldase zeigt bei heterologer Expression eine Erhöhung der Lipaseaktivität. Im Gegensatz dazu ist die Lipaseaktivität bei homologer Expression auf 39 % der WT-Variante reduziert. Die jeweiligen Proteinmengen sind laut Immunodetektion allerdings vergleichbar mit dem WT-Niveau (Abb. 3.10).

Die Position 232 ist in den vier Familien nicht konserviert. Laut berechnetem Modell liegt sie in der Spacer-Region. Durch den Austausch zu Glycin ist eine höhere Flexibilität des Bügels denkbar. Da es nur bei homologer Expression zu einer Reduzierung der Lipaseaktivität kommt, scheinen wirtsspezifische Einflüsse eine Rolle zu spielen. Da die detektierte Lipasemenge allerdings zur Positiv-Kontrolle vergleichbar ist, könnte dies erneut ein Hinweis darauf sein, dass nicht nur aktives Protein sekretiert wird.

Durch die Mutation an Position 341 wurde das dort vorhandene Stoppcodon TGA zum Triplet AGA verändert, welches für Arginin kodiert. Durch das fehlende Stoppcodon wird das Protein LipH um 67 AS verlängert, bis es zum Translationsabbruch durch ein für ein Stoppcodon kodierendes Basentriplett kommt (Abb. 3.7). Ein Blast der 67 AS zeigte keine Homologien zu bekannten Proteinen. Die Verlängerung des LipH um 67 AS bewirkt bei heterologer Expression eine Steigerung der Lipaseaktivität. Mit 35 % der WT-Lipaseaktivität ist die Aktivität der gemessenen LipH-Variante Stopp341R bei homologer Expression

allerdings deutlich reduziert. Laut Immunodetektion ist die Foldasemenge deutlich und die Lipase-Proteinmenge leicht verringert (Abb. 3.10).

Eine Art „cap-Funktion“ wäre denkbar, die bei heterologer Expression vor der Degradation durch cytoplasmatischer Proteasen schützt, im homologen Milieu jedoch keinen Schutz vor spezifischen *P. aeruginosa*-Proteasen, z.B. Prc und CtpA (Windgassen, 2000; Grützmaier, 2003), bietet. Im heterologen Wirt liegt die Foldase im Komplex mit der aktiven Lipase vor (Hobson *et al.*, 1993 und 1995). Dadurch, dass es hier zu einer Aktivitätssteigerung kommt, lässt sich der Schluss ziehen, dass die Foldase die Aktivität der Lipase im Komplex beeinflusst. Auch andere Chaperone beeinflussen die Aktivität ihres Enzym im Komplex, wie z.B. die Protease-Propeptide (Ihara *et al.*, 1995).

Interessanterweise bewirken beide AS-Austausche gemeinsam sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression eine Lipaseaktivitätssteigerung. Für die Einzelaustausche konnte dies in beiden Fällen nur bei der heterologen Expression beobachtet werden. Während die Aktivitätssteigerung der ep-LipH-Variante 3-49 bei heterologer Expression auf beiden Austauschen beruht, können bei homologer Expression nur beide Austausche vereint diese Aktivitätssteigerung bewirken, obwohl auch dort die Foldase einer stärkeren Degradation unterliegt.

Die ep-LipH-Variante 4-15, bestehend aus den Austauschen S48P und Q138R, weist bei heterologer Expression eine stark erhöhte Lipaseaktivität von ca. 560 % auf. Obwohl in der Immunodetektion eine erhöhte LipH-Menge im Vergleich zum WT nachgewiesen wurde, war die LipA-Menge nicht erhöht. Expressionsunterschiede der Lipase können also nicht Ursache für die Aktivitätssteigerung sein. Die homologe Expression bewirkt ebenfalls einen starken Anstieg der Lipaseaktivität auf ca. 775 %. Trotz deutlich reduzierter LipH-Menge, ist die Lipasemenge mit der WT-Proteinmenge vergleichbar (Abb.3.5).

Der Austausch von Serin zu Prolin an Position 48 bewirkt bei heterologer Expression eine starke Verringerung der Lipaseaktivität. Auch bei homologer Expression ist die Lipaseaktivität auf 8 % des WT-Niveaus reduziert. Die LipH-Proteinmenge ist dabei drastisch herabgesetzt; das LipA-Protein konnte nicht detektiert werden (Abb. 3.10).

Die Position 48 liegt im N-terminalen ersten Drittel. Obwohl die C-terminalen zwei Drittel als hinreichend für die Faltungsaktivität der Foldaseproteine identifiziert werden konnten, hat eine Mutation im ersten Drittel gravierenden Einfluss auf die Lipaseaktivität. Für die Lip-Proteine aus *P. aeruginosa* PAO1, *P. spec.* 109 und *B. glumae* (Schneidinger, 1997; Shibata *et al.*, 1998 b, El Khattabi *et al.*, 1999) wurde gezeigt, dass die Membranankersequenzen für

die Aktivierung der jeweiligen Lipasen nicht essentiell sind. Auch die Deletion großer Teile der variablen Domänen führte nicht zu einem Funktionsverlust der Lip-Proteine aus *P. aeruginosa* TE3285 und *B. cepacia* (Ihara *et al.*, 1995; Quyen *et al.*, 1999), wobei diese Aussagen allerdings auf Experimenten zur *in vitro*-Aktivierung von Lipasen beruhen. Ein Austausch im ersten N-terminalen Drittel hat allerdings *in vivo* Einfluss auf die Proteinestabilität und dadurch auf die Lipaseaktivität. Durch den Austausch zu Prolin wird die Position 48 mit einer AS mit ungeladener, unpolarer Seitenkette besetzt. Das berechnete Modell des LipAH-Komplexes beginnt erst bei AS 74, sodass keine Aussage über die Lage der Position 48 getroffen werden kann. Die Berechnung des Modells für *P. aeruginosa* beruht auf den Ergebnissen des Lipase-Foldase-Komplexes aus *B. glumae* (Pauwels *et al.*, 2005 und 2006). Dieser Bereich war in der Kristallstruktur nicht gut erkennbar, was auf eine hohe Beweglichkeit dieses Bereiches schließen lässt (K. Pauwels, Vrije Universiteit Brussel, Belgien, persönliche Mitteilung).

Auch der Austausch Q138R bewirkt sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression eine drastische Reduzierung der Lipaseaktivität. Bei homologer Expression ist die Aktivität der Lipase auf 21 % verringert. Obwohl die LipH-Menge nur unwesentlich reduziert ist, konnte deutlich weniger LipA-Protein im Überstand im Vergleich zum WT detektiert werden (Abb. 3.10).

Position 138 ist in mindestens zwei Familien konserviert. In Familie I ist diese Position in vier von fünf Fällen mit Glutamin, in der zweiten Familie in allen sieben Fällen mit Arginin besetzt. Trotzdem reduziert sich die Lipaseaktivität drastisch, wenn diese Position in der Familie I, der *P. aeruginosa*-Foldase, mit einem Arginin belegt wird. Betrachtet man die Lage der Position 138 im berechneten Modell, so liegt die AS in einer Helix. Ein potentieller Bindungspartner des AS-Austausches Arginin, Glutamat180, liegt in einem Peptidstrang in unmittelbarer Nähe. Die so entstehende Bindung hätte einen stabilisierenden Effekt auf diesen Bereich des Proteins. Die potentielle Stabilisierung wirkt sich allerdings negativ auf die Lipaseaktivität aus, was - anders als bei Foldasen der Familie II - auf eine nötige Flexibilität in diesem Bereich schließen lässt.

Im Gegensatz zur ep-LipH-Variante 4-15 mit einer um 560 % bzw. 775 % erhöhten Lipaseaktivität, zeigte keiner der Einzelaustausche sowohl unter heterologen als auch unter homologen Expressionsbedingungen eine Aktivitätserhöhung. Die Aktivitätssteigerung kann daher nur auf einem Zusammenspiel der beiden Austausche in der Variante 4-15 beruhen.

- **Erstmals konnte die Eigenschaft eines Enzyms über die gerichtete Evolution des Chaperons optimiert werden, was unter anderem in Rückfaltungsexperimenten mit aufgereinigtem Foldase- und Lipaseprotein gezeigt werden konnte.**
- **Fünf ep-LipH-Varianten zeigten sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression eine deutliche Lipase-Aktivitätssteigerung; Diese betrug zum Teil mehr als 800 %.**
- **Ep-LipH-Variante 1-16 deutet auf einen Multi-Turnover-Umsatz der Foldase hin. Bei vergleichbarer LipH-Menge ist die Menge an Lipase deutlich erhöht.**
- **A103, als Bestandteil des konservierten Motivs, ist vermutlich direkt an der Interaktion zwischen Lipase und Foldase beteiligt.**
- **A282V bewirkte trotz vergleichbarer Proteinmengen einen deutlichen Anstieg der Lipaseaktivität, was auf einen erhöhten Anteil aktiver Lipase schließen lässt. Wird somit auch inaktives Protein über den TypII-Weg sekretiert?**
- **LipH scheint die Aktivität der Lipase im Komplex zu beeinflussen.**
- **Eine Verlängerung der Foldase um 67 AS bewirkt heterolog eine Erhöhung der Lipaseaktivität.**
- **Mutationen im N-Terminus haben einen Einfluss auf die Lipaseaktivität.**

4.7 *In vitro*-Charakterisierung der ep-LipH-Variante 3-49

Die Abläufe in einer Zelle sind nie getrennt voneinander zu betrachten. Vielmehr kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Faktoren den zu beobachtenden Prozess bzw. die Reaktion beeinflussen. Für die Produktion enzymatisch aktiver Lipase bedarf es mehr als 30 verschiedener zellulärer Proteine, wodurch die Komplexität veranschaulicht wird (Rosenau & Jaeger, 2000). Um dennoch die isolierte Betrachtung eines bestimmten Prozesses zu ermöglichen, können die beteiligten Proteine aufgereinigt und in *in vitro*-Experimenten analysiert werden.

Einige der eingeführten Einzelaustausche bewirkten bei heterologer Expression eine Steigerung, unter homologen Expressionsbedingungen allerdings eine deutliche Reduzierung der Lipaseaktivität. Um den Einfluss wirtsspezifischer Faktoren auf diese Unterschiede auszuschließen, wurde die LipH-Variante V232G und die verlängerte LipH-Variante Stopp341R überexprimiert, aufgereinigt und in *in vitro*-Experimenten analysiert. Zusätzlich wurde die ep-LipH-Variante 3-49 überexprimiert und aufgereinigt, da sie beide Austausche enthält und sowohl bei heterologer als auch bei homologer Expression eine Steigerung der Lipaseaktivität bewirkt.

In einem ersten Versuch wurden die aufgereinigten Foldase-Varianten für die *in vitro*-Renaturierung der Lipase eingesetzt. Es ist nicht bekannt, in welchem Faltungszustand sich die Lipase *in vivo* befindet, wenn sie im Periplasma der Zelle durch das LipH-Protein gefaltet

wird. Sich in dem „nah nativen“ Zustand befindendes LipA kann mit einer Ausbeute von etwa 25 % in den nativen Zustand gebracht werden (Seuter, 1998). Die Renaturierung erfolgte dabei mit äquimolaren Mengen von Lipase und Foldase.

Dabei zeigten die LipH-Varianten V232G und Stopp341R eine deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich zur WT-Variante und bestätigten unter den vorliegenden „isolierten“ *in vitro*-Bedingungen das Ergebnis der Lipaseaktivierung unter heterologer Expression. Die in der homologen Expression beobachtete reduzierte Aktivierung konnte nicht bestätigt werden. Die ep-LipH-Variante 3-49, die beide Austausche vereint, zeigte ebenfalls eine erhöhte Aktivität der Lipase. Darüber hinaus wurden die Varianten auf Unterschiede in der Komplex-Bildung hin analysiert. Studien haben klar gezeigt, dass die Foldase und die dazugehörige Lipase *in vitro* einen stabilen Komplex formen (El Khattabi *et al.*, 2000; Hobson *et al.*, 1995; Shibata *et al.*, 1998). Alle Varianten wiesen jedoch die von der Positiv-Kontrolle bekannte Komplexbildung auf, sodass es zu keiner Veränderung der Lipaseaktivität durch einen Multi-Turnover-Umsatz kam. Sämtliche Varianten zeigten im Eluat den Hauptanteil der vorhandenen Lipaseaktivität. Auch die ermittelte Gesamtaktivität der Interaktionsansätze stimmt mit den Daten aus der LipA-Renaturierung überein. Alle drei Varianten wiesen eine erhöhte Lipaseaktivität auf. Die Frage, weshalb es durch die LipH-Varianten V232G und Stopp341R unter *in vivo*-Bedingungen im homologen Wirt nur zu einer reduzierten Lipaseaktivität kam, konnte nicht gänzlich geklärt werden, allerdings müssen wirtsspezifische Faktoren eine Rolle spielen.

Die verbesserte Aktivierung der Lipase LipA aus *P. aeruginosa* im heterologen Wirt *E. coli* sowie in *in vitro*-Experimenten ist von biotechnologischem Interesse, da Lipasen eine der wichtigsten Klassen von Enzymen darstellen, die in der synthetischen organischen Chemie und Biotechnologie verwendet werden (Jaeger & Reetz, 1998). Die Sicherheitsanforderungen für gentechnische Arbeiten sind im Gentechnikgesetz und der dazugehörigen Verordnung geregelt. Demnach sind Bakterien einer von vier Sicherheitsstufen zugeordnet. *P. aeruginosa* ist als opportunistisch humanpathogenes Bakterium der Sicherheitsstufe S2 zugewiesen. Da mit der Gefahrenstufe auch die Sicherheitsanforderungen und somit die Restriktionen, denen der Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen unterliegt, steigen, ist die heterologe Expression der Lipase in einem nicht pathogenen Bakterium der Sicherheitsstufe S1 von Vorteil.

- **Die C-terminale Verlängerung der Foldase ermöglicht im heterologen Wirt *E. coli* sowie in *in vitro*-Experimenten eine verbesserte Aktivierung der Lipase, was gerade unter biotechnologischen Gesichtspunkten von Interesse ist.**

4.8 Die Spacer-Region hat eine Schlüsselfunktion

Über die analysierten ep-LipH-Varianten und die anschließend erstellten ortsspezifischen LipH-Mutanten konnten viele Austausche identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Lipaseaktivierung haben. Zwei interessante Austausche, V232G und Q242L, lagen in der sogenannten Spacer-Region vor. Diese Region trennt die beiden Minidomänen der Foldase und besteht aus den 23 AS 228-250. Laut berechnetem Modell und durchgeführter Strukturvorhersage stellt dieser Bereich ein ausgedehntes helikales Motiv dar, der in direktem Kontakt zur Lipase steht. Aufgrund des vorhandenen Alaninscans war es schnell möglich, diesen Bereich auf Veränderungen bezüglich der Lipaseaktivität hin zu analysieren.

