

**Evolutionäre Optimierung von Lipasen aus
Bacillus subtilis und *Pseudomonas aeruginosa***

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

vorgelegt von

Michael Puls

aus Berlin

Jülich, November 2007

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger

Koreferent: Prof. Dr. Roland Freudl

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2007

meinen Eltern
und Tanja

**...that's one small step for mankind –
one giant leap for me...!**

Wissenschaftliche Veröffentlichungen im Rahmen dieser Promotion

Artikel in Fachjournalen:

- **Eggert, T., Leggewie, C., Puls, M., Streit, W., van Pouderoyen, G., Dijkstra, B. W., Jaeger, K.-E. (2004):** Novel biocatalysts by identification and design. *Biocatal. Biotrans.* **22**: 139-144.
- **Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Gatti-Lafranconi, P., Brocca, S., Lotti, M., Jaeger, K.-E., Puls, M., Eggert, T. (2006):** The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **39**: 166-170.
- **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**: 106-112

Tagungsbeiträge:

- **Puls, M., van Pouderoyen, G., Dijkstra, B. W., Jaeger, K.-E. and Eggert, T. (2004):** Enzymatic lipolysis – the function of the lid-structures of bacterial lipases. Posterbeitrag, Biocat 2004 (Hamburg).
 - **Puls, M., van Pouderoyen, G., Dijkstra, B. W., Bocola, M., Thiel, W., Jaeger, K.-E. and Eggert, T. (2005):** Structure and function relationships in bacterial lipases. Posterbeitrag, Biotrans 2005 (Delft).
 - **Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Brocca, S., Lotti, M., Puls, M., Eggert, T. (2005):** Posterbeitrag, BioTrans 2005 (Delft).
 - **Puls, M., van Pouderoyen, G., Dijkstra, B. W., Bocola, M., Thiel, W., Jaeger, K.-E. and Eggert, T. (2005):** Construction and analysis of lid-variants of bacterial lipases. Posterbeitrag, VAAM-Jahrstagung 2005 (Göttingen).
 - **Puls, M., van Pouderoyen, G., Dijkstra, B. W., Jaeger, K.-E. and Eggert, T. (2006):** Bacterial lipases with artificial lids created by rational design and directed evolution. Posterbeitrag, Symposium: Protein Design and Evolution for Biocatalysis (Greifswald).
 - **Puls, M., van Pouderoyen, G., Jaeger, K.-E. and Eggert, T. (2007):** Engineering of new functional elements onto a minimal α/β -hydrolase. Vortrag, Biotrans 2007 (Oviedo).
-

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger herzlich für die Überlassung des spannenden und interessanten Themas, die konstruktiven Diskussionen und die mir gebotenen Möglichkeiten, meine Ideen frei zu entwickeln und meiner Arbeit selbstständig nachgehen zu können. Ferner danke ich ihm für die Unterstützung, vielfältige wissenschaftliche Kontakte zu knüpfen und seine Ermutigung zur Sammlung nationaler wie internationaler Erfahrungen.

Für die freundliche Übernahme des Koreferates möchte ich Herrn Prof. Dr. Roland Freudl herzlich danken.

Der GRÜNDERSTIFTUNG ZUR FÖRDERUNG VON FORSCHUNG UND WISSENSCHAFTLICHEM NACHWUCHS AN DER HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF (Düsseldorf Entrepreneurs Foundation) gilt mein Dank für die Finanzierung meiner Promotionsstelle im Rahmen des mir zuerkannten Stipendiums.

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Thorsten Eggert für seine engagierte und freundschaftliche Betreuung, für seine stete Diskussionsbereitschaft und die Hilfe bei der Planung und Durchführung dieser Promotionsarbeit sowie für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und ich freue mich auf die Fortsetzung dieser Zusammenarbeit in der Zukunft.

Herrn Prof. Dr. M. T. Reetz möchte ich herzlich danken für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis während meines Aufenthaltes am Max-Planck-Institut in Mülheim an der Ruhr. Herrn Dr. Marco Bocola möchte ich herzlich danken für seine stete Hilfsbereitschaft in allen Fragen der Proteinstruktur-Modellierung, die ausführliche Beantwortung zahlreicher Fragen zur Theorie und die kritische und aufmerksame Durchsicht des *P. aeruginosa* LipA-bezogenen Anteils dieses Manuskriptes.

Thanks to Prof. Dr. B. Dijkstra, Laboratory of Biophysical Chemistry-Rijksuniversiteit Groningen (Niederlande) and Dr. G. van Pouderoyen for their help with the homology studies for the construction of the BSLA-variants.

Allen Mitarbeitern des Instituts für molekulare Enzymtechnologie danke ich für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima während meiner gesamten Promotionszeit. Ganz besonders herzlicher Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Gerichtete Evolution“, die mir in jeder Situation mit Rat, Tat und Spaß zur Seite gestanden haben. Frau Astrid Wirtz gilt mein Dank für die spontane und tatkräftige Unterstützung bei der Aufreinigung meiner Proteinvarianten. Herrn Dr. Christian Leggewie und Frau Dr. Tanja Carl danke ich für die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes.

Allen Mitarbeitern und Freunden, die mit mir gemeinsam im Labor gestanden und geforscht haben sei an dieser Stelle für die gegenseitige Unterstützung, die konstruktive Atmosphäre und die gute Zeit ganz herzlich gedankt.

Besonderen Dank an all diejenigen, zu denen sich im Laufe meiner Promotionszeit Freundschaften entwickelt haben, die Bestand haben –

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN.....	V
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. BEDEUTUNG DER MODERNEN BIOKATALYSE - FORSCHUNG UND ANWENDUNGEN	1
1.2. EIGENSCHAFTEN VON BIOKATALYSATOREN.....	3
1.3. CHIRALITÄT	5
1.4. ADAPTIONSPOTENTIAL UND OPTIMIERUNG VON BIOKATALYSATOREN	7
1.5. PROTEIN ENGINEERING.....	8
1.5.1. <i>Rationales Design</i>	8
1.5.2. <i>Gerichtete Evolution</i>	9
1.6. LIPASEN.....	18
1.6.1. <i>Bedeutung der Lipasen für die Biotechnologie</i>	19
1.6.2. <i>Kinetische Eigenschaften von Lipasen</i>	20
1.6.3. <i>Katalytischer Mechanismus von Lipasen</i>	21
1.6.4. <i>Struktur der Lipasen: Die α/β-Hydrolasefaltung</i>	23
1.6.5. <i>Die Bedeutung der Deckelstruktur von Lipasen</i>	24
1.6.6. <i>Die Lipase A aus Bacillus subtilis</i>	26
1.6.7. <i>Die Lipase A aus Pseudomonas aeruginosa</i>	27
1.7. ZIELE DIESER ARBEIT	29
2. MATERIAL UND METHODEN.....	31
2.1. CHEMIKALIEN UND ENZYME.....	31
2.2. LIPASE-SUBSTRATE	31
2.3. BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	33
2.4. VERWENDETE GERÄTE UND SOFTWARE	36
2.5. OLIGONUKLEOTIDE UND PCR-PRIMER	36
2.6. ANZUCHT, KULTIVIERUNG UND LAGERUNG VON BAKTERIEN	36
2.6.1. <i>Nährmedien</i>	36
2.6.2. <i>Anzucht und Kultivierung</i>	37
2.6.3. <i>Anzucht im Hochdurchsatzverfahren</i>	37
2.6.4. <i>Lagerung</i>	38
2.7. ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	38
2.8. GELELEKTROPHORESE VON NUKLEINSÄUREN	38
2.9. <i>IN VITRO</i> -REKOMBINATION VON NUKLEINSÄUREN.....	38
2.10. TRANSFORMATION VON BAKTERIEN MIT PLASMID-DNA.....	38
2.10.1. <i>Hitzeschock-Transformation von E. coli</i>	38
2.10.2. <i>Elektroporation von E. coli</i>	38
2.10.3. <i>Hitzeschock-Transformation von P. aeruginosa</i>	39

2.11.	AMPLIFIKATION UND MODIFIKATION VON NUKLEINSÄUREN DURCH POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	39
2.11.1.	<i>Standard-PCR</i>	39
2.11.2.	Ortsspezifische Mutagenese	39
2.11.3.	Sättigungsmutagenese	40
2.11.4.	Ungerichtete Mutagenese mittels epPCR	40
2.12.	SEQUENZIERUNG VON DNA	40
2.13.	CHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG DER LIPASE-VARIANTEN	40
2.14.	BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN	41
2.15.	AUFKONZENTRIERUNG VON PROTEINEN DURCH TCA-FÄLLUNG	41
2.16.	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	41
2.17.	SPEKTROPHOTOMETRISCHE METHODE ZUR BESTIMMUNG VON LIPASE-AKTIVITÄT	42
2.18.	BESTIMMUNG VON ENZYMSTABILITÄTEN	42
2.19.	HOCHDURCHSATZ-SCREENING VON VARIANTENBIBLIOTHEKEN	42
2.20.	AKTIVITÄTS-SCREENING AUF TRIBUTYRIN-AGARPLATTEN	43
2.21.	BESTIMMUNG VON ENANTIOSELEKTIVITÄT GEGENÜBER <i>PARA</i> -NITROPHENYL-2-METHYLDEKANOAT	43
3.	ERGEBNISSE	45
3.1.	KLONIERUNG UND EXPRESSION DER DECKELVARIANTEN IN PET19B	46
3.2.	ENTWICKLUNG EINES SCREENINGPROZESSES ZUR DETEKTION VON VARIANTEN MIT GESTEIGERTER AKTIVITÄT GEGENÜBER <i>PARA</i> -NITROPHENYLPALMITAT	47
3.2.1.	<i>Wuchsverhalten und Expression von BSLA in E. coli BL21(DE3) in Deepwell-Mikrotiterplatten</i>	48
3.2.2.	<i>Optimierung des Zellaufschlussverfahrens zur Vereinfachung des Hochdurchsatzscreenings</i>	50
3.2.3.	<i>Festlegung eines Schwellenwertes zur Definition von positiven Varianten</i>	52
3.3.	GERICHTETE EVOLUTION DER DECKELVARIANTEN DER <i>BACILLUS SUBTILIS</i> LIPASE A: REAKTIVIERUNG DER VARIANTEN CUTILIP UND HPLIP	53
3.3.1.	<i>Die Aktivität der Cutilip-Varianten gegenüber pNPP konnte bis auf 45 % Wildtypaktivität gesteigert werden</i>	55
3.3.2.	<i>Die Aktivität der HPlip-Varianten konnte lediglich auf 16 % der Wildtypaktivität gesteigert werden</i>	56
3.3.3.	<i>Die Aminosäuren an den Position 17 und 82 sind entscheidend für die Aktivität der Wildtyp-BSLA</i>	57
3.4.	CHARAKTERISIERUNG UND SUBSTRATSPEKTRUM DER VARIANTEN	58
3.4.1.	<i>Aktivitäten gegenüber Fettsäureestern verschiedener Kettenlänge</i>	58
3.4.2.	<i>Substratspezifität der evolvierten Deckel-Varianten gegenüber verzweigten Substraten</i>	61
3.4.3.	<i>Enantioselektivität der Deckelvarianten gegenüber pNP-2-Methyldekanoat</i>	63
3.4.4.	<i>Temperaturstabilität der Deckelvarianten</i>	65
3.5.	DELETION DER DECKELSTRUKTUR DER LIPASE A AUS <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	67
3.6.	KONSTRUKTION ENANTIOSELEKTIVER PUNKTMUTANTEN DER <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> LIPASE A	69

3.6.1.	<i>Die Mutationen S53P und L162G wirken kooperativ auf die Enantioselektivität</i>	70
3.6.2.	<i>Die Funktion des Histidin an Position 83</i>	71
4.	DISKUSSION	73
4.1.	KONSTRUKTION UND EVOLUTION VON DECKELVARIANTEN DER LIPASEN AUS <i>BACILLUS SUBTILIS</i> UND <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	73
4.2.	ETABLIERUNG UND OPTIMIERUNG DES SCREENINGVERFAHRENS	74
4.3.	KONSTRUKTION VON DECKELVARIANTEN DER <i>BACILLUS SUBTILIS</i> LIPASE A	76
4.3.1.	<i>Konzeption des Versuchsansatzes – Struktur als Voraussetzung für Funktion</i>	76
4.3.2.	<i>Alle drei konstruierten Deckelvarianten zeigten Aktivität gegenüber para-Nitrophenylpalmitat</i> 79	
4.3.3.	<i>Die BSLA-Deckelvariante Axelip zeigt ein deutlich verändertes Substratspektrum</i>	80
4.4.	GERICHTETE EVOLUTION DER DECKELVARIANTEN CUTILIP UND HPLIP ZUR ADAPTION DER DECKELINSERTION	82
4.4.1.	<i>Die Wahl der Mutagenese-Strategie</i>	82
4.4.2.	<i>Interpretation der Mutationen aus der gerichteten Evolution der Deckelvarianten</i>	83
4.4.3.	<i>Die Mutationen A42V und A59T liegen innerhalb des Deckelbereiches der Cutilip-Variante</i>	84
4.4.4.	<i>Die Aminosäure V63 ist eine mögliche Kontaktstelle zwischen Deckel und Proteinbasis</i>	86
4.4.5.	<i>Im Deckelbereich der HPlip-Variante führen vier Mutationen zur Adaption an das Proteingrundgerüst</i>	87
4.4.6.	<i>Die Position 17 ist ein Hotspot in allen untersuchten Varianten</i>	88
4.4.7.	<i>Die Position 91 der Cutilip-Variante ist auch in der Wildtyp-BSLA aktivitätsbestimmend</i>	90
4.4.8.	<i>Die Mutationen M137L und Y148H liegen in der Nähe des aktiven Aspartates</i>	92
4.4.9.	<i>Q69, L123 und N175 sind aus vorangegangenen Arbeiten bekannte Positionen</i>	93
4.4.10.	<i>Biochemische Charakterisierung der Deckelvarianten</i>	94
4.4.11.	<i>Die HPlip-Deckelvarianten zeigen eine Präferenz von Fettsäure-Estern mittlerer Länge</i>	94
4.4.12.	<i>Cutilip-Punktmutanten zeigen gesteigerte Aktivität gegenüber Substraten mit Verzweigungen in α-Position</i>	95
4.4.13.	<i>Die Deckelinsertionen verringern die Enantioselektivität der Lipase</i>	96
4.4.14.	<i>Die Deckelinsertionen verringern die Temperaturstabilität der Varianten</i>	97
4.5.	DIE DELETION DES DECKELS DER <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> LIPASE A.....	98
4.6.	EIN FAZIT: BEWERTUNG DER METHODIK ALS PROTEIN ENGINEERING-ANSATZ.....	100
4.7.	DIE EVOLUTION DER ENANTIOSELEKTIVITÄT DER <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> LIPASE A.....	103
4.7.1.	<i>Die Mutationen S53P und L162G wirken sich kooperativ auf H83 aus</i>	105
4.7.2.	<i>Nähere Untersuchung der Funktion des Histidins an Position 83 und die besondere Bedeutung zweier Wassermoleküle für die Enantioselektivität</i>	107
4.7.3.	<i>Fazit aus den Arbeiten zur Optimierung der Enantioselektivität der PAL</i>	109
5.	ZUSAMMENFASSUNG	111
6.	ABSTRACT	112
7.	LITERATURVERZEICHNIS	113
8.	ANHANG:	125

Abkürzungsverzeichnis

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen dargestellt, soweit sie nicht dem allgemeinverständlichen Sprachgebrauch entstammen. Ausgenommen sind weiterhin wissenschaftlichen Konventionen entsprechende Bezeichnungen wie z.B. SI-Einheiten und der Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Code für Aminosäuren.

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
A.dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
Da	Dalton
dNTP	Desoxynucleosid-triphosphat
EC	<i>enzyme code</i> (internat. Konvention)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	Enantionmerenüberschuss (<i>enantiomeric excess</i>)
epPCR	fehlerhafte PCR (<i>error prone polymerase Chainreaction</i>)
h	Stunden
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
kb	Kilobasen (1000 bp)
kDa	Kilodalton (1000 Da)
M	molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
OD	optische Dichte
p.A.	per analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>p</i> NP	<i>para</i> -Nitrophenyl
<i>p</i> NPP	<i>para</i> -Nitrophenyl-Palmitat
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Lsg.	Lösung
HTS	Hochdurchsatz-Screening (<i>High-Throughput-Screening</i>)
DW-MTP	Deepwell-Mikrotiterplatte, 96 x 2 ml
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
NaDoc	Natriumdesoxycholat
üN	über Nacht
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
RT	Raumtemperatur
MTP	Mikrotiterplatte, 96 x 0,5 ml
IMAC	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
kbE	koloniebildende Einheiten

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Abbildungen:	Seite	
Abb. 1.1	Die beiden Enantiomere des Limonen	5
Abb. 1.2	Schematische Darstellung des Prinzips der gerichteten Evolution	10
Abb. 1.3	Schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse eines Triglycerids	18
Abb. 1.4	Die Kinetik nach Michaelis-Menten im Vergleich zur Interphasenaktivierung	20
Abb. 1.5	Reaktionsmechanismus der enzymkatalysierten Lipolyse	22
Abb. 1.6	Die kanonische α/β -Hydrolase Faltung	23
Abb. 1.7	Die Struktur der katalytischen Domäne der humanen Pankreas-Lipase	25
Abb. 1.8	Die Struktur der <i>Bacillus subtilis</i> Lipase A (BSLA)	26
Abb. 1.9	Die Struktur der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lipase A (PAL)	28
Abb. 2.1	Hydrolyse von <i>para</i> -Nitrophenylpalmitat	45
Abb. 3.1	Die Deckelvarianten der <i>Bacillus subtilis</i> Lipase A	48
Abb. 3.2	SDS-PAGE der Zellextrakte von Lipase-exprimierenden <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Kulturen	50
Abb. 3.3	Wuchskurve von <i>E. coli</i> BL21(DE3) in Deepwell-Mikrotiterplatten	51
Abb. 3.4	Lipolytische Aktivitäten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Proteinüberexpression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) LipA	52
Abb. 3.5	Darstellung der Zelldichte im Vergleich zur BSLA-Aktivität in drei verschiedenen Komplexmedien LB, LB/M9 und TB	53
Abb. 3.6	Etablierung des Zellaufschlussverfahrens in Mikrotiterplatten	54
Abb. 3.7	Auswertungsschema eines Screeningprozesses	55
Abb. 3.8	Steigerung der lipolytischen Aktivität der Cutilip-Deckelvariante durch fehlerhafte PCR und Sättigungsmutagenese	58
Abb. 3.9	Aktivitätssteigerung der Variante HPlip durch gerichtete Evolution	59
Abb. 3.10	Steigerung der Aktivität der Wildtyp-BSLA gegenüber <i>p</i> NPP durch Sättigungsmutagenese an den Positionen 17 und 82	60
Abb. 3.11	Aktivitätsspektrum der Cutilip-Punktmutanten gegenüber Fettsäure- <i>p</i> NP-Estern	62
Abb. 3.12	Aktivitätsspektrum der HPlip-Punktmutanten gegenüber Fettsäure- <i>p</i> NP-Estern	63
Abb. 3.13	Aktivitätsspektrum der Wt-BSLA und ihrer Mutanten gegenüber Fettsäure- <i>p</i> NP-Estern unterschiedlicher Länge	64
Abb. 3.14	Substratspezifität der Cutilip- und Axelip-Deckelvarianten bezüglich α -substituierter <i>p</i> NP-Ester	65
Abb. 3.15	Enantioselektivität der Deckelvarianten gegenüber <i>p</i> NP-2-Methyldekanolat	67
Abb. 3.16	Aktivitätsverlust von BSLA-Deckelvarianten nach Inkubation bei 37 °C	68
Abb. 3.17	Lipolytische Restaktivität der aufgereinigten BSLA-Deckelvarianten nach einstündiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen	69
Abb. 3.18	Konstruktion einer deckeldefizienten Variante der <i>P. aeruginosa</i> Lipase A	70
Abb. 4.1	Illustration des Sequenzraum-Konzeptes nach EIGEN	80
Abb. 4.2	Positionen der Insertionen und der Aminosäuren des aktiven Zentrums in der Proteinsequenz und in Strukturmodellen der jeweiligen Variante	81
Abb. 4.3	Überlagerung der aktiven Zentren der Wildtyp-BSLA und der Deckelvariante HPlip	83

Abb. 4.4	Modell der Cutilip-Deckelvariante mit Blick in Längsrichtung des zentralen β -Faltblattes	88
Abb. 4.5	Die Lage der Positionen S32, V63 und Q69 im Wildtypenzym BSLA	89
Abb. 4.6	Die Lage der Mutationen im Modell der Deckelvariante HPlip	91
Abb. 4.7	Modell des Bereiches der Deckelinsertion der Variante Cutilip und der homologe Bereich in der Wildtyp-BSLA	94
Abb. 4.8	Die flexiblen Deckelbereiche der PAL	102
Abb. 4.9	Modell der 1H8-Mutante der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lipase A (PAL)	108
Abb. 4.10	Die Funktion des Histidin 83 im Wildtyp und in der Doppelmutante S53P/L162G	109
Abb. 4.11	Die Funktion der Aminosäure S155 im Wildtyp im Vergleich zur Mutante S155F	110
Abb. 4.12	Mögliche Auswirkungen der Mutation des Histidin 83 zu Alanin	112

Tabellen:

Tab. 1.1	Einteilung der Biotechnologie in ihre verschiedenen Anwendungsgebiete	2
Tab. 1.2	Übersicht über die gängigen Methoden der ungerichteten Mutagenese	12
Tab. 2.1	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten nicht kommerziell erhältlichen Substrate	32
Tab. 2.2	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme	33
Tab. 2.3	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide	33
Tab. 2.4	Verwendete Antibiotika und ihre optimalen Konzentrationen	38
Tab. 3.1	Aufstellung der als positiv identifizierten Mutationen nach Screening der Sättigungsbanken an den Positionen F17 und N91 (bzw. N82)	61
Tab. 3.2	Enantioselektivität der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung von <i>para</i> -Nitrophenyl-rac-2-Methyldekansäure-Ester	73
Tab. 3.3	Enantioselektivitäten der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung von <i>para</i> -Nitrophenyl-rac-2-Methyldekansäure-Ester durch verschiedene H83-Mutanten der PAL	74

1. EINLEITUNG

Enzyme spielen eine zentrale Rolle im Stoffwechsel aller lebenden Organismen, wo sie chemische Reaktionen mit hoher Effizienz unter physiologischen Bedingungen katalysieren. Im Zuge des wachsenden Bewusstseins der heutigen Gesellschaft für Klima-, Umwelt- und Ressourcenschutz und der Entwicklung der so genannten „sanften Chemie“ steigt heutzutage die Nachfrage nach solchen unschädlichen und dabei effizienten Katalysatoren. Enzyme erfüllen zwar diese Anforderungen, die Zahl ihrer derzeit bekannten und nutzbaren Vertreter deckt jedoch längst nicht den gegenwärtigen Bedarf. Die Forschung nach neuen und optimierten Biokatalysatoren ist daher eine der wesentlichen Herausforderungen der modernen Biotechnologie.

Lösungsansätze bestehen zum Einen darin, bislang unbekannte Enzyme - etwa durch Screening des Metagenoms (SCHMEISSER *et al.*, 2007; DREPPER *et al.*, 2006) - aus noch unerschlossenen Quellen der Natur zu gewinnen, andererseits aber die Eigenschaften bereits bekannter Enzyme durch Methoden des *Protein Engineering* so zu verändern, dass sie die an sie gestellten Anforderungen erfüllen. Die Methodik dazu hat sich in den letzten Jahren stark entwickelt (COWARD-KELLY & CHEN, 2007; KAUR & SHARMA, 2006; HIBBERT & DALBY, 2005). Aufgrund ihrer vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten spielen dabei die Lipasen eine bedeutende Rolle. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über den Stand der Forschung auf diesem Gebiet unter besonderer Berücksichtigung dieser Enzymgruppe gegeben werden.

1.1. Bedeutung der modernen Biokatalyse - Forschung und Anwendungen

Der Begriff „Biokatalysator“ bezeichnet heute zumeist Enzyme die entweder als solche oder in Form ganzer Zellen für chemische und biologische Stoffumsätze genutzt werden. Zwar fallen auch Ribozyme und katalytische Antikörper unter diesen Begriff, haben in der Praxis aber bislang kaum Bedeutung, da ihre katalytischen Aktivitäten bislang noch weit hinter denen der Enzyme und chemischen Katalysatoren zurückbleiben (HILVERT, 2000).