Im homologen Wirt hatten die meisten eingebrachten Austausche in dieser Region keinen Einfluss auf die Lipaseaktivierung. Sie zeigten zum Großteil eine zur WT-Variante vergleichbare Lipaseaktivität. Lediglich zwei eingebrachte AS-Austausche erlaubten bei heterologer Expression keine Lipaseaktivierung, P234A und Q241A. Bei homologer Expression zeigten alle Varianten weiterhin Lipaseaktivität, wenn auch in ganz unterschiedlichem Ausmaß. Austausche, die eine Reduzierung der Lipaseaktivität bewirkten, waren dabei über die gesamte Spacer-Region verteilt und zum Teil zur Lipase aber auch zum Äußeren hin orientiert. Während die bereits untersuchte AS-Position 232 bei einem Austausch von Valin zu Glycin noch eine verringerte Lipaseaktivität aufwies, wurde die Lipaseaktivität im Vergleich zur Positiv-Kontrolle durch den Austausch zu Alanin auf 200 % gesteigert. Auf den ersten Blick unterscheiden sich Glycin und Alanin nicht wesentlich voneinander. Allerdings gibt es für jede AS eine Wahrscheinlichkeit, mit der ihr Rest generell in einer Helix vertreten ist, das sogenannte Helixpotential P_{α} . Liegt das Potential deutlich über 1, spricht man von „Helixbildnern“ und von „Helixbrechern“, wenn es deutlich kleiner ist (Schiffer & Edmundson, 1967; Chou & Fasman, 1978; Cohen & Parry, 1986; Kamtekar *et al.*, 1993). Die Position 232 ist mit Valin besetzt. Diese ist mit einem $P_{\alpha} = 1,14$ mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in einer Helix zu finden. Durch den Austausch zu Glycin reduzierte sich die Lipaseaktivität. Mit $P_{\alpha} = 0,53$ kommt Glycin eher nicht in einer Helix vor. Durch den Austausch zu Alanin erhöhte sich die Lipaseaktivität. Diese AS kommt mit einem $P_{\alpha} = 1,45$ deutlich wahrscheinlicher in einer Helix vor als Glycin, aber auch als Valin, was die Aktivitätssteigerung aufgrund der verbesserten Helixeigenschaften erklären könnte. Im Rahmen der Immunodetektion konnte für die Variante V232A eine vergleichbare Menge an LipH-Protein detektiert werden, allerdings eine deutlich erhöhte Lipase-Menge, was die Aktivitätssteigerung durch einen quantitativen Anstieg der Lipase im Kulturüberstand erklärt.

Auffällig ist, dass beide Austausche, die unter heterologer Expression keine Lipaseaktivierung erlaubten, unter homologer Expression eine Aktivitätssteigerung der Lipase bewirkten. Im Fall der LipH-Variante P234A auf 186 % und im Fall der Variante Q241A sogar auf 345 %.

Die Position 241 der Foldase ist nicht konserviert, allerdings ist Glutamin in diesem Bereich häufig und mehrfach vertreten. Die erhöhte Lipaseaktivität konnte auf eine deutliche Erhöhung der Proteinmengen zurückgeführt werden. Degradationsunterschiede der Foldase könnten eine Erklärung für die erhöhte Foldasemenge darstellen und die erhöhte Lipasemenge ein weiterer Hinweis auf den Mehrfach-Umsatz der Lipase durch die Foldase sein. Eine an dieser Position durchgeführte Sättigungsmutagenese ließ lediglich in sechs weiteren Fällen eine Aktivierung der Lipase zu. Dies waren die AS-Austausche zu Asparagin, Aspartat, Histidin, Methionin, Phenylalanin und Threonin. Dabei zeigten drei Austausche, Asparagin, Aspartat und Histidin nahezu Lipaseaktivität in Höhe der Positiv-Kontrolle. Die bereits zuvor analysierten Austausche zu Alanin und Threonin zeigten eine erhöhte Lipaseaktivität und die Austausche zu Methionin und Phenylalanin eine deutlich reduzierte Aktivität.

Interessant ist die Position 234, die mit Prolin besetzt ist. Das Vorkommen von Prolin als „Helixbrecher“ in einer Helix ist eher untypisch. Dennoch ist diese Position in vier von fünf Fällen in der Familie I mit einem Prolin besetzt. Da es sich um ein dynamisches System handelt, könnte dieser Bereich zwei Zustandsformen annehmen. Besteht kein Kontakt zur Lipase, bewirkt Prolin an der Position 234 einen „Turn“ des Peptidstrangs. Kommt es jedoch zur Interaktion mit der Lipase, so wird Prolin in die Helix eingefügt und drückt die Lipase durch diese Strukturänderung in die aktive Form. In CD-Spektroskopie-Analysen konnte gezeigt werden, dass es durch die Interaktion der Foldase mit der Lipase zu einem Anstieg an α -helikalen Strukturen kommt (El Khattabi *et al.*, 1999). Aktuell wird davon ausgegangen, dass die Foldase substanzielle Veränderungen in der Sekundär- sowie in der Tertiärstruktur durchläuft, wenn es zur Komplexbildung mit der Lipase kommt (Pauwels *et al.*, 2006). Diese finden vermutlich überwiegend in der Spacer-Region statt, wo sich α -Helices bilden und so die Faltungsplattform komplettieren (Abb. 4.2).

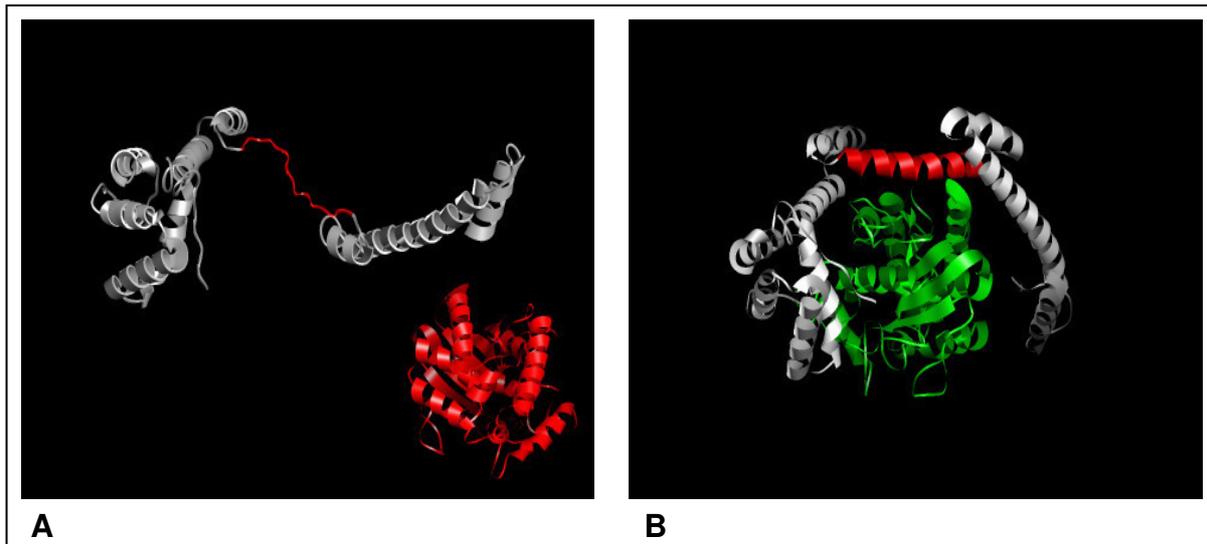


Abb. 4.2: 3D-Strukturmodell der Komplexbildung der Foldase mit der Lipase. Vor der Interaktion der Foldase (grau abgebildet) mit der inaktiven Lipase (rot abgebildet) ist die Spacer-Region (roter Bereich in der Foldase) in einer „relaxierten“ Zustandsform (A). Durch den Kontakt zur Lipase kommt es zu Veränderungen in der Sekundär- sowie in der Tertiärstruktur der Foldase. In der Spacer-Region kommt es zur Ausbildung einer Helix, wodurch die inaktive Lipase in ihre aktive Zustandsform (grün markiert) „gedrückt“ wird (B).

Aufgrund dessen wurde an dieser Position eine Sättigungsmutagenese durchgeführt, um zu analysieren, welchen Einfluss andere AS an dieser Position auf die Lipaseaktivierung haben. Lediglich drei weitere AS-Austausche ermöglichten weiterhin eine Aktivierung der Lipase, Glutamin, Histidin und Methionin. Dies war im Gegensatz zu Alanin jedoch sowohl bei homologer als auch heterologer Expression der Fall. Alle vier AS haben einen Helixpotential > 1 und kommen daher mit großer Wahrscheinlichkeit in einer Helix vor (Schiffer & Edmundson, 1967; Chou & Fasman, 1978; Cohen & Parry, 1986; Kamtekar *et al.*, 1993). Bis auf Methionin bewirken die anderen drei AS eine Steigerung der Lipaseaktivität im Verhältnis zur Wt-Variante. Maximal vier AS (unter homologen Expressionsbedingungen) ermöglichen weiterhin eine Aktivierung der Lipase, was ein Hinweis auf die Relevanz dieser Position sein könnte. Der Austausch gegen Helix-typische AS bewirkte in drei Fällen eine Verbesserung der Lipaseaktivität im Gegensatz zu Prolin, was darauf hindeuten könnte, dass die vorhergesagte Helixstruktur zur Aktivierung der Lipase nötig ist. Da Prolin dafür zwangsläufig in die Helix-Struktur eingefügt werden muss, scheinen zwei Zustandsformen dieses Bereiches wahrscheinlich zu sein.

- **Austausche in der Spacer-Region weisen auf eine Beteiligung an der Lipaseaktivierung und eventuell der Sekretion hin.**
- **Prolin234 scheint dabei eine Schlüsselfunktion einzunehmen.**

4.9 Austausch im N-Terminus beeinflussen die Lipaseaktivität

Der Austausch einzelner AS hatte in den untersuchten LipH-Varianten oftmals einen gravierenden Einfluss auf die Lipaseaktivität. Der Bereich der Spacer-Region AS 228-250 wurde aufgrund des Austausches V232G genauer untersucht. Wie im Rahmen des Screenings der ep-LipH-Bank gezeigt werden konnte, hatte der AS-Austausch S48P im N-terminalen Bereich des LipH einen Einfluss auf die LipH-Funktion. Da dieser Austausch im N-Terminus eine drastische Reduzierung der Lipaseaktivität zur Folge hatte, wurde die LipH-Variante S48P überexprimiert, aufgereinigt und in *in vitro*-Experimenten analysiert. Bislang wurde eine Beteiligung dieses Bereiches an der Lipaseaktivierung nicht angenommen, da N-terminal verkürzte Foldase-Varianten weiterhin die Aktivierung der Lipase ermöglichen (Shibata *et al.*, 1998; Quyen *et al.*, 1999).

In der *in vitro*-Renaturierung der Lipase LipA aus *P. aeruginosa* zeigte die Variante S48P jedoch eine zur WT-Variante vergleichbare Lipaseaktivität. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Foldase frei oder über Ni-NTA Magnetic Agarose Beads immobilisiert vorlag. Auch die Komplexbildung zwischen Foldase und Lipase war nicht verändert, was in Interaktionsversuchen gezeigt werden konnte. Unter *in vivo*-Bedingungen war die Foldasevariante sehr instabil, was unter *in vitro*-Bedingungen nicht gezeigt werden konnte. Eine verstärkte Degradation der Foldase durch periplasmatische Proteasen ist daher wahrscheinlich.

Anhand vorhandener Konstrukte des Alaninscans wurde untersucht, ob auch andere AS-Austausche im N-terminalen Bereich von AS 22-69 des Foldaseproteins einen Einfluss auf die Lipase-Aktivierung haben. Die meisten LipH-Varianten in diesem Bereich wiesen mit Lipaseaktivitäten zwischen 80 % und 106 % das Niveau der WT-Variante auf. Die Austausche G39A, S48A, E51A, M59A, K62A, L66A und S69A zeigten allerdings deutlich verringerte Lipaseaktivitäten zwischen 9 % und 28 %. Dabei waren lediglich die Positionen 66 und 69 konserviert. Erneut konnten Positionen im N-terminalen Drittel des LipH-Proteins identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Lipaseaktivität haben. Werden diese Positionen gegen Alanin ausgetauscht, so kommt es zu einer stark reduzierten Sekretion der Lipase in das Medium und infolge dessen zu einer drastisch verringerten Lipaseaktivität. Zwei dieser LipH-Varianten, LipH G39A und E51A, konnten aufgereinigt und so in *in vitro*-Experimenten detailliert analysiert werden. Während die LipH-Variante E51A unter frei vorliegenden Bedingungen in der Renaturierung mit 105 % keine deutlichen Unterschiede zur Positiv-Kontrolle zeigte, wies die Variante G39A hingegen auch in der *in vitro*-Renaturierung eine

reduzierte Lipaseaktivität von 44 % auf. In sich anschließenden Interaktionsversuchen zwischen Foldase und Lipase zeigten beide Varianten keine Unterschiede in der Komplexbildung. Während dieses Versuches lagen die LipH-Varianten allerdings immobilisiert vor. In beiden Fällen kam es zu einer Veränderung der Gesamtlipaseaktivität im Vergleich zur WT-Variante. Lag die LipH-Variante G39A immobilisiert vor, so reduzierte sich die Lipaseaktivität im Vergleich zur Positiv-Kontrolle auf 14 %, was in etwa der unter *in vivo*-Bedingungen ermittelten Lipaseaktivität von 9 % entspricht. Zeigte die LipH-Variante E51A unter frei vorliegenden Bedingungen in der Lipaseaktivität noch das Niveau der WT-Variante, war diese unter den hier vorliegenden immobilisierten Bedingungen auf 55 % reduziert.

Während man im Fall von LipH G39A von einer generell erschwerten Bindefähigkeit zur Lipase LipA sprechen muss, ist die Affinität der LipH-Variante E51A nur im immobilisierten Zustand erschwert. Der Austausch von Glutamat zu Alanin an Position 51 bewirkt eine Strukturveränderung, die nur bei gebundenem LipH zum Tragen kommt. Der Austausch von Glycin zu Alanin an Position 39 hingegen hat eine generelle Veränderung in der Lipaseaktivierung zur Folge.