Entdeckt wurden Biokatalysatoren bereits kurz nach den ersten Beschreibungen chemischer Katalyse-Phänomene. Der russische Chemiker G. S. KIRCHHOFF beschrieb 1811 die Umwandlung von Stärke in Zucker durch Kochen mit Salzsäure, wobei letztere sich nicht verbrauchte. Einige Jahre später, 1833, entdeckten die französischen Chemiker ANSELME PAYEN und JEAN-FRANÇOIS PERSOZ, dass sich dieselbe Reaktion sehr viel schneller und ohne Kochen durchführen ließ, wenn statt Salzsäure einen Stoff benutzten, den sie aus keimender

Gerste gewonnen hatten. Dieser Stoff, den sie „Diastase“ nannten, war das erste bekannte Enzym (PAYEN & PERSOZ, 1833), und wird noch heute unter dem Namen α -Amylase in großem Maßstab in der Papierindustrie verwendet. Aufgrund dieser Entdeckungen formulierte JÖNS JACOB BERZELIUS 1835 den Begriff der Katalyse und erkannte die universelle Bedeutung dieses Phänomens:

„Wir bekommen begründeten Anlass zu vermuten, dass in lebenden Pflanzen und Tieren tausende von katalytischen Prozessen zwischen den Geweben und Flüssigkeiten vor sich gehen.“ (BERZELIUS, 1836).

Dennoch entwickelten sich die Forschungen auf chemischer und biologischer Seite zunächst getrennt, da die Enzyme experimentell nicht ausreichend zugänglich waren. Seit Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie, wurde diese Hürde weitgehend überwunden.

Heute kennt man einige tausende Enzyme unterschiedlicher Funktion von denen es wiederum, Organismen-spezifisch, zahlreiche Varianten gibt (SCHMID, R. D., 2006). Von technischer Bedeutung sind davon bislang jedoch noch relativ wenige, da ca. ein Drittel mit Membranen assoziiert und in isolierter Form wenig stabil ist. Viele andere wie Transferasen, Ligasen oder Synthasen benötigen darüber hinaus Cofaktoren wie NADH, ATP oder Coenzym A, die kostspielig sind und daher den industriellen Einsatz dieser Enzyme erschweren (SCHMID, A. et al., 2001). Dennoch wächst das Interesse an diesen Werkzeugen stetig.

In den letzten 20 Jahren erfuhr die Biotechnologie einen rasanten Aufschwung und ihre Forschungs- und Anwendungsfelder wurden so umfangreich, dass sich eine weitere Unterteilung in verschiedene Anwendungsbereiche etablierte (Tab. 1.1). Biokatalyse und Enzymtechnologie fallen dabei unter den Begriff der „weißen Biotechnologie“¹, obwohl die

Tab. 1.1: Einteilung der Biotechnologie in ihre verschiedenen Anwendungsgebiete

Bezeichnung	Anwendungsgebiet
rote Biotechnologie:	Einsatz der Technologie für medizinischen Anwendungen von der Diagnostik bis zur Therapie
grüne Biotechnologie:	Veränderung und Nutzbarmachung der Eigenschaften von Pflanzen, hauptsächlich für landwirtschaftliche Anwendungen.
weiße Biotechnologie:	Einsatz biologischer Systeme in industriellen Produktionsprozessen
blaue Biotechnologie	Technische Verwendung mariner Mikroorganismen und Systeme
Nebenfarben: graue, gelbe , braune:	Zwischen- und Randbereiche der Biotechnologie, die sich zwar derzeit um ein eigenes Profil bemühen, jedoch noch nicht eindeutig definiert sind

¹ Der Begriff der „weißen Biotechnologie“ wurde nach einem Vorschlag der EuropaBio 2003 wie folgt definiert: „White Biotechnology is the application of nature's toolset to industrial production.“ (<http://www.europabio.org>)

darin gewonnenen Forschungsergebnisse auch in den anderen Teilbereichen Verwendung finden (FESTEL *et al.*, 2004; EUROPABIO, 2003). Im Jahr 2006 belief sich das globale Wachstum der Biotechnologiebranche nach einer Studie des Wirtschaftsberatungsunternehmens Ernst & Young auf den hohen Wert von 42 %, wobei die Einnahmen der Unternehmen die Rekordmarke von über 70 Mrd. US\$ erreichten (ERNST&YOUNG, 2007). Noch 1992 lag das gesamte Weltmarktvolumen bei 9,6 Mrd. € (FESTEL *et al.*, 2004; STRAATHOF *et al.*, 2002).

Eine Studie der weltweit tätigen Beratungsagentur McKinsey speziell zur „weißen Biotechnologie“ prognostiziert in den nächsten Jahren auch hier ein hohes Wachstum. Demnach werden bis zum Jahr 2010 allein bei der Produktion von Feinchemikalien bei 30-60 % der Prozesse biokatalytische Schritte involviert sein. Der Marktanteil der „weißen Biotechnologie“ bezogen auf die gesamte chemische Industrie werde zwischen 10 und 20 % betragen, bei jährlichen Wachstumsraten von 11-22 % (PERLITZ, 2007; BACHMANN *et al.*, 2004; RIESE, 2003).

Zu begründen sind diese Zahlen einerseits damit, dass in letzter Zeit biotechnologische Prozesse anlaufen, die zwar schon seit längerem bekannt sind, aber erst heute wirtschaftlich werden, beispielsweise die Entwicklung von Biokraftstoffen (BOHLMANN, 2007; GUBLER, 2007), andererseits hat sich im Zuge der Entwicklung der gerichteten Evolution von Biokatalysatoren in den 90er Jahren auch das Spektrum der Möglichkeiten erweitert. Hinzu kommt, dass viele Enzyme bislang noch nicht bekannt sind (YOOSEPH *et al.*, 2007), deren Spektrum aktuell durch Metagenomansätze erforscht wird (SCHMEISSER *et al.*, 2007). Damit sich aber die Suche nach neuen Enzymen für die Biotechnologie bezahlt machen kann, muss zunächst gezeigt werden, dass diese auch Anwendung finden können, indem neue Optimierungstechniken und Strategien entwickelt werden, mit denen Biokatalysatoren an neue Anforderungen angepasst werden können.

1.2. Eigenschaften von Biokatalysatoren

Wie der bereits oben beschriebene historische Vergleich zwischen chemischer und Biokatalyse zeigt, weist letztere einige entscheidende Effizienzvorteile auf. In diesen Eigenschaften begründet sich das wachsende Interesse der Branche an diesen ‚Werkzeugen‘. In industriellen Prozessen ist jeder Reaktionsschritt mit Kosten verbunden, die umso höher sind, je komplexer die Verfahrensführung ist. Häufig werden hoher Druck und/oder hohe Temperaturen benötigt. Geringe Ausbeuten bereits einzelner Reaktionsschritte können die

Kosten enorm erhöhen. Hinzu kommen Entsorgungspflichten von Neben- und Abfallprodukten, die sich nochmals erhöhen, wenn Toxizitätspotential vorhanden ist (HERRERA, 2004). Im Falle homogener, chemischer Katalysatoren sind diese häufig mit den Produkten vermischt und mitunter schwer abzutrennen. Stereoselektivität zu erreichen, ist mit konventionellen Verfahren äußerst schwierig und nur in vergleichsweise wenigen Fällen erfolgreich (BOMMARIUS & RIEBEL, 2004).

Enzyme dagegen arbeiten unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei Normaldruck und geringen Temperaturen mit hohen katalytischen Aktivitäten. Sie sind weiterhin ungiftig und leicht zu entsorgen. Dass sie vorzugsweise in wässrigen Medien arbeiten, wurde in der Vergangenheit von chemischer Seite her kritisiert, wird jedoch in jüngerer Zeit im Hinblick auf die Umweltverträglichkeit zunehmend wieder als Vorteil angesehen, da sich die Ziele der Industrie immer mehr an Konzepten der „grünen Chemie“ und „nachhaltigen Entwicklung“ orientieren. Jedoch auch in organischen Lösungsmitteln werden Enzyme bereits erfolgreich eingesetzt (PATEL, 2006; ADAMCZAK & KRISHNA, 2004; GUPTA, N. & ROY, 2004; KRAGL *et al.*, 2002; KLIBANOV, 2001).

Biokatalysatoren verbinden die Vorteile der klassischen Bereiche der homogenen und heterogenen Katalyse, da sie einerseits vielfach löslich sind wie homogene Katalysatoren, andererseits aber durch ihre Struktur eine räumliche Reaktionsumgebung liefern. Hieraus resultieren die entscheidenden Stärken der Enzyme gegenüber konventioneller Katalyse: Ihre hohe Substratspezifität, Regioselektivität und Stereoselektivität. Gerade in der Produktion von Feinchemikalien spielen diese Eigenschaften eine wesentliche Rolle, und sie werden schwerpunktmäßig in diesem Bereich eingesetzt (GOTOR-FERNANDEZ *et al.*, 2006; PATEL, 2006; GARCIA-URDIALES *et al.*, 2005; SCHMID, A. *et al.*, 2001). Regioselektivität ist beispielsweise in der Schutzgruppenchemie von besonderer Bedeutung (MURPHY & RUTLEDGE, 2007; LINDHORST, 2006; PATHAK & WALDMANN, 1998) und wird im Hinblick auf Lipasen in Abschnitt 1.6.1 näher erläutert. Die Chiralität von Biokatalysatoren und die daraus resultierende Stereoselektivität von Enzymen ist für die Produktion optisch aktiver Substanzen und chiraler Zwischenprodukte bedeutend. Unter Effizienzgesichtspunkten können chemische Umsetzungen im Hinblick auf Stereoselektivität mit natürlichen Systemen noch nicht konkurrieren. Enzyme eröffnen hier neue Möglichkeiten. Daher wird im Bereich Stereoselektivität das größte Entwicklungspotential der Biokatalyse für chemische Synthesen gesehen (POLLARD & WOODLEY, 2007).

1.3. Chiralität

Chiralität ist eine Form der Symmetrie, bei der sich zwei Moleküle² zueinander verhalten wie Bild zu Spiegelbild oder die rechte Hand zur linken. Die beiden Isomere werden Enantiomere genannt. Biologische Systeme können zwischen diesen beiden Formen differenzieren. So schmeckt die *R*-Form des Limonen nach Orange, die *S*-Form jedoch nach Zitrone (Abb1.1). Von zentraler Bedeutung ist dies nicht nur für die Produktion von Duft- und Aromastoffen, sondern vor allem für die Herstellung von Pharmazeutika, wie die Arzneimittelkatastrophe durch das Präparat *Contergan*[®] von 1957 auf tragische Art und Weise bezeugt. Zwar bestand in diesem Fall das Problem darin, dass die Verbindung innerhalb des Körpers racemisierte, dennoch zeigt das Beispiel die mitunter drastischen Unterschiede der Wirkungen zweier Enantiomere. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Vorschriften für Arzneimittelproduktionen äußerst strikt gehandhabt werden und dass sowohl die US-amerikanische *Food- and Drug Administration* (FDA) als auch das „*European Committee for Proprietary Medicinal Products*“ sogar die individuelle Charakterisierung beider Enantiomere für eine Zulassung eines

racemischen Pharmazeutikums fordern. Im gleichen Zuge wurde jedoch die Beschleunigung von Zulassungsverfahren für optisch reine Pharmazeutika festgelegt (chiral switch) (STRONG, 1999). Optisch aktive Substanzen zählen heute zu den wichtigsten pharmazeutischen Produkten (BREUER *et al.*, 2004). Chirale Vorstufen, Zwischenprodukte und Synthesebausteine machen einen geschätzten Anteil von 15 % des Marktes aus und kleine,

entantiomerenreine Moleküle wie *Lipitor*[®] oder *Zocor*[®], beides Präparate zur Regulierung des Cholesterinspiegels, waren die *Top-selling Drugs* der jüngeren Vergangenheit mit enormen Umsätzen von 14 Mrd. US\$ (2002) (ROUHI, 2003).

Die Gewinnung oder Darstellung optisch aktiver Substanzen in technischen Prozessen ist jedoch aufgrund der nahezu identischen physikalischen Eigenschaften ihrer Enantiomere nicht trivial. Hauptsächlich werden vier Prinzipien angewandt (BREUER *et al.*, 2004; PATEL,

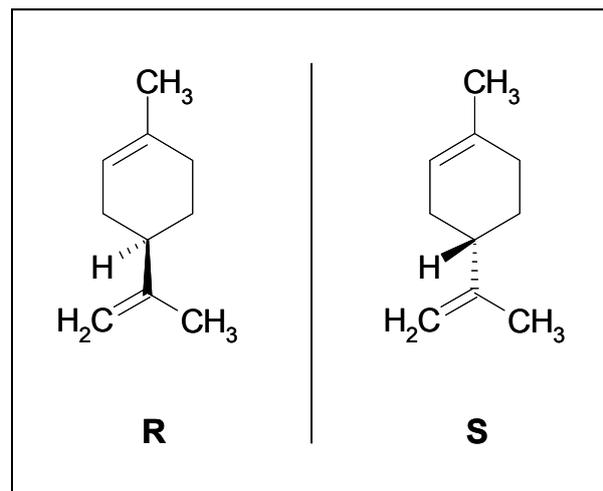


Abb. 1.1: Die beiden Enantiomere des Limonen

² Chiralität ist allgemeiner Symmetriebegriff, der jedoch in diesem Kontext auf Moleküle bezogen wird.

2001; COLLINS *et al.*, 1998): (1) Naturstoffe wie Milchsäure, Aminosäuren oder Terpene, die in ausreichender Menge und enantiomerenrein in natürlichen Quellen vorkommen, können aus solchen natürlichen Rohstoffen, dem so genannten „chiralen Pool“ (COLLINS *et al.*, 1998) gewonnen werden. Anzahl und Art der so zugänglichen Verbindungen ist jedoch begrenzt.

Eine ähnliche Limitierung besteht für (2) fermentativ hergestellte Produkte. Ihre Ausbeuten können jedoch durch gezielte Beeinflussung von Stoffwechselwegen deutlich erhöht und somit auch für die Herstellung von Metaboliten und Sekundärmetaboliten verwendet werden, die im chiralen Pool zu gering konzentriert sind, als dass sie effizient isoliert werden könnten. Jedoch können nicht-natürliche Verbindungen auch hier nicht zugänglich gemacht werden, wohl aber eventuelle Vorstufen (BOMMARIUS & RIEBEL, 2004).

Anders ist dies bei (3) der Auftrennung von racemischen Gemischen, die eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung optisch aktiver Substanzen darstellt. LOUIS PASTEUR war 1848 der erste, der dies anhand von Weinsäure durchführte. Die beiden Enantiomere dieser Säure kristallisieren separat und können anschließend mechanisch voneinander getrennt werden. Diese Methode findet auch heute noch technische Verwendung. Da jedoch nur rund 10 % der Racemate als Konglomerate kristallisieren, sind auch hier die Möglichkeiten limitiert. Chromatographische Möglichkeiten der Racematspaltung sind dagegen zahlreich, in Produktionsmaßstäben jedoch nur bedingt verwendbar, da relativ geringe Kapazitäten und hoher Lösungsmittelverbrauch häufig zu kostenintensiv sind. Eine elegante Methode ist die kinetische Racematspaltung unter Verwendung eines chiralen Katalysators, der eines der beiden Enantiomere schneller umsetzt als das andere. Neben geeigneten Übergangsmetallkomplexen oder organischen Katalysatoren werden dabei immer häufiger Enzyme eingesetzt, die bereits von Natur aus chiral und damit hochselektiv sind (GADLER *et al.*, 2006; GOTOR-FERNANDEZ *et al.*, 2006; BOCOLA *et al.*, 2003). Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die maximale Ausbeute bei 50 % liegt und das nicht umgesetzte Enantiomer vom Produkt abgetrennt und entsorgt bzw. recycelt werden muss. Neuere Verfahren sind so genannte dynamische kinetische Racematspaltungen, in denen das weniger umgesetzte Enantiomer *in situ* durch einen weiteren Katalysator racemisiert wird (BÄCKVALL, 2006; GADLER *et al.*, 2006).

Die (4) asymmetrische Synthese von optisch aktiven Substanzen aus prochiralen Vorstufen ist eine weitere, sehr häufig verwendete Methode (CHRISTMANN & BRÄSE, 2006). Auch hierbei werden chirale Katalysatoren eingesetzt, und es können Ausbeuten von bis zu 100 % in einem einzigen Reaktionsschritt ohne weitere Trennschritte erreicht werden. Auch bei diesen Verfahren kommen zunehmend Biokatalysatoren zum Einsatz (BÄCKVALL, 2006;

REETZ, 2006). Asymmetrische Synthese und kinetische Racematspaltung sind wohl die Zukunftsorientiertesten der genannten Verfahren, da hiermit auch nicht-natürliche Verbindungen darstellbar sind (BREUER *et al.*, 2004). Die entscheidende Rolle spielen hier die Katalysatoren, die die chirale Information enthalten müssen, welche an die Substratmoleküle weitergegeben wird.

1.4. Adaptionspotential und Optimierung von Biokatalysatoren

Die Frage, ob Biokatalysatoren oder konventionell-chemische Katalysatoren besser oder schlechter geeignet sind, lässt sich nicht allgemein beantworten, sondern hängt jeweils vom Einzelfall ab. Nachteile chemischer Verfahren liegen zumeist im hohen Lösungsmittelverbrauch oder in der Toxizität verwendeter Reaktionsbestandteile, denen mitunter auch der Katalysator selbst zugerechnet werden muss. Auch dessen Herstellung ist ein entscheidender Faktor und nicht selten mit toxischen Nebenprodukten verbunden. Biokatalysatoren dagegen sind zwar ungiftig, haben aber häufig den Nachteil geringer spezifischer Aktivität und Stabilität - besonders gegenüber nicht-natürlichen Substraten und in nicht-natürlichen Reaktionsumgebungen, die für solche Verbindungen oft erforderlich sind (COWARD-KELLY & CHEN, 2007; POLLARD & WOODLEY, 2007; PATEL, 2006). Dies wird verständlich, wenn man in Betracht zieht, dass der Stoffwechsel von natürlichen Organismen hoch komplex reguliert ist, so dass sehr hohe Umsatzraten von Enzymen oder Stabilität über lange Zeiträume nur selten erforderlich sind und für den jeweiligen Organismus sogar nachteilhaft sein könnten. Oft ist sogar das Gegenteil der Fall und es besteht Produkt- oder Substrathemmung zur Aufrechterhaltung der Stoffwechselgleichgewichte (JOHANNES & ZHAO, 2006). Stabilität gegenüber organischen Substanzen oder extremen pH-Werten sind im Stoffwechsel nur selten ein Kriterium. Dies bedeutet aber nicht, dass solche Umgebungsbedingungen den entsprechenden Enzymen nicht zugänglich sind – Enzyme sind höchst anpassungsfähig, was eine entscheidende Grundlage ihrer natürlichen Evolution ist. Protein-Entwicklern ist so die Möglichkeit gegeben, die Eigenschaften technischer Enzyme an viele neue Anforderungen zu adaptieren, was in der Vergangenheit bereits häufig erfolgreich durchgeführt wurde (LEISOLA & TURUNEN, 2007; POLLARD & WOODLEY, 2007; GOTOR-FERNANDEZ *et al.*, 2006; KAUR & SHARMA, 2006; BREUER *et al.*, 2004; ARNOLD & GEORGIU, 2003; KRAGL *et al.*, 2002; JAEGER & REETZ, 2000; PETROUNIA & ARNOLD, 2000; ARNOLD & CHEN, 1994). Zwar können auch chemische Katalysatoren heute im Rahmen der kombinatorischen Chemie in gewissem Maße „maßgeschneidert“ werden, die Möglichkeiten

hierzu sind jedoch verglichen mit denen der modernen Enzymtechnologie, sowohl technisch als auch kommerziell gesehen, noch gering. Auch die Entwicklung der Biokatalyse steht noch am Anfang, jedoch wird ihr enormes Potential durch die Entwicklungen der letzten 10 bis 15 Jahren deutlich. (1.1). Bahnbrechend waren vor allem die Arbeiten von ARNOLD und STEMMER zur gerichteten Evolution in den 90er Jahren, die die Entwicklung des *Protein Engineering* maßgeblich vorantrieben (CRAMERI *et al.*, 1998; SHAO *et al.*, 1998; ZHAO *et al.*, 1998; ZHAO & ARNOLD, 1997; ARNOLD & CHEN, 1994; STEMMER, 1994a, b).

1.5. Protein Engineering

Die Erzeugung von Proteinen mit neuen oder veränderten Eigenschaften wird heute allgemein unter dem Begriff ‚*Protein Engineering*‘ zusammengefasst. Es kann sich dabei um die Veränderung der Eigenschaften bereits bestehender Proteine handeln oder aber um *de novo*-Synthesen völlig neuer Proteine, und sowohl katalytische als auch nicht-katalytische Proteine werden untersucht. Der überwiegende Anteil der Arbeiten auf dem Gebiet beschäftigt sich jedoch mit bereits bekannten Enzymen und deren Optimierung für Anforderungen der chemischen und biotechnologischen Industrie. Es werden die zwei unterschiedlichen Herangehensweisen des Rationalen Designs und der gerichteten Evolution verfolgt, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

1.5.1. Rationales Design

Das ‚Rationale Design‘ von Enzymen basiert auf bekannten Strukturinformationen über das jeweilige Zielprotein. Dies sind im Idealfall reale Kristall- oder NMR-Strukturinformationen. In Fällen, in denen eine reale Struktur noch nicht gelöst wurde, können aber auch Modelle, die anhand von Homologievergleichen *in silico* erstellt wurden, nützlich sein. Ist weiterhin der katalytische Mechanismus des jeweiligen Enzyms bekannt, können anhand dieser *in silico*-Modelle durch quantenmechanische und molekülmechanische (QM/MM) Modellierungs-methoden bzw. molekulardynamische Simulationen Möglichkeiten ermittelt werden, durch Austausch weniger Aminosäuren oder größere strukturelle Veränderungen die Eigenschaften des Enzyms in gewünschter Weise zu beeinflussen (DALBY, 2007; REETZ *et al.*, 2007). Neben der Qualität der initialen Strukturdaten sowie der Modellalgorithmen spielen hier Wissen und Erfahrung des Experimentators eine wesentliche Rolle. Die Möglichkeiten dieser Disziplin sind noch begrenzt, denn die Mechanismen der Enzymkatalyse sind auf

molekularem und atomarem Niveau äußerst komplex (WOLFSON *et al.*, 2005). Obwohl sich die Computertechnologie in jüngerer Vergangenheit stark weiterentwickelt hat, ist sie noch nicht leistungsstark genug, um Berechnungen von Molekularbewegungen und Energieflüssen von solcher Komplexität erschöpfend durchführen zu können. Der gegenwärtigen enormen Leistungssteigerungen auf diesem Gebiet geben jedoch Grund zu der Annahme, dass sich auch die *in silico* Modelle in naher Zukunft weiter verbessern werden und auch zunehmend industrielles Interesse finden (DALBY, 2007; HIBBERT *et al.*, 2005). Entscheidend sind weiterhin die Strukturdaten, auf denen die Berechnungen basieren. Kristallstrukturen entsprechen nicht immer den tatsächlichen Strukturen des Enzyms unter nativen Bedingungen und lassen nur bedingt Rückschlüsse auf das tatsächliche Verhalten der Enzyme in Lösung zu. Daher sind *in silico*-Modellierungen gegenwärtig noch als Näherungslösungen zu betrachten, jedoch kommen sie der Realität in manchen Fällen sehr nahe und es konnten in jüngerer Vergangenheit bereits große Erfolge mit dieser Methode erzielt werden (REETZ *et al.*, 2006c; REETZ *et al.*, 2005; WOLFSON *et al.*, 2005). Rationales Design bietet sich als erster Schritt in einem Protein Engineering-Ansatz an, denn durch Modellierungen und Vorversuche *in silico* lassen sich Problemstellungen eingrenzen. So können aus Modellen und Berechnungen Rückschlüsse auf die am besten anzuwendende Methodik abgeleitet werden sowie auf besonders zu berücksichtigende Bereiche, die anschließend gezielt und fokussiert verändert werden können (DALBY, 2007; REETZ *et al.*, 2006c). Umgekehrt dienen experimentelle Daten wiederum zur Verfeinerung der Modelle und Algorithmen des Rationalen Design (BOCOLA *et al.*, 2004). Erfolge dieser Synergie von Rationalem Design und gerichteter Evolution zeigten sich in jüngerer Zeit u. a. in den Arbeiten von FUNKE, (2005; 2003), BOCOLA, (2004), sowie REETZ (2007; 2006c) und sind nicht zuletzt auch Gegenstand dieser Arbeit.