- **AS-Austausche im N-Terminus der Foldase haben einen Einfluß auf die Lipaseaktivität.**
- **Eine reduzierte Lipaseaktivität im homologen Wirt ist in vielen Fällen bedingt durch eine fehlende Sekretion der Lipase.**
- **In *in vitro*-Versuchen zeigten aufgereinigte N-terminale LipH-Varianten ebenfalls eine reduzierte Lipaseaktivierung.**

4.10 Korrekte Lokalisierung der Foldase ist die Voraussetzung für eine effiziente Sekretion der Lipase

Seit nunmehr zehn Jahren ist bekannt, dass die C-terminalen zwei Drittel für die Faltungsaktivität der Foldase genügen. Für die Foldasen aus *P. aeruginosa* PAO1, *P. spec.* 109 und *B. glumae* (Schneidinger, 1997; Shibata *et al.*, 1998b; El Khattabi *et al.*, 1999) wurde festgestellt, dass die Membranankersequenzen für die Aktivierung der jeweiligen Lipasen nicht von Nöten sind. Auch die Deletion großer Teile der variablen Domäne führte nicht zu einem Funktionsverlust verschiedener Lip-Proteine (Ihara *et al.*, 1995; Quyen *et al.*, 1999), wobei diese Aussagen jedoch auf *in vitro*-Experimenten zur Aktivierung von Lipasen beruhen. Allerdings hatten verschiedene Mutationen im N-terminalen Bereich sowohl in *in*

vivo- als auch in sich anschließenden *in vitro*-Experimenten einen Einfluss auf die Lipaseaktivierung. Eine in dieser Arbeit hervorgerufene Deletion des N-Terminus der Foldase LipH aus *P. aeruginosa* PAO1 um 63 AS ermöglichte ebenfalls weiterhin die Lipaseaktivierung. Erstaunlicherweise war eine Lipaseaktivierung nicht nur möglich, vielmehr wurde im Renaturierungsansatz der verkürzten Foldase eine 172 % Lipaseaktivität im Verhältnis zur WT-Variante ermittelt. Bereits für die Foldase LipB aus *P. aeruginosa* TE3285 wurde gezeigt, dass der N-Terminus die *in vitro*-Renaturierungsaktivität inhibiert und die N-terminale Verkürzung in einem Anstieg der renaturierten Lipase resultiert (Shibata *et al.*, 1998 b). Es stellt sich daher die Frage, ob der N-Terminus daher möglicherweise nur dazu dient, die C-terminale Domäne mit ausreichendem Abstand zu der inneren Membran zum Periplasma hin zu orientieren (Rosenau *et al.*, 2004). Um herauszufinden, ob dieser Bereich nur als „Abstandshalter“ fungiert, der eine Komplexbildung mit der Lipase ermöglichen soll, wurde die verkürzte LipH-Variante über die bereits angewendeten Ni-NTA Magnetic Agarose Beads immobilisiert und anschließend mit der Lipase inkubiert. Die Komplexbildung entsprach weiterhin der der WT-Variante, sodass auch bei der Immobilisierung der verkürzten LipH-Variante eine Interaktion mit der Lipase möglich war. Die Notwendigkeit der 63 N-terminalen AS als „Abstandshalter“ war somit nicht gegeben. Die Immobilisierung der verkürzten LipH-Variante bewirkte im Gegensatz zur *in vitro*-Renaturierung allerdings eine Reduzierung der Lipaseaktivität auf das Niveau der Positiv-Kontrolle. Eine verbesserte Aktivierung der Lipase war somit nicht mehr zu beobachten. Vermutlich ist die Komplexbildung der frei vorliegenden verkürzten Foldase gegenüber der nativen Foldase mit der Lipase erleichtert, sodass die Wahrscheinlichkeit einer Komplexbildung unter äquimolaren Bedingungen im Renaturierungsansatz erhöht wird. Daher wurden weitere *in vitro*-Renaturierungsversuche durchgeführt. Dazu wurden – abgesehen von den üblichen äquimolaren Konzentrationen – die Konzentrationen der Komplexpartner variiert. Neben dem 1:1-Verhältnis wurde in Renaturierungsversuchen ein 2:1- bzw 1:2-Verhältnis der Foldase und Lipase eingestellt. Weiterhin war eine erhöhte Lipaseaktivität in den Renaturierungsansätzen der verkürzten Foldase zu beobachten. Durch eine Erhöhung der Foldasekonzentration auf ein 2:1-Verhältnis konnte allerdings weder im LipH-Renaturierungsansatz noch im verkürzten LipH-Renaturierungsansatz eine Steigerung der Lipaseaktivität erzielt werden. Wurde allerdings die Lipasekonzentration auf ein 2:1-Verhältnis erhöht, so konnte im LipH-Renaturierungsansatz die Aktivität der Lipase auf 129 % erhöht werden. Im Fall des verkürzten LipH-Renaturierungsansatzes erfolgte die Erhöhung sogar auf 319 %, was angesichts der ohnehin erhöhten Lipaseaktivität im

verkürzten LipH-Renaturierungsansatz einer Steigerung auf 164 % entspricht. Durch die Erhöhung der Lipasekonzentration stieg die Wahrscheinlichkeit, dass ein Foldaseprotein auf ein Lipaseprotein trifft und diese einen Komplex bilden. Eine zusätzliche Erhöhung der Lipaseaktivität im verkürzten LipH-Renaturierungsansatz deutet auf einen Multi-Turnover-Umsatz hin, wobei hier jedoch eher die intrinsische Fähigkeit der verkürzten Foldase, Lipase zu falten, höher zu sein scheint. Dadurch wird, vermutlich durch eine verbesserte Interaktion, mehr der vorhandenen Lipase umgesetzt. Durch die N-terminale Verkürzung konnte die Lipaseaktivierung im Vergleich zur WT-Variante verbessert werden. Da der N-Terminus nicht als „Abstandshalter“ für eine Interaktion mit der Lipase erforderlich ist, ist eine Lokalisierung der Spezifität gegenüber der Lipase in diesem Bereich denkbar. Foldasen aus nah verwandten Arten können sich gegenseitig ersetzen. So kann die Lipase aus *P. alcaligenes* durch die Foldase aus *P. aeruginosa*, beides Vertreter der Familie I, aktiviert werden (El Khattabi *et al.*, 1999), die Lipase aus *B. glumae*, Vertreter der Familie II, allerdings nicht (Shibata *et al.*, 1998; Janosch, 2002). Um Unterschiede in der Spezifität der verkürzten Foldase gegenüber der nativen Foldase zu ermitteln, wurden Renaturierungsversuche mit den aufgereinigten Lipasen aus *P. alcaligenes* und *B. glumae* durchgeführt. Wie zu erwarten war, ermöglichten beide Foldasen eine Renaturierung und damit Aktivierung der *P. alcaligenes*-Lipase. Dabei zeigte der Renaturierungsansatz der verkürzten LipH-Variante erneut eine deutlich erhöhte Lipaseaktivität; 248 % im Vergleich zum nativen LipH-Ansatz. Während der Renaturierungsansatz der verkürzte Foldase mit der *P. aeruginosa* Lipase „nur“ eine Erhöhung der Lipaseaktivität auf 172 % im Vergleich zur WT-Variante zeigte, wies der *P. alcaligenes*-Renaturierungsansatz sogar eine auf 248 % erhöhte Lipaseaktivität im Vergleich zum WT auf. Eine Aktivierung der *B. glumae*-Lipase war jedoch weder durch die native noch durch die verkürzte Foldase möglich, sodass der N-Terminus bezüglich der Spezifität keinen erkennbaren Einfluss hat.

In Renaturierungsversuchen zeigten die Ansätze der verkürzten Foldase immer eine erhöhte Lipaseaktivität im Vergleich zur nativen Foldase. *In vitro* bewirkte eine Immobilisierung einen Rückgang der Lipaseaktivität im verkürzten LipH-Renaturierungsansatz auf das Niveau des nativen LipH-Renaturierungsansatzes. Fraglich war daher, wie sich die Verkürzung der Foldase auf die Aktivierung der Lipase im homologen Wirt *P. aeruginosa* auswirkt. Dort wird die native Foldase durch den Membrananker in der inneren Membran verankert und das gesamte Protein zum Periplasma exponiert (Frenken *et al.*, 1993; Schneidinger, 1997). Schon lange ist eine Beteiligung der Foldase an der Sekretion im Gespräch. Der N-Terminus würde somit nicht als „Abstandshalter“ benötigt, um die Interaktion mit der Lipase zu ermöglichen,

sondern er würde vielmehr als flexibler „Abstandshalter“ die Ausrichtung der Foldase vermitteln, um eine Interaktion mit der TypII-Sekretionsmaschinerie zu ermöglichen (Filloux, 2004; Pauwels *et al.*, 2006). Auch andere sterische Chaperone wie die PapD-artigen Chaperone aus *E. coli*, die am Pilus-Aufbau beteiligt sind, sind durch die Interaktion mit der Translokations-Pore an der Translokation ihres Partners beteiligt (Barnhart *et al.*, 2003). Zudem ist eine weitere Funktion der Foldase zusätzlich zu der Lipasefaltung wahrscheinlich. Durch einen einzigen AS-Austausch war die Lipase aus *P. aeruginosa* sp.-Stamm KFCC10818 in der Lage, sich selbst in eine enzymatisch aktive Form zu falten (Kim *et al.*, 2001). Die Möglichkeit einer solchen Selbstaktivierung hätte sich im Laufe der Evolution vermutlich durchgesetzt, da eine Foldase-unabhängige Faltung der Lipase für die Zelle von Vorteil ist.

Um eine Immobilisierung der verkürzten Foldase im homologen Wirt zu erlangen, musste allerdings der Membrananker angefügt werden. Dazu wurden die 21 AS synthetisch hergestellt und über Schnittstellen vor das verkürzte *lipH*-Gen kloniert. Die Verkürzung der Foldase belief sich nun auf 42 AS, die AS 22-63. Nach der gewohnten Expression wurde die Lipaseaktivität des Überstandes bestimmt. Dabei zeigte die verkürzte LipH-Variante keine Lipaseaktivität. Die Expression und Lokalisation der verkürzten Foldase in der inneren Membran wurde immunologisch nachgewiesen. Wurde die Lipaseaktivität des GZE bestimmt, so zeigte die Anzucht der verkürzten Foldase Lipaseaktivität. Auch auf den entsprechenden Indikatorplatten konnte eine Lipaseaktivität detektiert werden. Allerdings nicht nach der üblichen Inkubation für einen Tag, sondern nach den bei heterologer Expression üblichen drei Tagen. Dort ist die Bestimmung der Lipaseaktivität aufgrund des fehlenden Sekretionssystems erst nach der beginnenden Lyse der Zelle bzw. nach der Diffusion des Tributyrins in die Zelle möglich.

Da sowohl die Expression als auch die korrekte Lokalisation der verkürzten Foldase nachgewiesen werden konnte und darüber hinaus periplasmatisch ein aktiver Komplex aus Lipase und verkürzter Foldase vorlag (vergleiche Kapitel 3.8.6), muss der N-Terminus die Funktion haben, die Foldase korrekt zu positionieren und so eine Interaktion mit der Sekretionsmaschinerie zu ermöglichen. Neben der bekannten Funktion der Lipasefaltung konnte so die direkte Beteiligung an der Vermittlung der Sekretion nachgewiesen werden.

- Obwohl Austausche im N-Terminus in einer reduzierten Lipaseaktivität resultieren, ist die N-terminal verkürzte Foldase LipH weiterhin und sogar mit verbesserter Effizienz in der Lage, Lipase in *in vitro*-Versuchen zu renaturieren.
- Eine Immobilisierung der verkürzten Foldase erlaubt lediglich die Lipaseaktivierung im WT-Niveau.
- Der N-Terminus vermittelt nicht die Spezifität gegenüber artfremden Lipasen.
- Der N-Terminus ist Voraussetzung für die Sekretion aktiver Lipase über die TypII-Maschinerie.

4.11 Die Verteilung der AS-Austausche im LipH-Modell und deren Einflüsse

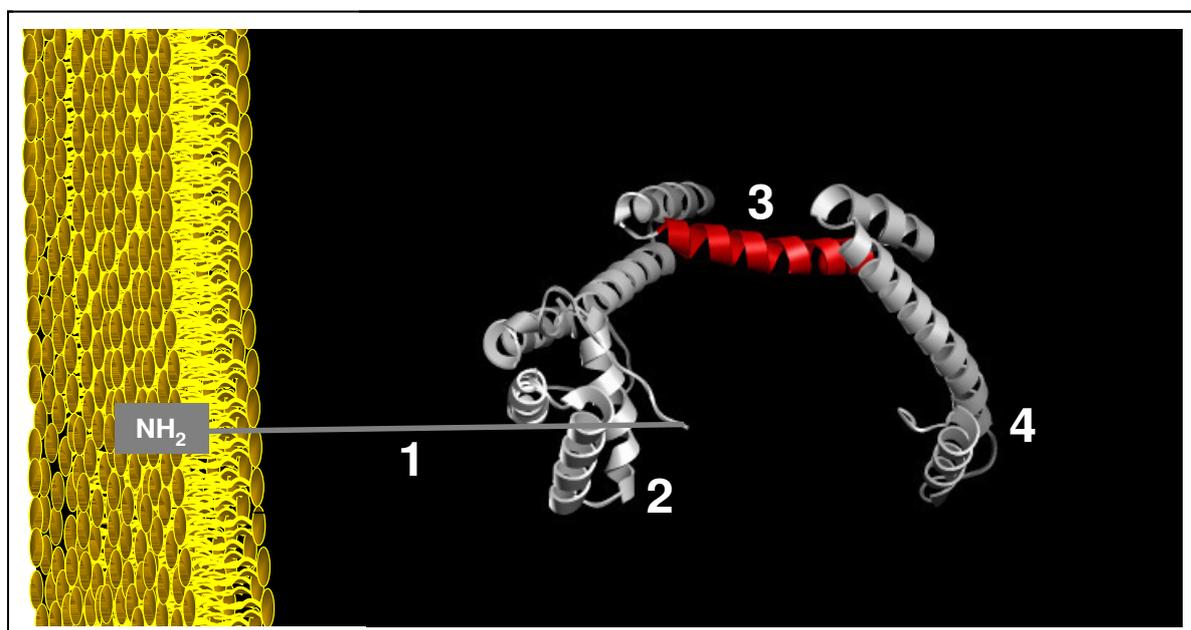


Abb. 4.3: Die Verteilung der AS-Austausche im LipH-Protein. Das Strukturmodell wurde zur Veranschaulichung schematisch um den N-Terminus erweitert, da dieser im Modell fehlt. Dies ermöglichte die bildliche Darstellung der Verankerung der Foldase (grau dargestellt) in der inneren Membran (gelb dargestellt).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Chaperons LipH aus *P. aeruginosa* einer *in vitro*-Evolution unterzogen. Dabei fanden verschiedene Methoden der „Directed Evolution“ Anwendung. Im sich anschließenden Screening konnten AS-Positionen im LipH identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Foldasefunktion hatten. Abb. 4.3 gibt anhand des Strukturmodells einen Überblick über die Verteilung der AS-Austausche im LipH-Protein.

„1“ markiert den N-Terminus des Proteins. Ihm wurde bislang lediglich die Funktion als Membrananker und „Abstandshalter“ für die Ermöglichung der Lipaseinteraktion zugesprochen. Eine eventuelle Vermittlung der Spezifität bei der Erkennung der zu faltenden Lipase durch den N-Terminus konnte in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden.

Über N-terminale AS-Austausche und eine N-terminale Verkürzung der Foldase konnte vielmehr gezeigt werden, dass ein intakter N-Terminus Voraussetzung für die Sekretion aktiver Lipase über die TypII-Maschinerie in *P. aeruginosa* ist.

„2“ kennzeichnet die erste Minidomäne, die auch das konservierte Motiv (R_x₁x₂FDY(F/C)L(S/T)A) (Rosenau *et al.*, 2004) beinhaltet. Alanin103 als Bestandteil des konservierten Motivs ist vermutlich direkt an der Interaktion zwischen Lipase und Foldase beteiligt. AS-Positionen in diesem Bereich, die an der Oberfläche lokalisiert sind, weisen auf eine Beteiligung an der Sekretion hin.