1.5.2. Gerichtete Evolution

Im Gegensatz zum Rationalen Design sind für Methoden der Gerichteten Evolution keine Kenntnisse über Struktur und katalytische Mechanismen der Enzyme erforderlich, sondern es werden ausschließlich die Prinzipien der natürlichen Evolution angewendet. CHARLES DARWIN beschrieb 1859 die Entwicklung der Arten durch zufällige Mutation und natürliche Auslese, bei der nur die am besten angepassten Organismen ihr genetisches Material langfristig weitergeben können. Darwin bezeichnete dies als „*survival of the fittest*“. Die gerichtete Evolution im Labormaßstab verwendet das evolutive Prinzip auf Ebene einzelner

Proteine und Nukleinsäuren. Die DARWINSche „Fitness“ bezieht sich dabei auf die zu optimierende Eigenschaft des jeweiligen Proteins, während die Auslese, die unter natürlichen Bedingungen durch Konkurrenz der Arten und Umwelteinflüsse realisiert ist, im Labor durch den Experimentator erfolgt. Erstmals experimentell angewandt wurde das Prinzip von (MILLS *et al.*, 1967) für Nukleinsäuren. MANFRED EIGEN leistete weitere Pionierarbeit (EIGEN, 1986, 1984), bevor die Methodik in den neunziger Jahren einen Aufschwung erfuhr, angestoßen durch die Arbeiten von ROBERTS *et al.* (1992), CHEN & ARNOLD (1993) sowie Stemmer (1994a; b), die das Verfahren erstmals auf Enzyme anwendeten. In der Folge wurden die Methoden der Proteinevolution kontinuierlich weiterentwickelt und erfolgreich

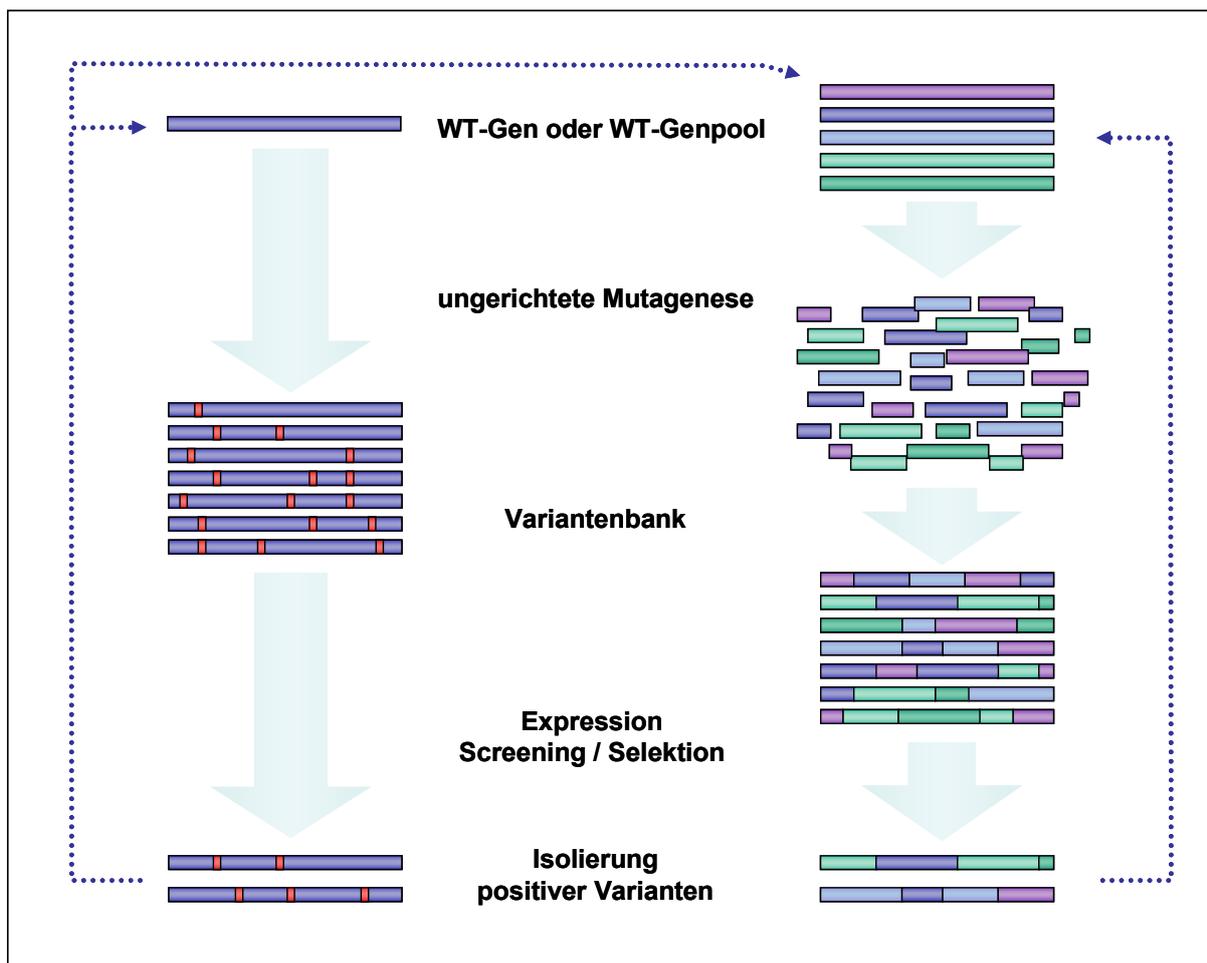


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Prinzips der gerichteten Evolution. (links) Die Erzeugung genetischer Diversität durch sequentielle Mutagenese und (rechts) durch rekombinative Methoden. Der jeweiligen Mutagenese folgt die Auswahl positiver Varianten durch Screening oder Selektion. Diese können erneute Zyklen aus Mutagenese und Selektion durchlaufen, bis ihre Eigenschaften optimiert sind. Varianten die aus sequentieller Mutagenese entstanden sind, können auch in einem zweiten Schritt rekombinativ weiterentwickelt werden.

für die Optimierung verschiedenster Eigenschaften von Enzymen eingesetzt (DALBY, 2007; WANG *et al.*, 2006; BORNSCHEUER, 2005; ADAMCZAK & KRISHNA, 2004). Das Verfahren der

gerichteten Evolution ist ein zyklischer Prozess aus (1) Erzeugung genetischer Diversität und (2) Auswahl verbesserter Varianten (Abb. 1.2). Genetische Diversität wird im Labor durch verschiedene Mutageneseverfahren erzeugt (Tab 1.2), während der Selektionsdruck angelegt wird, indem entweder ein Selektionssystem eingesetzt wird, in welchem die Qualität der zu optimierenden Eigenschaft des Proteins der kritische Faktor für das Fortbestehen der exprimierenden Spezies ist, oder durch ein Screeningverfahren, in welchem jede einzelne Variante auf die Qualität dieser Eigenschaft hin untersucht wird. Varianten bei denen sich die entsprechende Eigenschaft verbessert hat, werden isoliert und gegebenenfalls einem erneuten Prozess aus diesen beiden Schritten unterzogen, solange, bis die gewünschte Qualität erreicht ist oder aber keine weitere Verbesserung beobachtet wird. Der Ablauf des Verfahrens ist in Abb. 1.2 schematisch dargestellt.

Die Grenzen der Evolvierbarkeit sind in Theorie und Praxis sehr unterschiedlich und können multidimensional sein. In der Praxis bestehen die wesentlichen Beschränkungen in den experimentellen Möglichkeiten.

Mutageneseverfahren

Seit den 90er Jahren wurden viele verschiedene Mutageneseverfahren publiziert, von denen die bekanntesten in Tab. 1.2 zusammengestellt sind. Generell wird zwischen sequentiellen (nicht-rekombinativen) und rekombinativen Methoden unterschieden. Die sequentiellen Verfahren erzeugen neue Mutationen, Insertionen oder Deletionen innerhalb einer DNA-Sequenz, während rekombinative Methoden verschiedene Gene miteinander vermischen, wobei Synergieeffekte durch neue Kombinationen einzelner Elemente entstehen können. Rekombinative Verfahren lassen sich weiterhin unterteilen in homologiebasierte Verfahren und solche, bei denen Homologie kein Kriterium für eine erfolgreiche Rekombination darstellt. Bei den sequentiellen Verfahren handelt es sich im Prinzip um Weiterentwicklungen der fehlerhaften PCR (epPCR), bei der in einer die intrinsische Fehlerrate der *Taq*-DNA-Polymerase erhöht wird (ECKERT & KUNKEL, 1990; TINDALL & KUNKEL, 1988). Dies kann durch Zugabe von erhöhten Konzentrationen $MgCl_2$ und $MnCl_2$ erfolgen oder aber durch ungleiche Konzentrationen von Nukleosiden, so dass vermehrt Basenfehlpaarungen auftreten (CIRINO *et al.*, 2003; ZACCOLO *et al.*, 1996; CADWELL & JOYCE, 1994, 1992).

Weiterhin werden heute bereits kommerzielle DNA-Polymerasen mit erhöhter intrinsischer Fehlerrate und Mutagenese-Kits für diese Anwendungen angeboten, wie z.B. *Mutazyme* im *GeneMorph-Kit* (STRATAGENE) oder das *Diversify PCR Random Mutagenesis Kit*

(CLONTECH). Nachteil dieser Verfahren ist die unterschiedliche Häufigkeit, mit der die möglichen Basenaustausche stattfinden, d.h. einige Fehler kommen öfter vor als andere. Dies liegt zum einen an der gewählten Methode und kann durch eine Kombination mehrerer PCR-basierter Methoden minimiert werden (PATRICK *et al.*, 2003; ROWE *et al.*, 2003). Zum

Tab. 1.2: Übersicht über die gängigen Methoden der ungerichteten Mutagenese

Methode	Referenz
sequentielle (nicht-rekombinative) Methoden	
error-prone PCR (epPCR)	ZACCOLO <i>et al.</i> (1996) CADWELL & JOYCE (1994) ZHOU <i>et al.</i> (1991) TINDALL & KUNKEL (1988)
error-prone Rolling Circle Amplification (epRCA) „Bringer“-Strategie	FUJII <i>et al.</i> (2004) BICHET <i>et al.</i> (2004)
kombinatorische Kassettenmutagenese	BORREGO <i>et al.</i> (1995) CRAMERI & STEMMER (1995)
Mutatorstämme	NGUYEN & DAUGHERTY (2003) GREENER <i>et al.</i> (1996)
Sättigungsmutagenese	ZHENG <i>et al.</i> (2004); GEORGESCU <i>et al.</i> (2003); AIRAKSINEN & HOVI (1989)
Random Insertions and Deletions (RID)	MURAKAMI <i>et al.</i> (2003, 2002)
MAX-Randomization	HUGHES <i>et al.</i> (2003)
Codon Shuffling	CHOPRA & RANGANATHAN (2003)
MegaWHOP	MIYAZAKI, K. (2003)
Sequence Saturation Mutagenesis (SeSaM)	WONG <i>et al.</i> (2004)
Frame Shuffling	KASHIWAGI <i>et al.</i> (2006)
homologie-basierte rekombinative Methoden	
DNA-Shuffling	STEMMER (1994a, b)
Family Shuffling	CRAMERI <i>et al.</i> (1998)
High-Fidelity Shuffling	ZHAO & ARNOLD (1997)
Random Priming and Recombination (RPR)	SHAO <i>et al.</i> (1998)
Staggered Extension Process (StEP)	ZHAO <i>et al.</i> (1998)
Random Chimeragenesis on Transient Templates (RACHITT)	COCO <i>et al.</i> (2001)
Degenerate Oligonucleotide Shuffling (DOGS)	GRIBBS <i>et al.</i> (2001)
Mutagenic Unidirectional Reassembly (MURA)	SONG <i>et al.</i> (2002)

Degenerate Homoduplex Recombination (DHR)	COCO <i>et al.</i> (2002)
Synthetic Shuffling	NESS <i>et al.</i> (2002)
Assembly of Designed Oligonucleotides (ADO)	ZHA <i>et al.</i> ,(2001)
Recombined Extension on Truncated Templates (RETT)	LEE, S. H. <i>et al.</i> (2003)
Multiplex-PCR-based Recombination (MUPREC)	EGGERT <i>et al.</i> (2005)
Nucleotide Excision and Exchange (NExT)	STEBEL <i>et al.</i> (2007); MÜLLER <i>et al.</i> (2005)

nicht-homologie-basierte rekombinative Verfahren

Incremental Truncation for the creation of Hybrid Enzymes (ITCHY)	OSTERMEIER <i>et al.</i> (1999)
SCRATCHY	LUTZ <i>et al.</i> (2001)
Sequence Homology Independent Protein Recombination (SHIPREC)	SIEBER <i>et al.</i> (2001)
Structure-based Combinatorial Protein Engineering (SCOPE)	O'MAILLE <i>et al.</i> (2002)
Sequence-Independent Site-Directed Mutagenesis (SISDC)	HIRAGA & ARNOLD (2003)
Block Shuffling	TSUJI <i>et al.</i> (2006)

anderen aber liegt es an der Natur des genetischen Codes selbst, da einige Aminosäuren durch mehr Codons repräsentiert werden als andere. Mutationen in Richtung solcher Aminosäuren treten in ungerichteten Mutageneseverfahren daher statistisch häufiger auf. Diese Tendenzen werden in Sättigungsmutagenesen vermieden, in denen sichergestellt ist, dass an gegebenen Positionen jede mögliche Aminosäure mit gleicher Häufigkeit vertreten ist (MIYAZAKI & ARNOLD, 1999). Die Methodik wurde in verschiedenen Arbeiten weiter optimiert. So wird z.B. bei der MAX-Randomization Methode (HUGHES *et al.*, 2003) ein für *E. coli* optimierter Codon-Satz verwendet. Mit der SeSaM-Methode können sämtliche Codons eines Gens sequentiell randomisiert werden (WONG, J. *et al.*, 2004).