„3“ bezeichnet die Spacer-Region, die die zwei Minidomänen der Foldase räumlich trennt. Austausche in dieser Region weisen auf eine Beteiligung an der Lipaseaktivierung und möglicherweise sogar an der Sekretion hin. Dabei scheint die Position Prolin234 eine Schlüsselfunktion in der Lipaseaktivierung einzunehmen (vgl. Abb. 4.2).

„4“ kennzeichnet den C-Terminus, der die zweite Minidomäne der Foldase darstellt. Durch die Mutation des Stoppcodons kam es zu einer C-terminalen Verlängerung des Proteins um 67 AS. Die so verbesserte Lipaseaktivierung im heterologen Wirt sowie in *in vitro*-Versuchen ist von biotechnologischem Interesse. Eine Verkürzung der C-terminalen Minidomäne um 62 AS hingegen ließ lediglich eine 6 %ige Lipaseaktivierung im Vergleich zur WT-Variante zu. Die Austausche E313G und R327C weisen auf eine Interaktion des C-Terminus mit anderen Proteinen, eventuell mit der Xcp-Maschinerie, hin.

5. Zusammenfassung

Lipasen bilden eine der wichtigsten Klassen von Enzymen, die in der organischen Chemie und in der Biotechnologie verwendet werden. Sie finden z.B. Verwendung in der enantioselektiven Produktion von Alkoholen, Aminen und Carbonsäuren. Ein essentieller Schritt für die Produktion enzymatisch aktiver und in das extrazelluläre Medium sekretierter Lipase ist die periplasmatische Faltung durch sowohl spezifische als auch unspezifische Faltungsmediatoren. Die Foldase LipH aus *P. aeruginosa* stellt einen solchen spezifischen Faltungshelfer dar. Die molekularen Mechanismen, die der Faltungskatalyse durch die Lipase-spezifischen Foldasen zugrunde liegen, sind aktuell noch ebenso wenig geklärt wie die physiologische Bedeutung. Mit Hilfe der gerichteten Evolution, d.h. mit dem Einfügen von Mutationen in das entsprechende Gen und nachfolgendem Screening der entstandenen Proteinvarianten, sowie *in vitro*-Analysen ausgesuchter LipH-Varianten wurden Erkenntnisse gesammelt, die der Aufklärung von Struktur- und Funktionsbeziehungen der Foldase aus *P. aeruginosa* dienen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mit Hilfe der fehlerhaften PCR eine LipH-Variantenbank erstellt, die eine Größe von 797.760.000 Transformanten hat. Die Erstellung eines vollständigen Alaninscans sollte im Gegensatz zur zufällig generierte LipH-Variantenbank die Möglichkeit bieten, gezielt definierte Bereiche der Foldase auf ihre Funktion hin zu untersuchen. Letztendlich konnten mit 174 Konstrukten deutlich mehr als die Hälfte der gewünschten Einzelsubstitutionen amplifiziert und kloniert werden, ihre Anwendung in der detaillierten Analyse definierter Bereiche der Foldase finden und so zur Erweiterung des grundlegenden Verständnisses in der Proteinfaltung beitragen. Dieses Projekt sollte neben der Aufklärung von Struktur- und Funktionsbeziehungen nicht zuletzt auch einen neuen Ansatz der Optimierung eines Enzyms über die gerichtete Evolution des Chaperons darstellen.

Im sich anschließenden Screening konnten LipH-Varianten mit einem oder mehreren AS-Austauschen identifiziert werden, die zum einen eine deutliche Reduzierung, zum anderen aber auch eine drastische Steigerung der Lipaseaktivität bewirkten. Es war erstmals möglich, die Eigenschaft eines Enzyms über die gerichtete Evolution des Chaperons zu optimieren.

Im Hinblick auf Struktur- und Funktionsbeziehungen konnte gezeigt werden, dass Alanin103 als Bestandteil des konservierten Motivs (RX₁X₂FDY(F/C)L(S/T)A) vermutlich direkt an der Interaktion zwischen Lipase und Foldase beteiligt ist. Der Spacer-Region konnte - nicht zuletzt durch sich anschließende Sättigungsmutagenesen - eine wichtige Funktion in der

Lipaseaktivierung und eventuell sogar in der Sekretion zugesprochen werden. Dabei scheint die Position Prolin234 eine Schlüsselfunktion in der Lipaseaktivierung einzunehmen.

Eine C-terminale Verlängerung der Foldase um 67 AS hatte eine verbesserte Lipaseaktivierung im heterologen Wirt sowie in *in vitro*-Versuchen zur Folge und ist daher durchaus von biotechnologischem Interesse. Eine Verkürzung der C-terminalen Minidomäne um 62 AS hingegen verdeutlicht die Wichtigkeit dieser Region, da diese lediglich eine 6 %ige Lipaseaktivierung im Vergleich zur WT-Variante zuließ. Austausche im C-Terminus weisen auf eine Interaktion des C-Terminus mit anderen Proteinen, möglicherweise der Xcp-Maschinerie, hin.

Dem N-Terminus der Foldase wurde bislang lediglich die Funktion als Membrananker und „Abstandshalter“ für die Ermöglichung der Lipaseinteraktion zugesprochen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch über N-terminale AS-Austausche, eine N-terminale Verkürzung der Foldase sowie über sich anschließende *in vitro*-Versuche gezeigt werden, dass der N-Terminus Voraussetzung für die Sekretion aktiver Lipase über die TypII-Maschinerie ist.

6. Summary

Lipases represent one of the most important classes of enzymes applied in organic chemistry and biotechnology. They are used for the enantioselective production of alcohols, amines and carboxylic acids. An essential step for the production of enzymatically active secreted lipase is the periplasmatic folding mediated by specific and unspecific folding mediators. The *P. aeruginosa* foldase LipH is one of these specific folding catalysts. Directed evolution by the insertion of mutations in the gene and subsequent screening of the protein variants, as well as *in vitro* analysis of LipH variants contributed to an understanding of the structure-function-relationship of the *P. aeruginosa* foldase.

In the first part of this thesis, a LipH variant library was constructed by epPCR which had a size of 797.760.000 clones. An alaninescanning mutagenesis provides the opportunity to analyse defined regions of the foldase. 174 constructs, far more than the half of the desired singlesubstitutions, could be amplified and cloned. They can add to the general knowledge of protein folding. This project was supposed to be a new approach of optimisation of an enzyme by directed evolution of its chaperone.

In the following screening, foldase variants with one or more amino acid (aa) substitutions were identified, on the one hand causing a decrease and on the other hand causing an increase in lipase activity. For the first time, it was possible to optimise the features of an enzyme by directed evolution of its chaperone.

Concerning aspects of structure and function relationships it was shown that alanine103 as a part of the conserved motive (R_{x1}x₂FDY(F/C)L(S/T)A) is probably directly involved in the interaction between lipase and foldase. The following saturation mutagenesis revealed that the spacer-region has an important function in lipase activation and possibly even in secretion. Amino acid proline234 seems to have a key function in lipase activation.

A 67 aa C-terminal elongation of the foldase resulted in an improved lipase activation in the heterologous host as well as in *in vitro* experiments. From the biotechnological point of view this improvement is very interesting. However, the 62 aa truncation of the C-terminal mini-domain demonstrated the importance of this region, since it allowed only a 6 % lipase activity in comparison to the wild type variant.

C-terminal substitutions indicated an interaction of the C-terminal domain with other proteins, presumably of the Xcp-machinery.

Up to now, the N-terminal-domain of the foldase was regarded to function as a membrane anchor and a “spacer” enabling interaction with the lipase. In this thesis, N-terminal

substitutions, a N-terminal truncation of the foldase and *in vitro* experiments showed that the N-terminal-domain is necessary for the secretion of active lipase by the typeII-secretion machinery.

7. Literatur

- Aamand, J.L., Hobson, A.H., Buckley, C.M., Jorgensen, S.T., Diderichsen, B. & Mc Connel, D.J. (1994)**
Chaperone-mediated activation in vivo of a *Pseudomonas cepacia* lipase.
Mol. Gen. Genet. **245**: 556-564
- Airaksinen, A. & Hovi, T. (1998)**
Modified base compositions at degenerate positions of a mutagenic oligonucleotide enhance randomness in site-saturation mutagenesis.
Nucleic Acids Res. **26**: 576-581
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997)**
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
Nucleic Acids Res. **25**: 3389-3402
- Anfinsen, C.B. (1973)**
Principles that govern the folding of protein chains.
Science **181**: 223-230
- Arnol, F.H. (1996)**
Directed evolution: creating biocatalysts for the future.
Chem. Bioeng. Sci. **5**: 5091-5102
- Arnold, F.H. & Moore, J.C. (1997)**
Optimizing industrial enzymes by directed evolution.
Advances in Biochemical engineering and biotechnology **58**: 2-14
- Arpigny, J.L. & Jaeger, K.-E. (1999)**
Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties.
Biochem. J. **343**: 177-189
- Ashkenazi, A., Prest, L.G., Marsters, S.A., Camerato, T.R., Rosenthal, K.A., Fendly, B.M. & Capon, D.J. (1990)**
Mapping the CD4 binding site for human immunodeficiency virus by alanine-scanning mutagenesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 7150-7154
- Baker, D., Sohl, J.L. & Agard, D.A. (1992)**
A protein-folding reaction under kinetic control.
Nature **356(6366)**: 263-265
- Bardwell, J.C. (1994)**
Building bridges: disulphide bond formation in the cell.
Mol. Microbiol. **14(2)**: 199-205
- Barettino, D., Feigenbutz, M., Valcarcel, R. & Stunnenberg, H.G. (1994)**
Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis
Nucleic Acids Res. **22**: 541- 542
- Barnhart, M.M., Pinkner, J.S., Soto, G.E., Sauer, F.G., Langermann, S., Waksman, G., Frieden, C. & Hultgren, S.J. (2000)**
PapD-like chaperones provide the missing information for folding of pilin proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 7709-7714
- Barnhart, M.M., Sauer, F.G., Pinkner, J.S. & Hultgren, S.J. (2003)**
Chaperone-Subunit-Usher Interactions Required for Donor Strand Exchange during Bacterial Pilus Assembly.
J. Bacteriol. **185(9)**: 2723-2730
- Beckman, R.A., Mildvan, A.S. & Loeb, L.A. (1985)**
On the fidelity of DNA replication: Manganese mutagenesis *in vitro*.
Biochemistry **24**: 5810-5817
- Behrens, S. (2003)**
Periplasmic Chaperones - Preservers of Subunit Folding Energy for Organelle Assembly.
Cell **113(5)**: 556-557
- Bernard, P. & Couturier, M. (1992)**
Cell Killing by the F Plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of DNA-Topoisomerase II Complexes.
J. Mol. Biol. **226**: 735-745
- Bessler, C., Schmitt, J., Maurer, K.H. & Schmid, R.D. (2003)**
Directed evolution of a bacterial alpha amylase: toward enhanced pH performance and higher specific activity.
Protein Sci. **12**: 2141-2149
- Biles, B.D. & Connolly, B.A. (2004)**
Low fidelity *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase mutants useful in error-prone PCR.
Nucleic Acids Res. **32**: e176
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979)**
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. **7**: 1513-1523

- Bitter, W., Koster, M., Latijnhouwers, M., de Cock, H. & Tommassen, J. (1998)**
Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ, which are involved in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*.
Mol. Microbiol. **27**: 209-219
- Bloom, J.D., Meyer, M.M., Meinhold, P., Otey, C.R., MacMillan, D. & Arnold, F.H. (2005)**
Evolving strategies for enzyme engineering.
Curr. Opin. Struct. Biol. **15**: 447-452
- Bocola, M., Otte, N., Jaeger, K.E., Reetz, M.T. & Thiel, W. (2004)**
Learning from directed evolution: theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity.
ChemBioChem **5**: 214-223
- Bortoli-German, I., Brun, E., Py, B., Chippaux, M. & Barras, F. (1994)**
Periplasmic disulphide bond formation is essential for cellulase secretion by the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*.
Mol. Microbiol. **11**: 545-553
- Bradford, M.M. (1976)**
A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. **72**: 248-254
- Braun, P., Tommassen, J. & Filloux, A. (1996)**
Role of the propeptide in folding and secretion of elastase of *Pseudomonas aeruginosa*.
Mol. Microbiol. **19**: 297-306
- Braun, P. & Tommassen, J. (1998)**
Function of bacterial propeptides.
Trends Microbiol. **6**(1): 6-8
- Braun, P., Ockhuijsen, C., Eppens, E., Koster, M., Bitter, W. & Tommassen, J. (2001)**
Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Formation of the disulfide bonds.
J. Biol. Chem. **276**: 26030-26035
- Brok, R., van Gelder, P., Winterhalter, M., Ziese, U., Koster, A.J., de Cock, H., Koster, M.; Tommassen, J. & Bitter, W. (1999)**
The C-terminal domain of the *Pseudomonas* secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity.
J. Mol. Biol. **294**: 1169-1179
- Cadwell, R.C. & Joyce, G.F. (1992)**
Randomization of genes by PCR mutagenesis.
PCR Methods Appl. **2**: 28-33
- Chen, K. & Arnold, F.H. (1993)**
Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 5618-5622
- Cherry, J.R. & Fidantsef, A.L. (2003)**
Directed evolution of industrial enzymes: an update.
Curr. Opin. Biotechnol. **14**: 438-443
- Chihara-Siomi, M., Yoshikawa, K., Oshima-Hirayama, N., Yamamoto, K., Sogabe, Y., Nakatani, T., Nishioka, T. & Oda, J. (1992)**
Purification, molecular cloning, and expression of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*.
Arch. Biochem. Biophys. **296**: 505-513
- Cho, C.M., Mulchandani, A. & Chen, W. (2004)**
Altering the substrate specificity of organophosphorus hydrolase for enhanced hydrolysis of chlorpyrifos.
Appl. Environ. Microb. **70**: 4681-4685
- Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1978)**
Empirical predictions of protein conformation.
Ann. Rev. Biochem. **47**: 251-276
- Choudhury, D., Thompson, A., Sojanoff, V., Langermann, S., Pinkner, J., Hultgren, S.J. & Knight, S.D. (1999)**
X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*.
Science **285**(5430): 1061-1065
- Cirino, P.C., Mayer, K.M. & Omeno, D. (2003)**
Generating mutant libraries using errorprone PCR. Directed evolution library creation. Methods and protocols. Arnold, F.H. & Georgiou, G. (Eds.) Humana Press, New Jersey
- Cline, J. & Hogrefe, H. (2000)**
Randomize gene sequences with new PCR mutagenesis kit.
Strategies **13**: 157-162
- Coco, W.M., Encell, L.P., Levinson, W.E., Christ, M.J., Loomis, A.K., Licato, L.L., Arensdorf, J.J., Sica, N., Pienkos, P.T. & Monticello, D.J. (2002)**
Growth factor engineering by degenerate homoduplex gene family recombination.
Nat. Biotechnol. **20**: 1246-1250
- Cohen, C. & Parry, D.A.D. (1986)**
 α -Helical coiled-coils – a widespread motif in proteins.
Trends in Biochem. Sci. **11**: 245-248

- Collet, J.-F. & Bardwell, J.C. (2002)**
Oxidative protein folding in bacteria.
Mol. Microbiol. **44**(1): 1–8
- Cramer, A., Raillard, S.A., Bermudez, E. & Stemmer, W.P.C. (1998)**
DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution.
Nature **391**: 288–291
- Cunningham, B.C. & Wells, J.A. (1989)**
High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis.
Science **244**: 1081–1085
- Cunningham, E.L., Jaswal, S.S., Sohl, J.L. & Agard, D.A. (1999)**
Kinetic stability as a mechanism for protease longevity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**(20): 11008–11014
- Eckert, K.A. & Kunkel, T.A. (1990)**
High fidelity DNA synthesis by *Thermus aquaticus* DNA polymerase.
Nucleic Acids Res. **18**: 3739–3744
- Eggert, T., Reetz, M.T. & Jaeger, K.E. (2004)**
Directed evolution by random mutagenesis: a critical evaluation.
Enzyme functionality. Svenson, A. (Ed.) Marcel Dekker, New York
- Eggert, T., Funke, S.A., Rao, N.M., Acharya, P., Krumm, H., Reetz, M.T. & Jaeger, K.E. (2005)**
Multiplex-PCR-based recombination as a novel high-fidelity method for directed evolution.
ChemBioChem **6**: 1062–1067
- Eigen, M. (1984)**
The origin and evolution of life at the molecular level.
Adv. Chem. Phys. **55**: 119–137
- El Khattabi, M., Ockhuisen, C., Bitter, W., Jaeger, K.-E. & Tommassen J. (1999)**
Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane-anchor.
Mol. Gen. Genet. **261**: 770–776
- El Khattabi, M., Van Gelder, P., Bitter, W. & Tommassen, J. (2000)**
Role of the lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone.
J. Biol. Chem. **275**: 26885–26891
- El Khattabi, M. (2001)**
The lipase specific foldase of *Burkholderia glumae*.
Dissertation, Universität Utrecht, Niederlande
- El Khattabi, M., Van Gelder, P., Bitter, W. & Tommassen, J. (2003)**
Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase.
J. Mol. Catal. B: Enzymatic **22**: 329–338
- Ellis, R.J. (1998)**
Steric chaperones.
Trends Biochem. Sci. **23**(2): 43–45.
- Epstein, C. J., Goldberger, R. F. & Anfinsen, C. B. (1963)**
The genetic control of tertiary protein structure. Studies with model systems.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **28**: 439–446
- Feng, Z.P. & Zhang, C.T. (2000)**
Prediction of membrane protein types based on the hydrophobic index of amino acids.
J. Protein Chem. **19**(4): 269–75
- Filloux, A., Michel, G. & Bally, M. (1998)**
GSP-dependent protein secretion in Gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*.
FEMS Microbiol. Rev. **22**: 177–198
- Filloux, A. (2004)**
The underlying mechanisms of type II protein secretion.
Biochim. Biophys. Acta. **1694**(1-3): 163–179
- Frenken, L.G.J., Bos, J.W., Visser, C., Müller, W., Tommassen, J. & Verrips, C.T. (1993 a)**
An accessory gene, *lipB*, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase.
Mol. Microbiol. **9**: 579–589
- Frenken, L.G.J., de Groot, A., Tommassen, J. & Verrips, C.T. (1993 b)**
Role of *lipB* gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*.
Mol. Microbiol. **9**: 591–599
- Friedrich, G. (2001)**
Biochemische und physiologische Charakterisierung einer neuen Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa*.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- Georgescu, R., Geethani, B. & Sun, L. (2003)**
Saturation mutagenesis.
Directed Evolution Library Creation. Methods and Protocols. Arnold, F.H. & Georgiou, G. (Eds), Humana Press Inc., New Jersey

- Gerritse, G., Ure, R., Bizoullier, F. & Quax, W. (1998)**
The phenotype enhancement method identifies the Xcp outer membrane secretion machinery from *Pseudomonas alcaligenes* as a bottleneck for lipase production.
J. Biotechnol. **64**: 23-28
- Glieder, A., Farinas, E.T. & Arnold, F.H. (2002)**
Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase.
Nat. Biotech. **20**: 1135-1139
- Gomez, J.C.; Ventura, M.A., Goni, F.M. & Santiago, E. (1977)**
An index of protein hydrophobicity. Its application to membrane proteins.
Rev. Esp. Fisiol. **33(4)**: 337-340
- Greene, D.N., Whitney, S.M. & Matsumura I. (2007)**
Artificially evolved *Synechococcus* PCC6301 Rubisco variants exhibit improvements in folding and catalytic efficiency.
Biochem. J. Immediate Publication, doi: 10.1042/BJ20070071
- Grützmacher, S. (2003)**
Physiologische Charakterisierung des periplasmatischen, proteolytischen Systems aus *Pseudomonas aeruginosa*.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- Hanahan, D. (1983)**
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids
J. Mol. Biol. **166**: 557-580
- Hamood, A.N., Wick, M.J. & Iglewski, B.H. (1990)**
Secretion of toxin A from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, PAK, and PA103 by *Escherichia coli*.
Infect. Immun. **58**: 1133-1140
- Hancock, S.M., Vaughan, M.D. & Withers, S.G. (2006)**
Engineering of glycosidases and glycoltransferases.
Curr. Opin. Chem. Biol. **10**: 1-11
- Hardie, K.R., Schulze, A., Parker, M.W. & Buckley, J.T. (1995)**
Vibrio spp. secrete proaerolysin as a folded dimer without the need for disulphide bond formation.
Mol. Microbiol. **17**: 1035-1044
- Hartl, F.U. & Hayer-Hartl, M. (2002)**
Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein.
Science **295**: 1852-1858
- Hiraga, K. & Arnold, F.H. (2003)**
General method for sequence-independent site-directed mutagenesis.
J. Mol. Biol. **330**: 287-296
- Hobson, A.H., Buckley, C.M., Aamand, J.L., Jorgensen, S.T., Diderichsen, B. & McConnell, D.J. (1993)**
Activation of a bacterial lipase by its chaperone.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 5682-5686
- Hobson, A.H., Buckley, C.M., Jorgensen, S.T., Diderichsen, B. & McConnell, D.J. (1995)**
Interaction of *Pseudomonas cepacia* DSM3959 lipase with its chaperone, LimA.
J. Biochem. (Tokyo) **118**: 575-581
- Hughes, M.D., Nagel, D.A., Santos, A.F., Sutherland, A.J. & Hine, A.F. (2003)**
Removing the redundancy from randomized gene libraries.
J. Mol. Biol. **331**: 973-979
- Hung, D.L. & Hultgren, S.J. (1998)**
Pilus biogenesis via the chaperone/usher pathway: an integration of structure and function.
J. Struct. Biol. **124(2-3)**: 201-220
- Ihara F., Okamoto I., Nihira T., Yamada Y. (1992)**
Requirement in trans of the downstream *limL* gene for activation of lactonizing lipase from *Pseudomonas* sp. 109.
J. Ferment. Bioeng. **73**: 337-342
- Ihara, F., Okamoto, I., Akao, K., Nihira, T. & Yamada, Y. (1995)**
Lipase modulator protein (LimL) of *Pseudomonas* sp. Strain 109.
J. Bacteriol. **177**: 254- 258
- Iizumi, T., Nakamura, K., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y. & Fugase, T. (1991)**
Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a lipase and its activator genes from *Pseudomonas* sp. KWI-56.
Agric. Biol. Chem. **55**: 2349-2357
- Ivancic, M., Valinger, G., Gruber, K. & Schwab, H. (2007)**
Inverting enantioselectivity of *Burkholderia gladioli* esterase EstB by directed and designed evolution.
J. Biotechnol. **129(1)**: 109-122
- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M. & Misset, O. (1994)**
Bacterial lipases.
FEMS Microbiol. Rev. **15**: 29-63

- Jaeger, K.-E., Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., & Reetz, M.T. (1996)**
Biotechnological application of *Pseudomonas aeruginosa* lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **46**: 99-105
- Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Schimossek, K., Zonta, A. & Reetz, M.T. (1997)**
Bacterial lipases for biotechnological applications
J. Mol. Catal. B. **3**: 3-12
- Jaeger, K.-E. & Reetz, M.T. (1998)**
Microbial lipases form versatile tools for biotechnology.
Trends Biotechnol. **16**: 396-403
- Jaeger, K.-E., Dijkstra, B.W. & Reetz M.T. (1999)**
Bacterial biocatalysts: molecular biology, threedimensional structures, and biotechnological applications of lipases.
Annu. Rev. Microbiol. **53**: 315-351
- Jaeger, K.-E. & Eggert, T. (2002)**
Lipases for biotechnology.
Curr. Opin. Biotechnol. **13**: 390-397
- Jaeger, K.-E. & Eggert, T. (2004)**
Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution.
Curr. Opin. Biotechnol., **15**: 305–313
- Janosch, D. (2002)**
Untersuchungen zur *in vivo*- Aktivierung bakterieller Lipasen durch heterologe Foldasen.
Diplomarbeit, Ruhr- Universität Bochum
- Jaswal, S.S., Sohl, J.L., Davis, J.H. & Agard, D.A. (2002)**
Energetic landscape of alpha-lytic protease optimizes longevity through kinetic stability.
Nature **415(6869)**: 343- 346
- Johnson, T.L., Abendroth, J., Hol, W.G.J. & Sandkvist, M. (2006)**
Type II secretion: from structure to function
FEMS Microbiol. Lett. **255(2)**: 175-186
- Joly, J.C. Swartz, J.R. (1994)**
Protein folding activities of *Escherichia coli* protein disulfide isomerase
Biochemistry **33**: 4231-4236
- Jorgensen, S., Skov, K.W. & Diderichsen, B. (1991)**
Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes.
J. Bacteriol. **173**: 559-567
- Kamtekar, S., Schiffer, J.M., Xiong, H., Babik, J.M. & Hechtr, M.H. (1993)**
Protein design by binary patterning of polar and nonpolar aminoacids.
Science **262**: 1680-1685
- Kauffman, S. (1993)**
The origins of order: selforganization and selection in evolution.
Oxford University Press, New York
- Kim, D. & Guengerich, F.P. (2004)**
Selection of human cytochrome P450 1A2 mutants with enhanced catalytic activity for heterocyclic amine N-hydroxylation.
Biochemistry **43**: 981-988
- Kim, E.K., Jang, W.H., Ko, J.H, Kang, J.S., Noh, M.J. & Yoo, O.J. (2001)**
Lipase and its modulator from *Pseudomonas* sp. strain KFCC 10818: proline-to-glutamine substitution at position 112 induces formation of enzymatically active lipase in the absence of the modulator.
J. Bacteriol. **183**: 5937-5941
- Kok, R.G., Christoffels, V.M., Vosman, B. & Hellingwerf, K.J. (1993)**
Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: Cloning of a gene, encoding one of the esterases
J. Gen. Microbiol. **193**: 2329-2342
- Kok, R.G., van Thor, J.J., Nutgeren-Roodzant, I., Vosman, B. & Hellingwerf, K.J. (1995)**
Characterization of lipase-deficient mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: identification of a periplasmic lipase chaperone essential for the production of extracellular lipase.
J. Bacteriol. **177**: 3295-3307
- Koster, M., Bitter, W. & Tommassen, J. (2000)**
Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria.
Int. J. Med. Microbiol. **290**: 325-331
- Kumar, S., Chen, C.S., Waxman, D.J. & Halpert, J.R. (2005)**
Directed evolution of mammalian cytochrome P450 2B1: mutations outside of the active site enhance the metabolism of several substrates including the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide.
J. Biol. Chem. **280**: 19569-19575
- Laemmli, U.K. (1970)**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227**: 680-685

- Lee, N., Bessho, Y., Wei, K., Szostak, J.W. & Suga, H. (2000)**
Ribozymecatalyzed tRNA aminoacylation.
Nat. Struct. Biol. **7**: 28-33
- Lehtovaara, P.M., Koivula, A.K., Bamford, J. & Knowles, J.K.C. (1988)**
A new method for random mutagenesis of complete genes: Enzymatic generation of mutant libraries *in vitro*.
Prot. Eng. **2**: 63-68
- Leung, D.W., Chen, E. & Goeddel, D.V. (1989)**
A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction.
Technique **1**: 11-15
- Liao, X. & Wise, J.A. (1990)**
A simple high efficiency method for random mutagenesis of cloned genes using forced nucleotide misincorporation.
Gene **88**: 107-111
- Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., Jaeger, K.-E. (2000)**
Directed evolution of an enantioselective lipase.
Chem. Biol. **7**(9): 709-18.
- 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.
J. Bacteriol. **183**(2): 597-603
- Liese, A., Seelbach, K. & Wandrey, C.**
Industrial Biotransformations.
Wiley-VCH, Weinheim, 2000
- Lindner, P., Guth, B., Wuelfing, C., Krebber, C., Steipe, B., Mueller, F. & Plueckthun, A. (1992)**
Purification of native proteins from the cytoplasm and periplasm of *E. coli* using IMAC and Histidine tails: a comparison of proteins and protocols
Methods: a companion to methods in enzymology: **4**: 41-56
- Lu, H.M., Mizushima, S., & Lory, S. (1993)**
A periplasmic intermediate in the extracellular secretion pathway of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A.
J. Bacteriol. **175**: 7463-7467
- Lutz, S., Ostermeier, M. & Benkovic, S.J. (2001 a)**
Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using α -phosphothioate nucleotides.
Nucleic Acids Res. **29**: e16
- Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G.L. Maranas, C.D. & Benkovic, S.J. (2001 b)**
Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**: 11248-11253
- Ma, Q.H., Zhai, Y.F., Schneider, J.C., Ramseier, T.M. & Saier, M.H. (2003)**
Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P-fluorescens*.
Biochim. Biophys. Acta. **1611**: 223-233
- Mahan, S.D., Ireton, G.C., Knoeber, C., Stoddard, B.L. & Black, M.E. (2004)**
Random mutagenesis and selection of *Escherichia coli* cytosine deaminase for cancer gene therapy.
Protein Eng. Des. Sel. **17**: 625-633
- Martínez, A., Ostrovsky, P. & Nunn, D.N. (1999)**
LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components.
Mol. Mikrobiol. **34**: 317-326
- Miki, T., Park, J. A., Nagao, K., Murayama, N. & Horiuchi, T. (1992)**
Control of segregation of chromosomal DNA by sec factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress *letD* (*ccdB*) product growth inhibition.
J. Mol. Biol. **225**: 39-52
- Mills, D.R., Peterson, R.L., Spiegelman, S. (1967)**
An extracellular darwinian experiment with a self duplicating nucleic acid molecule.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **58**: 217-224
- Miyazaki, K., Wintrode, P.L., Grayling, R.A., Rubingh, D.N. & Arnold, F.H. (2000)**
Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme.
J. Mol. Biol. **297**: 1015-1026
- Moore, J.C. & Arnold, F.H. (1996)**
Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents.
Nature Biotechnol. **14**: 458-467
- Moore, J.C., Hua-Ming, J., Kucher, O. & Arnold, F.H. (1997)**
Strategies for the *in vitro* evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences.
J. Mol. Biol. **272**: 336-347
- Morrison, K.L. & Weiss, G.A. (2001)**
Combinatorial alanine-scanning.
Curr. Opin. Chem. Biol. **5**: 302-307