Es wurden außerdem verschiedene sequenzverlängernde und -verkürzende Methoden entwickelt. Mit der *Codon-Shuffling*-Methode von CHOPRA & RANGANATHAN (2003) z.B. können durch Einsatz sog. ‚Dicodons‘ Insertionen randomisierter Zusammensetzung und Länge an bestimmten Positionen in Gene eingefügt werden. Die Methode *Random Insertions and Deletions* (RID) von MURAKAMI *et al.* (2002) beschreibt ein Verfahren mit dem Codons an randomisierten Positionen in Gene eingefügt und deletiert werden können. Ähnlich funktioniert *Frame-shuffling* (KASHIWAGI *et al.*, 2006). Auch zur Einfügung längerer

Deletionen und repetitiver Sequenzen wurden beschrieben (PIKKEMAAT & JANSSEN, 2002) (Tab 1.2).

Bei rekombinativen Methoden werden verschiedene Gene fragmentiert, die Fragmente miteinander vermischt und je nach Methode auf unterschiedliche Art und Weise zusammengefügt, so dass Hybrid-Gene entstehen. Die erste dieser Methoden, *DNA-Shuffling*, wurde von STEMMER, (1994a; 1994b) beschrieben, bei der homologe Gene mittels DNase I partiell verdaut werden und anschließend in einem PCR-Schritt, der sog. *reassembly-PCR*, hybridisiert und elongiert werden. Dabei finden zu einem gewissen Prozentsatz Hybridisierungen nicht-identischer Fragmente statt, wodurch die genetische Information vermischt wird. Zusätzlich treten Punktmutationen auf. Aufbauend auf diesem Grundprinzip der *in vitro*-Rekombination wurden viele weitere homologie-basierte Methoden erarbeitet, die sich entweder durch die Art und Effizienz der DNA-Fragmentierung und somit Erhöhung der Diversität oder aber durch Effizienzsteigerung bei der Rekombination unterscheiden (Tab 1.2). Optimierungen wurden von Zhao & Arnold (ZHAO & ARNOLD, 1997) durchgeführt. Weitere geringfügigere Variationen der Methode, u.a. von KIKUCHI *et al.* (1999), MIYAZAKI (2002), KITAMURA *et al.* (2002) oder QIANG *et al.* (2004) wurden in Tab 1.2 nicht angegeben. Bei allen Verfahren ist jedoch Homologie der Sequenzen der verwendeten Gene die Voraussetzung.

Dieser limitierende Faktor spielt bei den sequenz-unabhängigen Rekombinationsverfahren keine Rolle mehr. Bei der von OSTERMEIER *et al.* (1999) entwickelten Methode *Incremental Truncation* (ITCHY) werden Gene mittels Exonuklease III jeweils von ihren 5'- und 3'-Termini her so verkürzt, dass Fragmente, bzw. Gen-„Enden“ (*Truncations*) unterschiedlicher Länge entstehen. Anschließend werden die komplementären „Enden“ miteinander rekombiniert, so dass eine Bank aus künstlichen Einfach-Crossover-Varianten entsteht. Dasselbe wird auf abgewandeltem Wege durch die Methode *Sequence Homology Independent Protein Recombination* (SHIPREC) von SIEBER *et al.* (2001) erreicht. Multiple Crossover zwischen nicht-sequenzzhomologen Genen können durch komplexere Methoden erreicht werden wie *Sequence-independent site-directed Chimeragenesis* (SISDC) von HIRAGA & ARNOLD (2003) sowie mit *Structure-based Combinatorial Protein Engineering* (SCOPE) (O'MAILLE *et al.*, 2002), wobei letztere mit synthetischen Oligonukleotiden arbeitet. Auf etwas weniger komplexem Wege wird dieses Ziel erreicht mittels *Block shuffling* (TSUJI *et al.*, 2006).

Screening- und Selektionsverfahren

Zweiter wesentlicher Schritt jeder gerichteten Evolution von Enzymen ist die Auswahl der verbesserten Varianten mittels Hochdurchsatz-Screeningverfahren oder Selektionssystemen. Entscheidender Unterschied ist, dass in Screeningverfahren zunächst alle entstandenen Enzymvarianten einzeln auf die relevante Eigenschaft hin untersucht werden, in Selektionsverfahren hingegen werden inaktive systematisch ausgeschlossen und aktive akkumuliert. Beide Verfahren bieten entscheidende Vor- und Nachteile. Entscheidender Vorteil der Selektionssysteme ist die Möglichkeit eines sehr viel höheren Durchsatzes im Vergleich zu Screeningverfahren. Generell unterscheidet man zwischen *in vivo* und *in vitro*-Systemen. Bei *in vivo*-Systemen, auch „Wuchs-Selektion“ oder „genetische Selektion“ genannt, ist die Funktion des zu selektierenden Proteins mit der Vitalität der exprimierenden Zelle gekoppelt (VAN SINT FIET *et al.*, 2006), beispielsweise durch genetische Komplementation auxotropher Mutanten. In einem solchen Verfahren wird eine letale, chromosomale Gendeletion durch das zu evolvierende plasmidcodierte Enzym physiologisch ausgeglichen (PARIKH *et al.*, 2006; GRIFFITH *et al.*, 2004; DESANTIS *et al.*, 2003). Durch die Mutagenese inaktivierte Enzymvarianten können diesen Ausgleich nicht erfüllen, wodurch Zellen mit positiv mutierten Enzymen einen Wuchsvorteil erlangen und angereichert werden können.

In Ansätzen, die dagegen auf chemischer Komplementation des Zellwachstums beruhen, ist das Überleben des Wirtes allein abhängig vom Umsatz des Substrates, z.B. indem ein ansonsten toxisches Substrat durch seinen Umsatz detoxifiziert, wird oder aber das jeweilige Produkt den Zellwuchs erst ermöglicht oder stark beschleunigt (SENGUPTA *et al.*, 2004; BAKER *et al.*, 2002). Problem dabei ist die Diffusion des Substrates bzw. Produktes, durch die die erwünschten Zellen mitunter in Mitleidenschaft gezogen werden.

Auch *in vitro*-Selektionssysteme koppeln den Genotyp mit phänotypischer Information, die jedoch in diesem Fall nicht mit dem Überleben der Zelle, sondern direkt mit der zu evolvierenden Eigenschaft der jeweiligen Enzyme. So werden beispielsweise in *Display*-Strategien die Variantengene durch Klonierung mit M13-Hüllproteinen oder Signalpeptiden fusioniert, die ihre Verankerung an Oberflächen von Phagen (*Phage-Display*), Zellen (*Cell-surface-display*) oder Ribosomen (*Ribosome-Display*) bewirken (VAN SINT FIET *et al.*, 2006; OTTEN & QUAX, 2005; LEE, S. H. *et al.*, 2003a; SAMUELSON *et al.*, 2002). Diese können basierend auf der Affinität des oberflächenlokalisierten Enzyms zu einem immobilisierten Substrat ausselektiert werden (OTTEN & QUAX, 2005; BAI & FENG, 2004). Eine direkte *in vitro*-Selektion auf Basis katalytischer Aktivität ist aufgrund der Diffusion der

Reaktionsprodukte allerdings schwierig. Sie erfordert eine direkte physikalische Verbindung des Produktes mit dem Ort der Katalyse und ist daher nur in speziellen Fällen möglich, beispielsweise für DNA-modifizierende Enzyme, deren eigene Gene auch gleichzeitig ihr Substrat darstellen (BERTSCHINGER *et al.*, 2005; COHEN, H. M. *et al.*, 2004; LEE, Y. F. *et al.*, 2002). Zwar wurden in jüngster Zeit Oberflächendisplay-Systeme entwickelt in denen Enzym und Substrat auf derselben Oberfläche miteinander gekoppelt sind (ROUTENBERG LOVE *et al.*, 2006; STROBEL *et al.*, 2003), jedoch ist dies abhängig von der Eignung des jeweiligen Substrates nur in Einzelfällen praktikabel. Darüberhinaus können Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Partikeln nicht ausgeschlossen werden. Von den genannten Systemen bietet *Cell-surface-display* im Vergleich zu den anderen wohl die meisten Anwendungsmöglichkeiten (VAN SINT FIET *et al.*, 2006), da Zellen erheblich größer und leichter zu handhaben sind als Phagen oder Ribosomen, bei denen darüberhinaus aufgrund der Größenverhältnisse von Enzym zu Partikel die Detektion größerer Enzyme Schwierigkeiten bereiten kann.

Selektionssysteme bieten zwar den Vorteil des äußerst hohen Durchsatzes von 10^{11} - 10^{13} Varianten pro Generation, nachteilig ist jedoch, dass die Etablierung eines solchen Systems teils mit erheblichem Aufwand verbunden ist. Die Konstruktion auxotropher Mutanten beispielsweise erfordert umfangreiche genetische Vorarbeiten. Auch können auxotrophe Mutanten nur für lebenswichtige Reaktionen des natürlichen Stoffwechsels konstruiert werden. In Display-Systemen ist darüberhinaus die Konstruktion aktiver Fusionsproteine sowie deren nativer Transport durch die jeweiligen Kompartimente (Phagenhülle oder Zellmembran) ein kritischer Faktor. Zelleigene Proteaseaktivitäten stellen häufig einen Störfaktor dar indem sie die oberflächenlokalisierten Proteine zerstören. Auch ist die Information über die erhaltenen Varianten durch die Selektion allein meistens rein qualitativ. Im Anschluss muss jede Variante einzeln quantitativ untersucht werden um zu bewerten, ob sie im Vergleich zum Ausgangskonstrukt tatsächlich verbessert ist oder nicht. Selektion von katalytischer Aktivität gilt daher nach wie vor als schwierig (BOERSMA *et al.*, 2007).

Alternativ zu reinen Selektionsverfahren, hat in den letzten Jahren die Kopplung oberflächenlokalisierter Enzymkatalyse mit co-lokalisierten fluorogenen Signalen an Bedeutung gewonnen. Solcher Art markierte Zellen können mittels Durchflusszytometrie (FACS) in äußerst hohem Durchsatz von bis zu 50.000 Zellen pro Sekunde detektiert werden (WILHELM *et al.*, 2007; FARINAS, 2006; BERNATH *et al.*, 2004). Alternativ zu den beschriebenen *Display*-Technologien kann hierbei auch die von TAWFIK & GRIFFITHS (1998) entwickelte Methode der *in vitro* – Kompartimentierung (IVC) eingesetzt werden, bei der

Wasser-in-Öl-Mikroemulsionen erzeugt werden, in deren Tröpfchen einzelne Gene eingeschlossen sind, die mittels zellfreier Translationssysteme exprimiert werden können. Jedoch handelt es sich bei diesen Methoden schon eher um Screening-Systeme als um Selektion, da hier zunächst auch negative Varianten vermessen werden. Darüberhinaus können bei FACS-basierten Methoden über die Signalstärke bereits qualitative Unterschiede zwischen den Partikeln detektiert werden.