- Ness, J.E., Welch, M., Giver, L., Bueno, M., Cherry, J.R., Borchert, T.V., Stemmer, W.P.C. & Minshull, J. (1999)**
DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin.
Nat. Biotechnol. **17**: 893-896
- Ness, J.E., Kim, S., Gottmann, A., Pak, R., Krebber, A., Borchert, T.V., Govindarajan, S., Mundorff, E.C. & Minshull, J. (2002)**
Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently.
Nat. Biotechnol. **20**: 1251-1255
- Normark, S. (2000)**
Anfinsen comes out of the cage during assembly of the bacterial pilus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 7670-7672
- Ogierman, M.A., Fallarino, A., Riess, T., Willimas, S.G., Attridge, S.R. & Manning, P. (1997)**
Characterization of the *Vibrio cholerae* El Tor lipase operon *lipAB* and a protease gene downstream of the *hyl* region.
Microbiology **140**: 931-943
- O'Maille, P.E., Bakhtina, M. & Tsai, M.D. (2002)**
Structure-based combinatorial protein engineering (SCOPE).
J. Mol. Biol. **17**: 1205-1209
- Oshima-Hirayama N., Yoshikawa K., Nishioka T., Oda J. (1993)**
Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*: Production in *Escherichia coli* and activation in vitro with a protein from the downstream gene.
Eur. J. Biochem. **215**: 239-246
- Ostermeier, M., Shim, J.H. & Benkovic, S.J. (1999 a)**
A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology.
Nat. Biotechnol. **17**: 1205- 1209
- Ostermeier, M., Nixon, A.E., Shim, J.H. & Benkovic, S.J. (1999 b)**
Combinatorial protein engineering by incremental truncation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 3562-3567
- Pauwels, K., Loris, R., Vandebussche, G., Ruyschaert, J.-M., Wyns, L. & Van Geldern, P. (2005)**
Crystallization and crystal manipulation of a steric chaperone in complex with its lipase substrate.
Acta Cryst. **F61**: 791-795
- Pauwels, K., Lustig, A., Wyns, L., Tommassen, J., Savvides, S.N. & Van Geldern, P. (2006)**
Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate.
Nat. Struct. Mol. Biol. **13(4)**: 374-375
- Peterson, G.L. (1977)**
A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more general applicable.
Anal. Biochem. **83**: 346-356
- Petrounia, I.P. and Arnold, F.H. (2000)**
Designed evolution of enzymatic properties
Curr. Opin. Biotechnol. **11**: 325-330
- Pugsley, A.P. (1992)**
Translocation of a folded protein across the outer membran via the general secretory pathway in *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 12058-12062
- Quyen, D.T., Schmidt-Dannert, C. & Schmid R.D. (1999)**
High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding.
Appl. Environ. Microbiol. **65**: 787-794
- Raina, S. & Missiakas, D. (1997)**
Making and breaking disulfide bonds.
Annu. Rev. Microbiol. **51**:179-202
- Rariy, R.V. & Klibanov, A.M. (1997)**
Correct protein folding in glycerol.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 13520-13523
- Reetz, M.T. & Jaeger, K.-E. (2002)**
Directed evolution as a means to create enantioselective enzymes for use in organic chemistry.
Directed Molecular Evolution of Proteins (Eds.: Brakmann, S. & Johnson, K.) Wiley-VCH, Weinheim, 245-279
- Reetz, M.T. (2004)**
Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: Practical and theoretical ramifications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**: 5716-5722
- Reetz, M.T., Carballeira, J.D., Peyralans, J., Höbenreich, H., Maichele, A. & Vogel, A. (2006)**
Expanding the substrate scope of enzymes: combining mutations obtained by casting.
Chem. Eur. J. **12**: 6031-6038

- Reetz, M.T., Puls, M., Carballeira, J.D., Vogel, A., Jaeger, K.-E., Eggert, T., Thiel, W., Bocola, M. & Otte, N. (2007)**
Learning from Directed Evolution: Further Lessons from Theoretical Investigations into Cooperative Mutations in Lipase Enantioselectivity.
ChemBioChem. **8**(1): 106-112
- Roberts, B.L., Markland, W., Ley, A.C., Kent, R.B., White, D.W., Guterman, S.K., Ladner, R.C. (1992)**
Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 2429-2433
- Robertson, D.E. & Steer, B.A. (2004)**
Recent progress in biocatalyst discovery and optimization.
Curr. Opin. Chem. Biol. **8**: 141-149
- Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2000)**
Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion.
Biochimie **82**: 1023- 1032
- Rosenau, F., Tommassen, J. & Jaeger, K.-E. (2004)**
Lipase-Specific Foldase.
ChemBioChem. **5**: 152-161
- Rost, B. & Sander, C. (1993)**
Prediction of protein structure at better than 70% accuracy.
J. Mol. Biol. **232**: 584-599
- Saiki, R.K., Gelfand, H.D., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A. (1988)**
Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase
Science **239**: 487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)**
Molecular Cloning: a Laboratory Manual.
2nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Sandkvist, M. (2001)**
Biology of type II secretion.
Mol. Microbiol. **40**: 271-283
- Sauer, F.G., Futterer, K., Pinkner, J.S., Dodson, K.W., Hultgren, S.J. & Waksman, G. (1999)**
Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis.
Science **285**(5430): 1058-1061.
- Sauer, F.G., Knight, S.D., Waksman, G.J. & Hultgren, S.J. (2000)**
PapD-like chaperones and pilus biogenesis.
Semin. Cell Dev. Biol. **11**(1): 27-34
- Sauter, N.K., Mau, T., Rader, S.D. & Agard, D.A. (1998)**
Structure of alpha-lytic protease complexed with its pro region.
Nat. Struct. Biol. **5**: 945-950
- Schiene, C. & Fischer, G. (2000)**
Enzymes that catalyse the restructuring of proteins.
Curr. Opin. Struct. Biol. **10**: 40-45
- Schiffer, M. & Edmundson, A.B. (1967)**
Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential.
Biophys. J. **7**: 121-135
- Schlieker, C., Bukau, B. & Mogk, A. (2002)**
Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology.
J. Biotechnol. **96**(1): 13- 21
- Schneidinger, B. (1997)**
Überexpression und transkriptionelle Regulation des Lipaseoperons von *Pseudomonas aeruginosa* und funktionelle Charakterisierung der Lipase-spezifischen Foldase LipH.
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- Seuter, A. (1998)**
Molekulare Charakterisierung der Interaktion zwischen einer Lipase und deren Foldase aus *Pseudomonas aeruginosa*.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- Shibata, H., Kato, H. & Oda, J. (1998 a)**
Calcium ion-dependent reactivation of a *Pseudomonas* lipase by its specific modulating protein, LipB.
J. Biochem. **123**: 136-141
- Shibata, H., Kato, H. & Oda, J. (1998 b)**
Molecular properties and activity of amino-terminal truncated forms of lipase activator protein.
Biosci. Biotechnol. Biochem. **62**: 354-357
- Shibata, H., Kato, H. & Oda, J. (1998 c)**
Random mutagenesis on the *Pseudomonas* lipase activator protein, LipB: exploring amino acid residues required for its function.
Protein Engineering **11** (6): 467-472

- Shinde, U., Li, Y., Chatterjee, S. & Inouye, M. (1993)**
Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**(15): 6924–6928.
- Sieber, V., Martinez, C.A. & Arnold, F.H. (2001)**
Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences.
Nat. Biotechnol. **19**: 456-460
- Sohl, J.L., Jaswal, S.S. & Agard, D.A. (1998)**
Unfolded conformations of alpha-lytic protease are more stable than its native state.
Nature **395**(6704): 817-819
- Sriprapundh, D., Vielle, C. & Zeikus, J.G. (2003)**
Directed evolution of *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase: high activity on glucose at low temperature and low pH.
Protein Eng. **16**: 683-690
- Stemmer, W.P.C. (1994 a)**
DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 10747-10751
- Stemmer, W.P.C. (1994 b)**
Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling.
Nature **370**: 389-391
- Stephens, D.E., Rumbold, K., Permaul, K., Prior, B.A. & Singh, S. (2006)**
Directed evolution of the thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus*.
J. Biotechnol. **127**(3): 348-354
- Sullivan E.R., Leahy J.G. & Colwell R.R. (1999)**
Cloning and sequence analysis of the lipase and lipase chaperone-encoding genes from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, and redefinition of a proteobacterial lipase family and an analogous lipase chaperone family.
Gene **230**: 277-286
- Terao, Y., Miyamoto, K. & Ohta, H. (2006)**
Improvement of the activity of arylmalonate decarboxylase by random mutagenesis.
Appl. Microbiol. Biotechnol. doi: 10.1007/s00253-006-0518-z
- Thomas, J.G., Ayling, A. & Baneyx, F. (1997)**
Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*: To fold or to refold?
Appl. Biochem. Biotechnol. **66**: 197–238.
- Tindall, K.R. & Kunkel, T.A. (1988)**
Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase.
Biochemistry **27**: 6008-6013
- Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. & Lazdunski, A. (1992)**
Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*.
FEMS Microbiol. Rev. **109**: 73-90
- Urban, A., Leipelt, M., Eggert, T. & Jaeger, K.-E. (2001)**
DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Bacteriol. **183**(2): 587-96.
- Van Loo, B., Spelberg, J.H., Kingma, J., Sonke, T., Wubbolts, M.G., Janssen, D.B. (2004)**
Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling.
Chem. Biol. **11**: 981-90
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F. & Filloux, A. (2001)**
Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway.
EMBO J. **20**: 6735-6741
- Walter, S. & Buchner, J. (2002)**
Molecular chaperones – cellular machines for protein folding.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **41**(7): 1098- 1113
- Weiss, G.A., Watanabe, C.K., Zhong, A., Goddard, A. & Sidhu, S.S. (2000)**
Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning
Proc. Natl Acad. Sci. USA **97**: 8950–8954
- Windgassen, M. (2000)**
Proteinsekretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Untersuchung der Rolle periplasmatischer Proteasen durch Insertionsmutagenese.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- Winkler, U.K. & Stuckmann, M. (1979)**
Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*.
J. Bacteriol. **138**: 663-670
- Wohlfahrt, S., Hoesche, C., Strunk, C. & Winkler, U.K. (1992)**
Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.
J. Gen. Microbiol. **138**: 1325-1335

Wong, T.S., Arnold, F.H. & Schwanberg, U. (2004)

Laboratory evolution of cytochrome p450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents.
Biotechnol. Bioeng. **85**: 351-358

Wong, T.S., Zhurina, D. & Schwaneberg, U. (2006)

The diversity challenge in directed protein evolution.
Comb. Chem. High Throughput Screen **9**: 271-288

You, L. & Arnold, F.H. (1994)

Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide.
Protein Eng. **9**: 77-83

Zakour, R.A. & Loeb, L.A. (1982)

Site-specific mutagenesis by error-directed DNA synthesis.
Nature **295**: 708-710

Zavialov, A.V., Berglund, J., Pudney, A.F., Fooks, L.J., Ibrahim, T.M., MacIntyre, S. & Knight, S.D. (2003)

Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: Preserved folding energy drives fiber formation.
Cell **113**: 587-596

Zhao, H., and Arnold, F. H. (1997)

Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination.
Nucleic Acids Res. **25**: 1307-1308

Zha, D., Eipper, A. & Reetz, M.T. (2003)

Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: a new tool in directed evolution.
ChemBioChem. **4**: 34-39

pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q333A	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q333A	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> R341A	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> R341A	diese Arbeit

Tab. 8.2: Übersicht der im Rahmen der P234-Sättigungsmutagenese erstellten Plasmide

pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234R	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234R	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234N	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234N	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234D	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234D	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234C	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234C	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234Q	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234Q	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234E	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234E	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234G	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234G	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234H	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234H	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234I	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234I	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234L	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234L	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234K	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234K	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234M	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234M	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234F	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234F	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234S	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234S	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234T	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234T	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234W	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234W	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234Y	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234Y	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> P234V	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> P234V	diese Arbeit

Tab. 8.3: Übersicht der im Rahmen der P241-Sättigungsmutagenese erstellten Plasmide

pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241R	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241R	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241N	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241N	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241D	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241D	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241C	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241C	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241E	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241E	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241G	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241G	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241H	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241H	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241I	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241I	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241L	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241L	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241K	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241K	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241M	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241M	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241F	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241F	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241P	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241P	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241S	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241S	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241T	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241T	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241W	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241W	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241Y	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241Y	diese Arbeit
pBBR1MCS/PA <i>lipA lipH</i> Q241V	pBBR1MCS/PA <i>lipAH</i> mit Punktmutation <i>lipH</i> Q241V	diese Arbeit

Tab. 8.4: Übersicht der im Rahmen des Alaninscans verwendeten Oligonukleotide

PA <i>lipH</i> E23A	5' – GGGTGC GGGGGAAGGSGCCAGCCAGACGAACCA –3'	33
PA <i>lipH</i> P24A	5' – CTCGGGTGC GGGGGASGCTTCCAGCCAGACGAA –3'	33
PA <i>lipH</i> S25A	5' – CGTCTCGGGTGC GGGSGCAGGTTCCAGCCAGAC –3'	33
PA <i>lipH</i> T30A	5' – GCTGGCCGGGGCGCSGCCTCGGGTGC GGGGGA –3'	33
PA <i>lipH</i> A31P	5' – CGGGCTGGCCGGGGSGGCGTCTCGGGTGC GGG –3'	33
PA <i>lipH</i> P32A	5' – CTGCGGGCTGGCCGGSGCCGCGTCTCGGGTGC –3'	33
PA <i>lipH</i> P33A	5' – CGCCTGC GGGCTGGCSGCGGGCGCCGCTCTCGGG –3'	33