In Screeningverfahren werden im Gegensatz zu Selektionsverfahren nach der Klonierung der Genbanken alle Varianten einzeln untersucht, wobei in den meisten Fällen direkte quantitative Aussagen getroffen werden können. Durch die zunehmend höher entwickelte Automatisierungstechnik, die ständig weiterentwickelte Miniaturisierung der Reaktionsvolumina und die stetig steigende Detektionsgenauigkeit wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Screeningverfahren in Mikrotiterplattenformaten entwickelt, die Bankgrößen von 10^5 Varianten erreichten (COHEN, N. *et al.*, 2001). Durch geschicktes „Pooling“, d.h. Kombination von mehreren Varianten pro Probe, kann diese Zahl um eine weitere Größenordnung ausgedehnt werden (POLIZZI *et al.*, 2006; POLIZZI *et al.*, 2005). Die höchsten Effizienzen sind mit klassischen Screeningverfahren auf indikativem Festmedium erreichbar, auf dem die Varianten-tragenden Klone ausplattiert werden können (REYMOND & BABIAK, 2007; AHARONI *et al.*, 2005; BORNSCHEUER, 2004). Aktive Klone werden durch Ausbildung von Höfen oder Verfärbungen sichtbar und können ausgesondert werden (KOUKER & JAEGER, 1987). Limitierender Faktor hierbei ist prinzipiell nur die Stabilität und Verfügbarkeit der Substrate, da sie einerseits in ca. 40-50 °C heißen Agar eingebracht werden und andererseits relativ große Mengen dafür benötigt werden. Höhere Durchsätze von 10^9 Varianten und mehr werden mit der bereits erwähnten Durchflusszytometrie (FACS) erreicht, bei der einerseits nicht-fluorogene Zellen oder Partikel systematisch aussortiert werden können, andererseits die Fluoreszenzsignale bereits quantifiziert werden können (FARINAS, 2006; BECKER *et al.*, 2004). Jedoch existieren auch hier Limitierungen in der Bandbreite der Reaktionen, die mit detektierbaren Fluoreszenzsignalen gekoppelt werden können.

Mikrotiterplatten-basierte Screeningverfahren haben den großen Vorteil, dass nahezu jede Reaktion, die colorimetrisch oder fluorimetrisch detektiert werden kann, relativ einfach zugänglich ist. Dies bietet gegenüber Selektionsverfahren den enormen Vorteil der einfachen Handhabung ohne aufwändige genetische Vorarbeiten. Weiterhin können sich natürliche Reaktionen ohne die Notwendigkeit immobilisierter oder derivatisierter Substrate vermessen werden, beispielsweise anhand des gekoppelten Umsatzes natürlicher Cofaktoren wie NADH

und NADPH, der bei 340 nm photometrisch gemessen werden kann. Weiterhin sind von zahlreichen Substrate Derivate mit chromophoren Gruppen verfügbar. Darüberhinaus sind in der Literatur für viele katalytische Aktivitäten miniaturisierbare Enzymtests (*High-Throughput-Assays*) beschrieben (KNARZYCKA-BESSLER & JAEGER, 2006; CHARBONNEAU & OGILVIE, 2005; BORNSCHEUER, 2004; GODDARD & REYMOND, 2004). Aufgrund des relativ geringen Vorbereitungsaufwandes, vieler kommerziell verfügbarer und leicht detektierbarer Substrate und der unkomplizierten Durchführbarkeit im Vergleich zu Selektionsverfahren sind für die meisten Enzymoptimierungen mittels gerichteter Evolution daher Screeningverfahren die Methoden der Wahl.

1.6. Lipasen

Lipasen sind Carboxylesterhydrolasen, die bevorzugt wasserunlösliche Triacylglyceride in Di- und Monoacylglyceride sowie Glycerol und Fettsäuren hydrolysieren (Abb 1.3). Ihr natürliches Vorkommen erstreckt sich über das gesamte Organismenreich, so dass sie in Mikroorganismen zu finden sind, wo sie u.a. zur Verfügbarmachung von Fettsäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen, wie auch in Pflanzen und Tieren, wo sie beispielsweise bei der Verdauung von Fetten oder der Mobilisierung von Speicherlipiden eine zentrale Rolle spielen (BORGSTRÖM & BROCKMANN, 1994; WOOLLEY & PETERSEN, 1994). Da die Hydrolyse und Synthese von Esterbindungen in der Chemie äußerst häufig vorkommende Reaktionen sind, sind Lipasen durch ihr natürliches Substratspektrum für die Biotechnologie und die chemische Industrie von besonderer Bedeutung (SCHMID, R. D., 2006; KAZLAUSKAS & BORNSCHEUER, 1998). Die erstmalige Isolierung einer Lipase (aus Schweine-Pankreas) gelang WILLSTÄTTER im Jahre 1923. Eine vollständige Aufreinigung gelang jedoch erst VERGER 1969.

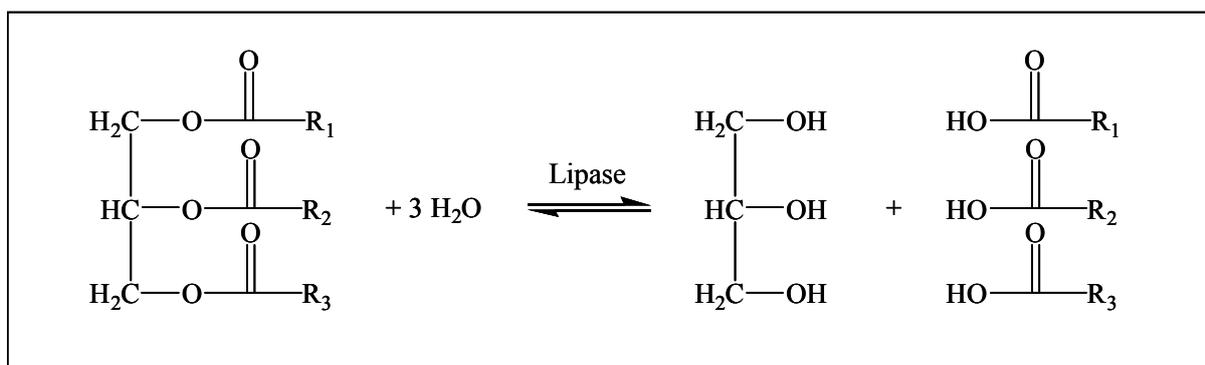


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse eines Triglycerides

1.6.1. Bedeutung der Lipasen für die Biotechnologie

Die ubiquitäre Verbreitung der Lipasen in der Natur rührt daher, dass die Klasse von Reaktionen die sie katalysieren (Hydrolyse), von zentraler Bedeutung für den Zellstoffwechsel nahezu aller Organismen ist. Hydrolysen von Fettsäureestern und auch die Umkehrreaktionen finden nahezu überall dort statt, wo organische Materie auf- oder abgebaut wird und so nehmen sie auch in der synthetischen organischen Chemie eine Schlüsselposition ein. Es besteht daher ein hohes Interesse an Katalysatoren, die solche Schlüsselreaktionen effizient und mit hohen Umsatzraten durchführen können und dies bei möglichst geringer Produktion von Abfallstoffen oder entsorgungspflichtigen Nebenprodukten (HERRERA, 2004). Lipasen erfüllen diese Ansprüche (GUPTA, R. *et al.*, 2004; JAEGER *et al.*, 1999). Sie sind eine der industriell am meisten genutzten Enzymfamilien, was neben ihrer hohen Verfügbarkeit aus natürlichen Quellen auf ihren nützlichen Eigenschaften für den praktischen Einsatz beruht: (1) Sie benötigen keine Cofaktoren und (2) sind durch ihre zumeist relativ einfache Faltung (1.6.4) stabil und daher (3) auch für Prozessführungen unter nicht-physiologischen Bedingungen verwendbar, wie z.B. in organischen Lösungsmitteln (GHANEM, 2007; GUPTA, N. & ROY, 2004; REETZ, 2002) oder ionischen Flüssigkeiten (KRAGL *et al.*, 2002). Sie haben (4) teils ein breites Substratspektrum und können an komplexen Substraten eingesetzt werden, (5) teils katalysieren sie Reaktionen äußerst spezifisch, vielfach sogar mit (6) hoher Regio- und (7) Stereoselektivität (BORNSCHEUER, 2002b; JAEGER & REETZ, 2000; JAEGER *et al.*, 1999).

Lipasen mit breiten Substratspektren werden überall dort verwendet, wo inhomogene Rohstoffe oder Substratgemische umgesetzt werden müssen, beispielsweise in Waschmitteln. Verschmutzungen können aus verschiedensten Fetten und Ölen bestehen und die Waschttemperaturen liegen häufig außerhalb des physiologischen Bereiches. Hier erweist sich daher außerdem die Temperatur- und pH-Stabilität der Lipasen als Vorteil (JAEGER & EGGERT, 2002). Engere Substratspektren sowie Regioselektivität sind beispielsweise gefordert in der Käseherstellung, wo Lipasen durch Spaltung der von Triglyceriden der Milch durch Freisetzung spezifischer Fettsäuren zur Aromabildung beitragen. (SCHMID, R. D., 2006). Auch bei der Verarbeitung und Veredelung von Fetten und Ölen (BORNSCHEUER, 2002b; SCHMID, U. *et al.*, 1999) wie bei der Herstellung von synthetischer Kakaobutter mit der Lipase aus *Rhizomucor mihei* ist Regioselektivität eine wichtige Anforderung (SCHMID, R. D., 2006). In der chemischen Industrie werden Lipasen als leistungsfähige Werkzeuge eingesetzt. Durch ihre hohe Substratspezifität und Enantioselektivität dienen sie als chirale Katalysatoren in kinetischen Racematspaltungen und Desymmetrisierungen (GADLER *et al.*,

2006; GOTOR-FERNANDEZ *et al.*, 2006; SAKAI *et al.*, 2005; SCHMID, A. *et al.*, 2001). Besonders von Bedeutung ist der Einsatz in organischen Lösungsmitteln, wo sie vornehmlich solche Synthesen katalysieren, die sie in wässrigen Lösungen nicht durchführen können (KAFTZIK *et al.*, 2002; KLIBANOV, 2001; LOUWRIER *et al.*, 1996). Dies spielt vor allem für die Totalsynthese komplexer Moleküle in der Schutzgruppenchemie eine wesentliche Rolle (KADEREIT & WALDMANN, 2001). Bedeutende Beispiele für den industriellen Einsatz sind die Nutzung der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* zur Herstellung chiraler Amine aus Amid-Vorstufen industriell, sowie der Einsatz der Lipase aus *Serratia marcescens* zur Herstellung des Blutdrucksenkers Diltiazem aus Oxiran-Vorstufen (SCHMID, R. D., 2006). Zuletzt sollte noch Erwähnung finden, dass Lipasen nicht nur bei der Herstellung von Pharmazeutika eine Rolle spielen, sondern auch selbst als solche eingesetzt werden können. Die Medikamente Creon[®] (Solvay-Pharma) und Merispase[®] (Meristem) beinhalten Pankreaslipasen des Schweines, die zur Therapie von exocriner Pankreasinsuffizienz z.B. bei Mukoviszidosepatienten eingesetzt wird. Bei letzterem wird dabei die Lipase nicht mehr aus dem Schweinepankreas selbst gewonnen, sondern seit 2005 aus transgenen Maispflanzen.