PA lipH S35A	5' – TGCGCCCGCCTGCGGSGCGGCCGGGGGCGCCGT –3'	33
PA lipH P36A	5' – GACTGCGCCCCGCTGSGCGCTGGCCGGGGGCGC –3'	33
PA lipH Q37A	5' – GTGGA CTGCGCCCGCSGCCGGGCTGGCCGGGG –3'	33
PA lipH A38P	5' – GGCGTGGACTGCGCCSGGCTGCGGGCTGGCCGG –3'	33
PA lipH G39A	5' – CGGGGCGTGGACTGCSGCCGCTGCGGGCTGGC –3'	33
PA lipH A43P	5' – GGAGGCTGCTGGCGGSGGGTGGACTGCGCCCGC –3'	33
PA lipH A47P	5' – CGCTTCTCCC GCGGASGGTGTCTGGCGGGGCGTG –3'	33
PA lipH S48A	5' – CACCGCTTCTCCC GCSGCCGCTGCTGGCGGGG –3'	33
PA lipH A49P	5' – CGGCACCGCTTCTCCSGGGGAGGCTGCTGGCGG –3'	33
PA lipH G50A	5' – GGCCGGCACC GCTTCSGCCGCGGAGGCTGCTGG –3'	33
PA lipH E51A	5' – AGGGGCCGGCACCGCSGCTCCC GCGGAGGCTGC –3'	33
PA lipH A52P	5' – CTGAGGGGCCGGCACSGGTTCTCCC GCGGAGG –3'	33
PA lipH V53A	5' – GACCTGAGGGGCCGGSGCCGCTTCTCCC GCGGA –3'	33
PA lipH P54A	5' – CATGACCTGAGGGGCSGCCACCGCTTCTCCC GC –3'	33
PA lipH A55P	5' – CGGCATGACCTGAGGSGGCGGCACCGCTTCTCC –3'	33
PA lipH P56A	5' – GGCCGGCATGACCTGSGCGGCCGGCACCGCTTC –3'	33
PA lipH Q57A	5' – CTTGGCCGGCATGACSGCAGGGGCCGGCACCGC –3'	33
PA lipH V58A	5' – GACCTTGGCCGGCATSGCCTGAGGGGCCGGCAC –3'	33
PA lipH M59A	5' – CGCGACCTTGGCCGGSGCGACCTGAGGGGCCGG –3'	33
PA lipH P60A	5' – CGGCGCGACCTTGGCSGCCGGGACCTGAGGGGC –3'	33
PA lipH A61P	5' – CAGCGGCGCGACCTTSGGCGGCGGGACCTGAGG –3'	33
PA lipH K62A	5' – TGGCAGCGGCGCGACSGCGGCCGGCGGGACCTG –3'	33
PA lipH A64P	5' – GGAGGTTGGCAGCGGSGGGACCTTGGCCGGCGG –3'	33
PA lipH P65A	5' – GAAGGAGGTTGGCAGSGCCGCGACCTTGGCCGG –3'	33
PA lipH L66A	5' – CCTGAAGGAGGTTGGSGCCGGCGCGACCTTGGC –3'	33
PA lipH T68A	5' – GGTGCCCCTGAAGGASGCTGGCAGCGGCGCGAC –3'	33
PA lipH S69A	5' – GCTGGTGCCCCTGAASGCGGTTGGCAGCGGCGC –3'	33
PA lipH R71A	5' – ATCGACGCTGGTGCCSGCGAAGGAGGTTGGCAG –3'	33
PA lipH G72A	5' – GCCATCGACGCTGGTSGCCCTGAAGGAGGTTGG –3'	33
PA lipH V75A	5' – ACTGAAACTGCCATCSGCGCTGGTGCCCCTGAA –3'	33
PA lipH D76A	5' – GACACTGAAACTGCCSGCGACGCTGGTGCCCCT –3'	33
PA lipH G77A	5' – GTCGACACTGAAACTSGCATCGACGCTGGTGCC –3'	33
PA lipH S78A	5' – GGCGTCGACACTGAASGCGCCATCGACGCTGGT –3'	33
PA lipH F79A	5' – GCTGGCGTCGACACTSGCACTGCCATCGACGCT –3'	33
PA lipH S80A	5' – GCCGCTGGCGTCGACSGCGAAACTGCCATCGAC –3'	33
PA lipH V81A	5' – GTTGCCGCTGGCGTCSGCACTGAAACTGCCATC –3'	33
PA lipH D82A	5' – CAGGTTGCCGCTGGCSGCGACACTGAAACTGCC –3'	33
PA lipH A83P	5' – CAGGTTGCCGCTGGCSGGGACACTGAAACTGCC –3'	33
PA lipH S84A	5' – GATCAGCAGGTTGCCSGCGGCGTCGACACTGAA –3'	33
PA lipH G85A	5' – GGTGATCAGCAGGTTSGCGCTGGCGTCGACACT –3'	33
PA lipH N86A	5' – GCGGGTGATCAGCAGSGCGCCGCTGGCGTCGAC –3'	33
PA lipH L87A	5' – GTCGCGGGTGATCAGSGCGTTGCCGCTGGCGTC –3'	33
PA lipH I89A	5' – GCGGATGTCGCGGGTSGCCAGCAGGTTGCCGCT –3'	33
PA lipH T90A	5' – GTTGCGGATGTCGCGSGCGATCAGCAGGTTGCC –3'	33
PA lipH R91A	5' – CAGGTTGCCGATGTCSGCGGTGATCAGCAGGTT –3'	33
PA lipH D92A	5' – GAACAGGTTGCCGATSGCGCGGGTGATCAGCAG –3'	33
PA lipH I93A	5' – GTCGAACAGGTTGCGSGCGTCGCGGGTGATCAG –3'	33
PA lipH R94A	5' – GTAGTCGAACAGGTTSGCGATGTCGCGGGTGAT –3'	33
PA lipH N95A	5' – GAAGTAGTCGAACAGSGCGCGGATGTCGCGGGT –3'	33
PA lipH L96A	5' – GAGGAAGTAGTCGAASGCGTTGCCGATGTCGCG –3'	33

PA lipH F97A	5' – GCTGAGGAAGTAGTCSGCCAGGTTGCGGATGTC –3'	33
PA lipH Y99A	5' – GACGGCGCTGAGGAASGCGTCGAACAGGTTGCG –3'	33
PA lipH F100A	5' – GCCGACGGCGCTGAGSGCGTAGTCGAACAGGTT –3'	33
PA lipH L101A	5' – TTCGCCGACGGCGCTSGCGAAGTAGTCGAACAG –3'	33
PA lipH A103P	5' – GGGCTCTTCGCCGACSGGGCTGAGGAAGTAGTC –3'	33
PA lipH V104A	5' – CAGGGGCTCTTCGCCSGCGGCGCTGAGGAAGTA –3'	33
PA lipH G105A	5' – CTGCAGGGGCTCTTCSGCGACGGCGCTGAGGAA –3'	33
PA lipH E106A	5' – TTGCTGCAGGGGCTCSGCGCCGACGGCGCTGAG –3'	33
PA lipH L113A	5' – GGCGCGCAGGCGGTCSGCGCTTTGCTGCAGGGG –3'	33
PA lipH D114A	5' – GTAGGCGCGCAGGCGSGCCAGGCTTTGCTGCAG –3'	33
PA lipH R115A	5' – GATGTAGGCGCGCAGSGCGTCCAGGCTTTGCTG –3'	33
PA lipH L116A	5' – GGCGATGTAGGCGGSGCGCGGTCCAGGCTTTG –3'	33
PA lipH R117A	5' – GGCGGCGATGTAGGCSGCCAGGCGGTCCAGGCT –3'	33
PA lipH A118P	5' – TTCGGCGGCGATGTASGGGCGCAGGCGGTCCAG –3'	33
PA lipH Y119A	5' – GAGTTCGGCGGCGATSGCGGCGCGCAGGCGGTC –3'	33
PA lipH A121P	5' – CTCCTGGAGTTCGGCSGGGATGTAGGCGCGCAG –3'	33
PA lipH A122P	5' – CGGCTCCTGGAGTTCSGGGGCGATGTAGGCGCG –3'	33
PA lipH Q125A	5' – GCCGCGCGCCGGCTCSGCGAGTTCGGCGGCGAT –3'	33
PA lipH E126A	5' – CTGGCCGCGCGCCGGSGCCTGGAGTTCGGCGGC –3'	33
PA lipH P127A	5' – CGCCTGGCCGCGCGCSGCCTCCTGGAGTTCGGC –3'	33
PA lipH A128P	5' – CAACGCCTGGCCGCGSGGCGGCTCCTGGAGTTC –3'	33
PA lipH R129A	5' – CGCCAACGCCTGGCCSGCCGCGGCTCCTGGAG –3'	33
PA lipH G130A	5' – CAGCGCCAACGCCTGSGCGCGCGCCGGCTCCTG –3'	33
PA lipH Q131A	5' – CATCAGCGCCAACGCSGCGCCGCGCGCCGGCTC –3'	33
PA lipH L133A	5' – TTGCTGCATCAGCGCSGCCGCTGGCCGCGCGC –3'	33
PA lipH A134P	5' – GTATTGCTGCATCAGSGGCAACGCCTGGCCGCG –3'	33
PA lipH L135A	5' – GATGTATTGCTGCATSGCCGCCAACGCCTGGCC –3'	33
PA lipH M136A	5' – GTCGATGTATTGCTGSGCCAGCGCCAACGCCTG –3'	33
PA lipH Q137A	5' – GTAGTCGATGTATTGSGCCATCAGCGCCAACGC –3'	33
PA lipH Q138A	5' – CTTGTAGTCGATGTASGCCTGCATCAGCGCCAA –3'	33
PA lipH Y139A	5' – CTTCTTGTAGTCGATSGCTTGCTGCATCAGCGC –3'	33
PA lipH I140A	5' – TTCCTTCTTGTAGTCSGCGTATTGCTGCATCAG –3'	33
PA lipH D141A	5' – CAGTTCCTTCTTGTASGCGATGTATTGCTGCAT –3'	33
PA lipH K143A	5' – CAGCACCAGTTCCTTSGCGTAGTCGATGTATTG –3'	33
PA lipH K144A	5' – GAGCAGCACCAGTTCSGCCTTGTAGTCGATGTA –3'	33
PA lipH E145A	5' – TTCGAGCAGCACCAGSGCCTTCTTGTAGTCGAT –3'	33
PA lipH L146A	5' – GCGTTCGAGCAGCACSGCTTCTTCTTGTAGTC –3'	33
PA lipH V147A	5' – GTCGCGTTCGAGCAGSGCCAGTTCCTTCTTGTAG –3'	33
PA lipH L148A	5' – CAGGTCGCGTTCGAGSGCCACCAGTTCCTTCTT –3'	33
PA lipH L149A	5' – CGGCAGGTCGCGTTCSGCCAGCACCAGTTCCTT –3'	33
PA lipH E150A	5' – GCGCGGCAGGTCGCGSGCGAGCAGCACCAGTTC –3'	33
PA lipH R151A	5' – CAGGCGCGGCGAGTCSGCTTCGAGCAGCACCAG –3'	33
PA lipH L153A	5' – GTCGGCCAGGCGCGGSGCGTTCGCGTTCGAGCAG –3'	33
PA lipH P154A	5' – GAGGTCGGCCAGGCGSGCCAGGTCGCGTTCGAG –3'	33
PA lipH R155A	5' – GTCGAGGTCGGCCAGSGCCGGCAGGTCGCGTTC –3'	33
PA lipH L156A	5' – GGCGTCGAGGTCGGCSGCGCGCGGCAGGTCGCG –3'	33
PA lipH A157P	5' – CAGGGCGTCGAGGTCSGGCAGGCGCGGCAGGTC –3'	33
PA lipH D158A	5' – GCGCAGGGCGTTCGAGSGCGGCCAGGCGCGGCAG –3'	33
PA lipH L159A	5' – CTGGCGCAGGGCGTCSGCGTTCGGCCAGGCGCGG –3'	33
PA lipH D160A	5' – CCGCTGGCGCAGGGCSGCGAGGTCGGCCAGGCG –3'	33

PA lipH A161P	5' – TTCCCGCTGGCGCAGSGGGTCGAGGTCGGCCAG –3'	33
PA lipH L162A	5' – GGCTTCCCGCTGGCGSGCGGCTCGAGGTCGGC –3'	33
PA lipH R163A	5' – CGCGGCTTCCCGCTGSGCCAGGGCGTCGAGGTC –3'	33
PA lipH Q164A	5' – CACCGCGGCTTCCCGSGCGCGCAGGGCGTCGAG –3'	33
PA lipH R165A	5' – TTTCACCGCGGCTTCSGCCTGGCGCAGGGCGTC –3'	33
PA lipH E166A	5' – GGCTTTCACCGCGGCSGCCCGCTGGCGCAGGGC –3'	33
PA lipH A167P	5' – CAGGGCTTTCACCGCSGGTTCCCGCTGGCGCAG –3'	33
PA lipH A168P	5' – GCGCAGGGCTTTCACSGGGGCTTCCCGCTGGCG –3'	33
PA lipH V169A	5' – CGCGCGCAGGGCTTTSGCCGCGGCTTCCCGCTG –3'	33
PA lipH K170A	5' – CCGCGCGCGCAGGGCSGCCACCGCGGCTTCCCG –3'	33
PA lipH A171P	5' – GATCCGCGCGCGCAGSGGTTTCACCGCGGCTTC –3'	33
PA lipH L172A	5' – GAAGATCCGCGCGSGCGGCTTTCACCGCGGC –3'	33
PA lipH R173A	5' – GCTGAAGATCCGCGCSGCGACGGCTTTCACCGC –3'	33
PA lipH A174P	5' – GTTGTGAAGATCCGSGGGCGGACGGCTTTCAC –3'	33
PA lipH R175A	5' – TTCGTTGCTGAAGATSGCCGCGCGGACGGCTTT –3'	33
PA lipH I176A	5' – CGCTTCGTTGCTGAASGCCCGCGCGGACGGC –3'	33
PA lipH F177A	5' – GTGCGCTTCGTTGCTSGCGATCCGCGCGCGGAC –3'	33
PA lipH S178A	5' – CACGTGCGCTTCGTTSGCGAAGATCCGCGCGCG –3'	33
PA lipH N179A	5' – CGCCACGTGCGCTTCSGCGCTGAAGATCCGCGC –3'	33
PA lipH V183A	5' – AGCAACGAAGCGCACGCSGCGTTCTTCGCCGAC –3'	33
PA lipH A184P	5' – AACGAAGCGCACGTGCCSTTCTTCGCCGACGAG –3'	33
PA lipH F185A	5' – GAAGCGCACGTGGCGGCTTCGCCGACGAGGAA –3'	33
PA lipH A187P	5' – CACGTGGCGTTCTTCCCSGACGAGGAAACCTAC –3'	33
PA lipH D188A	5' – GTGGCGTTCTTCGCCGCSGAGGAAACCTACAAC –3'	33
PA lipH N193A	5' – GACGAGGAAACCTACGCSCAGTTCACCCTGGAG –3'	33
PA lipH Q194A	5' – GAGGAAACCTACAACGCSTTCACCCTGGAGCGC –3'	33
PA lipH F195A	5' – GAAACCTACAACCAGGCSACCCTGGAGCGCCTG –3'	33
PA lipH T196A	5' – ACCTACAACCAGTTCGCSCTGGAGCGCCTGGCG –3'	33
PA lipH E198A	5' – AACCAGTTCACCCTGGCSCGCCTGGCGATCCGC –3'	33
PA lipH R199A	5' – CAGTTCACCCTGGAGGCSCTGGCGATCCGCCAG –3'	33
PA lipH I217A	5' – GAAAAGGCCCGCCGCCGCSGACCCTGCGCGCC –3'	33
PA lipH D218A	5' – AAGGCCGCGCCATCGCSCGCCTGCGCGCCAGC –3'	33
PA lipH R219A	5' – GCCGCCGCCATCGACGCSCTGCGCGCCAGCCTG –3'	33
PA lipH Q229A	5' – CTGCCGGAAGACCAGGCSGAAAGCGTGCTGCCG –3'	33
PA lipH E230A	5' – CCGGAAGACCAGCAGGCSAGCGTGCTGCCGCAA –3'	33
PA lipH S231A	5' – GAAGACCAGCAGGAAGCSGTGCTGCCGCAACTG –3'	33
PA lipH V232A	5' – GACCAGCAGGAAAGCGCSCTGCCGCAACTGCAA –3'	33
PA lipH P234A	5' – CAGGAAAGCGTGCTGGCSCAACTGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH Q241A	5' – CTGCAAAGCGAACTGGCSCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q242A	5' – CAAAGCGAACTGCAGGCSAGACCGCCGCCCTC –3'	33
PA lipH Q243A	5' – AGCGAACTGCAGCAGGCSACCGCCGCCCTCCAG –3'	33
PA lipH T244A	5' – GAACTGCAGCAGCAGGCSGCCGCCCTCCAGGCC –3'	33
PA lipH L247A	5' – CAGCAGACCGCCGCCGCSAGGCCGCTGGCGCC –3'	33
PA lipH A256P	5' – GGCGCCGGCCCGGAACCSATCCGCCAGATGCGT –3'	33
PA lipH R258A	5' – GGCCCGGAAGCCATCGCSCAGATGCGTCAGCAA –3'	33
PA lipH T270A	5' – GTGGGCGCCGAAGCCGCSACCCGCTGGAGCAA –3'	33
PA lipH S281A	5' – CTCGATCGGCAACGCGCSGCCTGGAAGGGCCGG –3'	33
PA lipH A282P	5' – GATCGGCAACGCTCGCCSTGGAAGGGCCGGCTG –3'	33
PA lipH W283A	5' – CGGCAACGCTCGGCCGCSAAGGGCCGGCTGGAC –3'	33
PA lipH Y290A	5' – GGCCGGCTGGACGACGCSTTCGCCGAGAAGAGC –3'	33

PA lipH E298A	5' – GAGAAGAGCCGGATCGCSGGCAATACCGGGCTG –3'	33
PA lipH G302A	5' – ATCGAAGGCAATACCGCSCTGAGCGAAGCCGAC –3'	33
PA lipH L303A	5' – GAAGGCAATACCGGGCSAGCGAAGCCGACCGC –3'	33
PA lipH D307A	5' – GGGCTGAGCGAAGCCGCSCGCCGCGGGCGGTC –3'	33
PA lipH R314A	5' – CGCGCGGCGGTCGAAGCSCTGGCCGAGGAGCGC –3'	33
PA lipH A316P	5' – GCGGTCGAACGCCTGCCSGAGGAGCGCTTCAGC –3'	33
PA lipH E317A	5' – GTCGAACGCCTGGCCGCSGAGCGCTTCAGCGAA –3'	33
PA lipH E318A	5' – GAACGCTTGGCCGAGGCSGCTTCAGCGAACAG –3'	33
PA lipH R319A	5' – CGCCTGGCCGAGGAGGCSTTCAGCGAACAGGAA –3'	33
PA lipH L326A	5' – AGCGAACAGGAACGCGCSCGCCCTGGGCGCGCTG –3'	33
PA lipH R327A	5' – GAACAGGAACGCTTGGCSCTGGGCGCGCTGGAA –3'	33
PA lipH G329A	5' – GAACGCTTGCGCCTGGCSGCGCTGGAACAGATG –3'	33
PA lipH E332A	5' – CGCCTGGGCGCGCTGGCSCAGATGCGCCAGGCC –3'	33
PA lipH Q333A	5' – CTGGGCGCGCTGGAAGCSATGCGCCAGGCCGAG –3'	33
PA lipH R341A	5' – CGCCAGGCCGAGCAGGCSTGAGGATCCCCCGGG –3'	33

Tab. 8.5: Übersicht der im Rahmen der P234-Sättigungsmutagenese verwendeten Oligonukleotide

PA lipH P234R	5' – CAGGAAAGCGTGCTGCGCCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234N	5' – CAGGAAAGCGTGCTGAACCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234D	5' – CAGGAAAGCGTGCTGGACCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234C	5' – CAGGAAAGCGTGCTGTGCCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234Q	5' – CAGGAAAGCGTGCTGCAGCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234E	5' – CAGGAAAGCGTGCTGGARCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234G	5' – CAGGAAAGCGTGCTGGGCCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234H	5' – CAGGAAAGCGTGCTGCACCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234I	5' – CAGGAAAGCGTGCTGATCCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234L	5' – CAGGAAAGCGTGCTGCTSCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234K	5' – CAGGAAAGCGTGCTGAAGCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234M	5' – CAGGAAAGCGTGCTGATGCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234F	5' – CAGGAAAGCGTGCTGTTCCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234S	5' – CAGGAAAGCGTGCTGTCSCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234T	5' – CAGGAAAGCGTGCTGACCCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234W	5' – CAGGAAAGCGTGCTGTGGCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234Y	5' – CAGGAAAGCGTGCTGTACCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33
PA lipH P234V	5' – CAGGAAAGCGTGCTGGTSCAAC TGCAAAGCGAA –3'	33

Tab. 8.6: Übersicht der im Rahmen der Q241-Sättigungsmutagenese verwendeten Oligonukleotide

PA lipH Q241R	5' – CTGCAAAGCGAACTGCGCCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241N	5' – CTGCAAAGCGAACTGAACCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241D	5' – CTGCAAAGCGAACTGGACCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241C	5' – CTGCAAAGCGAACTGTGCCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241E	5' – CTGCAAAGCGAACTGGARCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241G	5' – CTGCAAAGCGAACTGGGCCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241H	5' – CTGCAAAGCGAACTGCACCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241I	5' – CTGCAAAGCGAACTGATCCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241L	5' – CTGCAAAGCGAACTGCTSCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241K	5' – CTGCAAAGCGAACTGAAGCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241M	5' – CTGCAAAGCGAACTGATGCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241F	5' – CTGCAAAGCGAACTGTTCCAGCAGACCGCCGCC –3'	33

PA lipH Q241P	5' – CTGCAAAGCGAACTGCCSCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241S	5' – CTGCAAAGCGAACTGTCSCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241T	5' – CTGCAAAGCGAACTGACCCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241W	5' – CTGCAAAGCGAACTGTGGCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241Y	5' – CTGCAAAGCGAACTGTACCAGCAGACCGCCGCC –3'	33
PA lipH Q241V	5' – CTGCAAAGCGAACTGGTSCAGCAGACCGCCGCC –3'	33

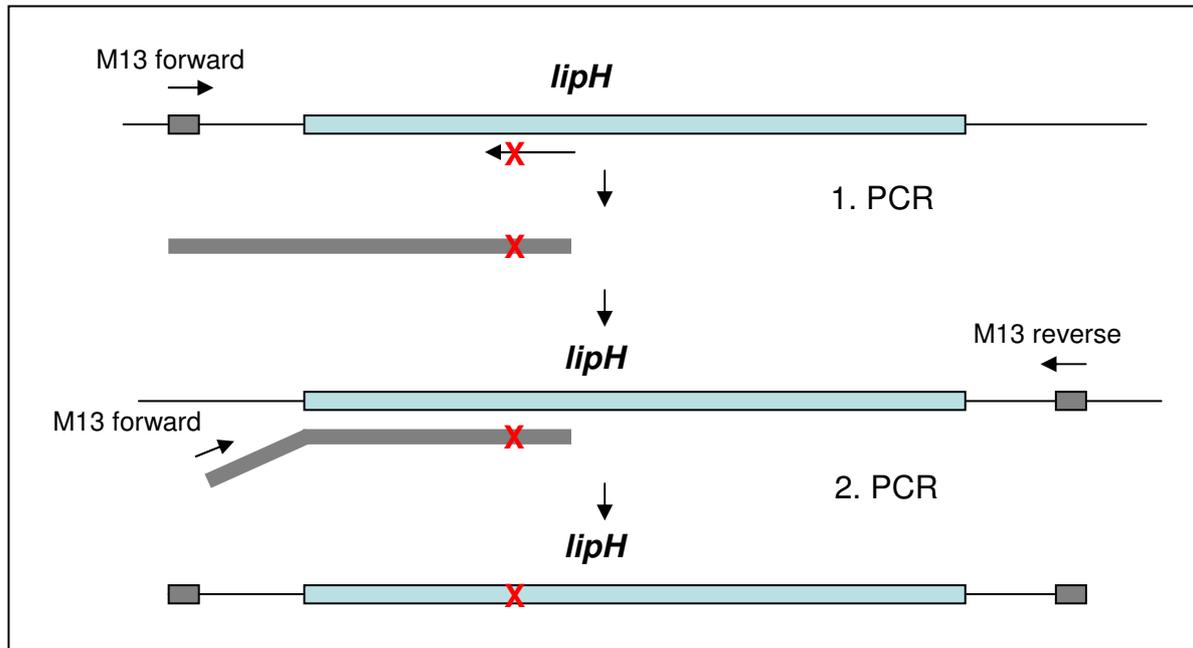


Abb. 8.1: Strategien für die Einbringung ortsspezifischer Mutationen in das *lipH*-Gen.

Prinzip der Megaprimer-Methode modifiziert nach Baretino *et al.* (1994). In der ersten PCR wurden das universelle Oligonukleotid „M13 forward“ und ein Mutagenese-Oligonukleotid, das an der zu mutagenisierenden Stelle ein definiertes Basentriplett enthielt, zusammen mit dem Template pBSK/*lipH* *Bam*HI/*Afl*I-Verkürzt bzw. pBSK/*lipH* *Afl*I/*Xba*I-Verkürzt eingesetzt. In der zweiten PCR wurde der so entstandene Megaprimer, das Oligonukleotid „M13 forward“, das Oligonukleotid „M13 reverse“ und das Konstrukt pBSK/*lipH* *Xba*I/*Ade*I-Verkürzt bzw. pBSK/*lipH* *Ade*I/*Bam*HI-Verkürzt als Matrizen-DNA eingesetzt. Die Amplifikation von Wildtyp-DNA konnte durch den Wechsel des DNA-Templates verhindert werden.

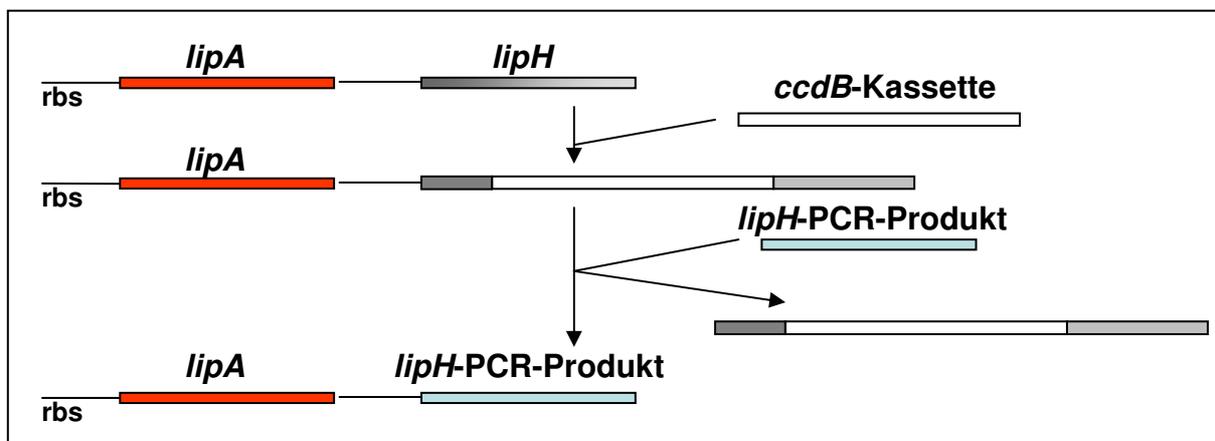


Abb. 8.2: Klonierungsschema über die Erstellung der ep-LipH-Bank.

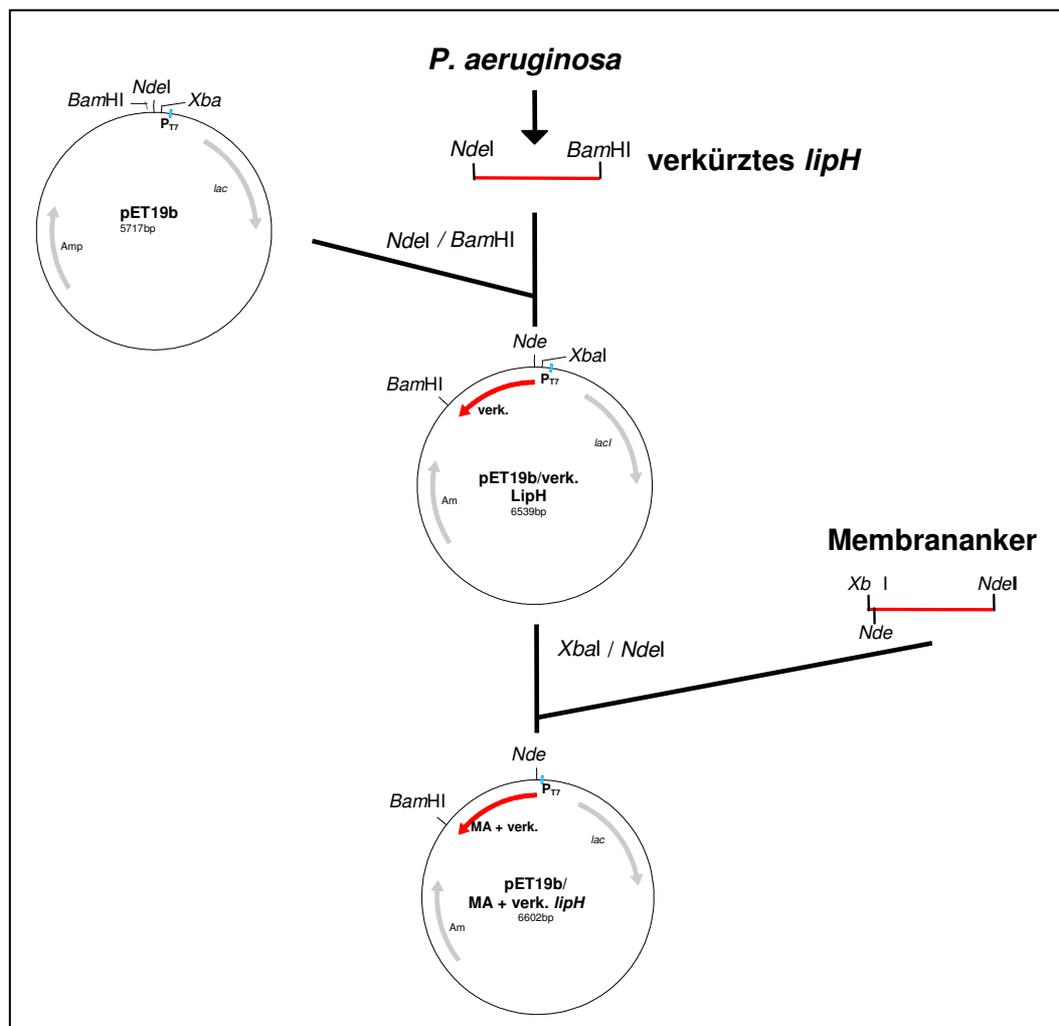


Abb. 8.3: Klonierungsschema der LipH-Verkürzung