1.6.2. Kinetische Eigenschaften von Lipasen

Da viele der Vertreter der Carboxylesterhydrolasen ein komplexes Substratspektrum aufweisen und sich viele darin überschneiden, ist die exakte Unterteilung der lipolytischen Enzyme schwierig. Lipasen (EC 3.1.1.3) weisen besondere Ähnlichkeit mit den Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) und den Arylesterasen (EC 3.1.1.2) auf, aber auch mit der komplexen Gruppe der Phospholipasen (EC 3.1.x.x – verschiedene Einträge) und einigen

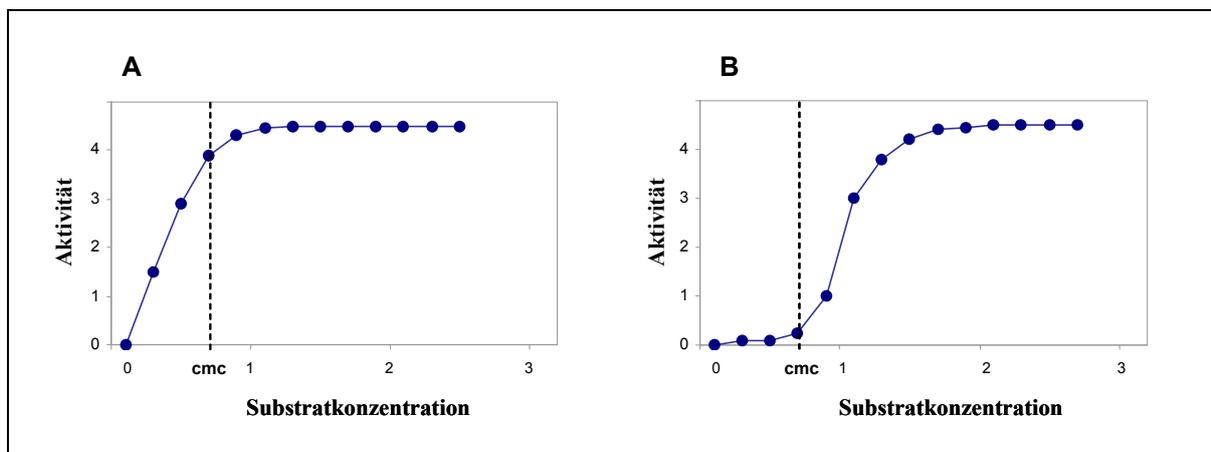


Abb. 1.4: Die Kinetik nach Michaelis-Menten (links) im Vergleich zur Interphasenaktivierung (rechts). In der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik steigt die Aktivität mit zunehmender Substratkonzentration an bis sie eine Sättigung erreicht, während interphasenaktivierte Enzyme erst bei Erreichen der kritischen Micellarkonzentration des Substrates (cmc) Aktivität zeigen, die erst dann ansteigt.

weiteren (IUBMB, 1992). Im Laufe der Zeit wurden daher verschiedene Ansätze verfolgt, um eindeutige Kriterien für ihre Differenzierung festzulegen. Einer der Ersten beruhte auf unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften. HOLWERDA *et al.* beschrieben 1936 das Phänomen der Interphasenaktivierung, das SCHÖNHEYDER & VOLQVARTZ 1945 bestätigten: Bei geringen Konzentrationen eines wasserunlöslichen Substrates war bei einer Lipase aus Schweineleber keine lipolytische Aktivität zu beobachten, bei höheren Konzentrationen und Emulsionsbildung aber stieg die Aktivität sprunghaft an (Abb. 1.4). SARDA und DESNUELLE zeigten dazu 1958 in detaillierten Untersuchungen, dass der Aktivitätssprung stets exakt bei Erreichen der kritischen Micellarkonzentration (cmc) erfolgt. Esterasen, die auch wasserlösliche Substrate umsetzen können, zeigten dieses Phänomen nicht, so dass es seitdem als Unterscheidungskriterium für die Definition von Lipasen von Esterasen galt. (VERGER *et al.*, 1969; SARDA & DESNUELLE, 1958; SCHÖNHEYDER & VOLQVARTZ, 1945; HOLWERDA *et al.*, 1936).

1.6.3. Katalytischer Mechanismus von Lipasen

Lipasen tragen als Nukleophil zumeist Serin in der katalytischen Triade. Das Serin liegt stets in der konservierten Anordnung Gly-X-Ser-X-Gly vor (Lipase-Konsensusmotiv). Die Säurefunktion wird von Aspartat (in wenigen Fällen Glutamat) übernommen und Histidin ist die dritte katalytische Aminosäure. Wird ein Substratmolekül umgesetzt, läuft die Hydrolyse ähnlich dem Mechanismus der Serin-Proteasen in zwei Schritten ab (JAEGER *et al.*, 1999) (Abb.1.5): Bei Bindung des Lipids findet zunächst der nukleophile Angriff des katalytischen Serins auf die Carbonylgruppe des Substrates statt, wobei das Serin durch den benachbarten katalytischen Histidinrest durch Abstraktion seines Protons aktiviert wird. Dies wiederum wird unterstützt durch die katalytische Säure, die durch ihre Wechselwirkung mit dem Proton des Histidins maßgeblich für die korrekte Orientierung des Imidazolringes verantwortlich ist und über dieselbe Wechselwirkung auch einen Teil der nun dort entstehenden positiven Ladung übernimmt. Im resultierenden tetraedrigen Übergangszustand ist die negative Ladung des Sauerstoffes des Substratcarbonyls, des ‚Oxyanions‘, in der Oxyanionentasche durch zwei NH-Gruppen des Proteinerückgrates, stabilisiert. Das am Histidin lokalisierte Proton wird anschließend auf das Sauerstoff der Abgangsgruppe des Substrates übertragen, wodurch die Alkoholfraktion des Produktes entsteht und sich entfernt. Der Acylrest des Substrates ist in dieser Phase kovalent an das katalytische Serin gebunden. Dieses kovalente

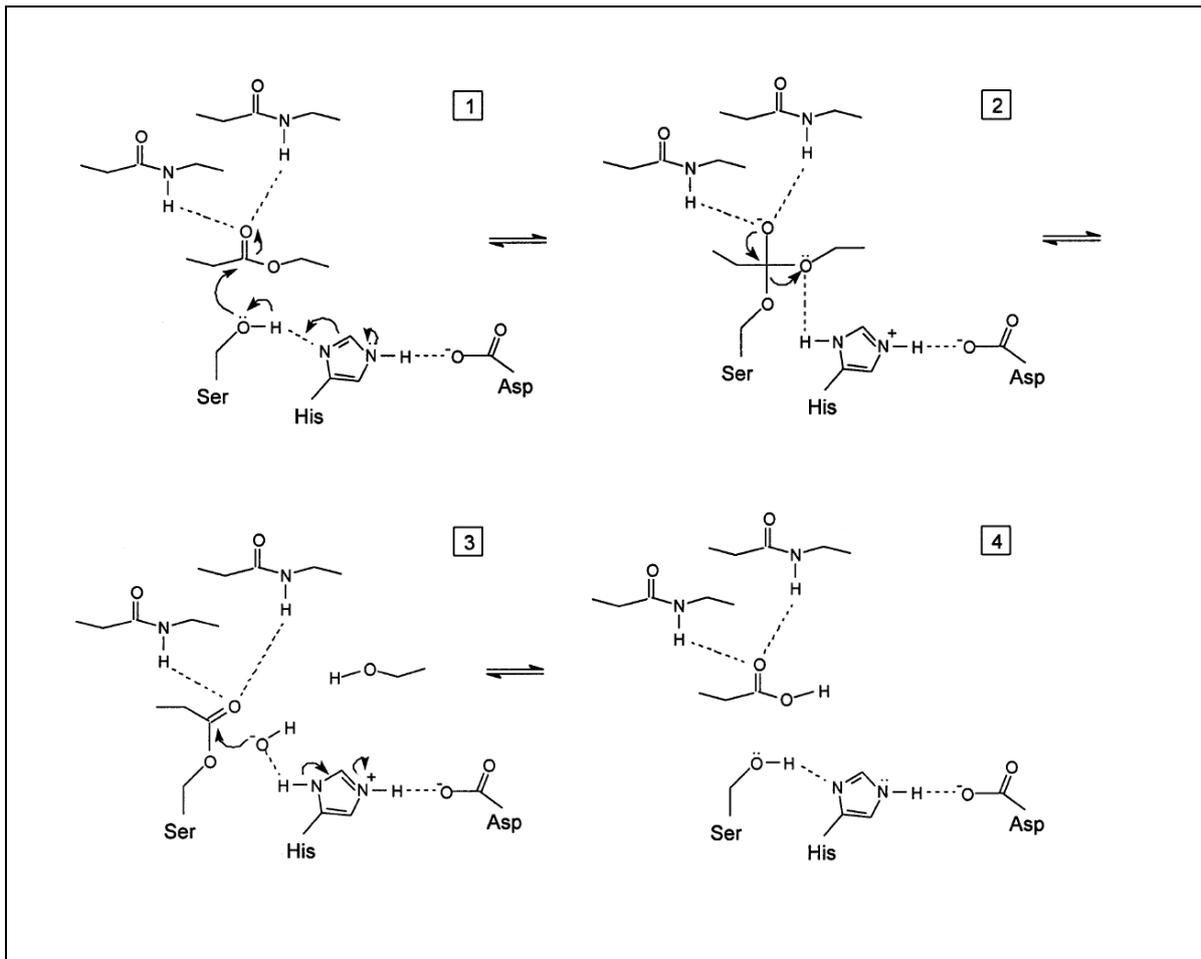


Abb. 1.4: Reaktionsmechanismus der enzymkatalysierten Lipolyse. [1] Stabilisiert durch die Aminosäuren His und Asp des aktiven Zentrums erfolgt durch das aktive Serin ein nukleophiler Angriff auf die Carbonylgruppe des Substrates, woraufhin nach einem [2] tetraedrischen Übergangszustand im sog. „Acylenzym“ [3] der Säureanteil des Substrates als kovalentes Zwischenprodukt an das aktive Serin gebunden ist. Nach einem erneuten nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls am Carbonyl-Kohlenstoff wird das aktive Serin reprotoniert und die Säure löst sich aus dem aktiven Zentrum. Die beiden Amidgruppen der Oxyanionentasche stabilisieren den Carbonylsauerstoff des Substrates während der Reaktion (JAEGER *et al.*, 1999).

Intermediat, das „Acyl-Enzym“ wird im zweiten Schritt der Reaktion durch ein Wassermolekül hydrolysiert, welches zuvor wiederum durch Abstraktion eines Protons durch das katalytische Histidin aktiviert wird. Durch das resultierende OH⁻ erfährt der Carbonylkohlenstoff des Substrates einen erneuten nukleophilen Angriff, dessen tetraedrischer Übergangszustand in der gleichen Weise stabilisiert wird, wie im ersten Schritt der Reaktion. Wird nun das Proton am Histidin auf das katalytische Serin übertragen, löst sich die Acyl-Fraktion vom aktiven Serin und entfernt sich. Das Serin ist somit wieder in seinem ursprünglichen Zustand und eine neue Reaktion kann stattfinden. Hinweise auf diesen Mechanismus gaben umfangreiche strukturelle Analysen von Lipasen, die mit spezifischen Inhibitoren co-kristallisiert wurden (LANG *et al.*, 1998; LONGHI *et al.*, 1997; EGLOFF *et al.*,

1995; DEREWENDA *et al.*, 1994b; GROCHULSKI *et al.*, 1994a), aber auch strukturell eng verwandter Enzyme wie der Haloalkan-dehalogenase (VERSCHEUREN *et al.*, 1993).

1.6.4. Struktur der Lipasen: Die α/β -Hydrolasefaltung

Strukturell gehören Lipasen zur Familie der α/β -Hydrolasen, einer großen und heterogenen Gruppe von Enzymen, denen ein gemeinsames Faltungsprinzip zu Grunde liegt. Kern dieser Faltung, die 1992 von OLLIS *et al.* entdeckt wurde, ist die sogenannte kanonische α/β -Hydrolasefaltung (Abb. 1.6). Es handelt sich dabei um eine Anordnung aus einem zentralen β -Faltblatt, das von sechs α -Helices umgeben ist. Es besteht aus sieben parallelen und einem antiparallelen β -Strang ($\beta 1$ - $\beta 8$) und ist in den meisten Fällen in links-Richtung verdrillt, wobei sich der Grad der Drehung stark unterschiedlich sein kann. Ebenso unterschiedlich ist die räumliche Anordnung der umgebenden α -Helices (αA - αE). In einigen Fällen fehlen manche Helices gänzlich, αC ist jedoch relativ konserviert. Sie spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der korrekten Positionierung des Nucleophils - Serin, Cystein oder Aspartat - im aktiven Zentrum.

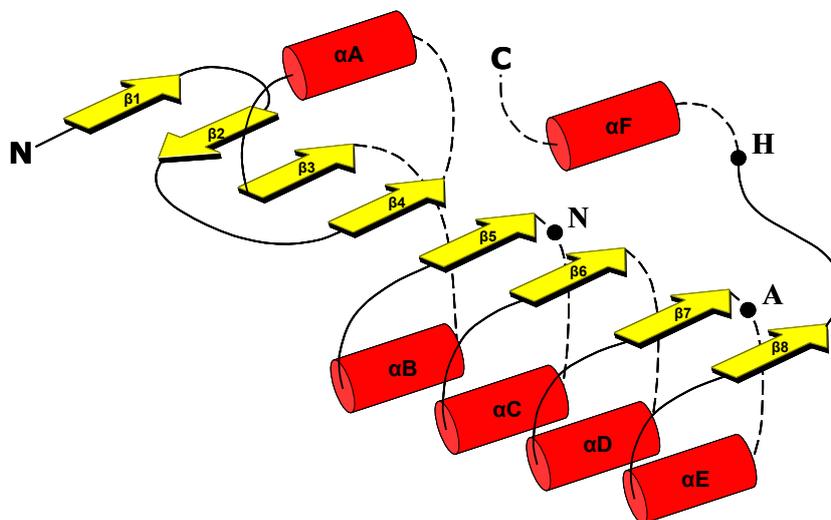


Abb.1.6: Die kanonische α/β -Hydrolasefaltung.

Das Nucleophil ist stets an einer äußerst stark gekrümmten, rigiden Schleife des Rückgrates direkt im Anschluss an $\beta 5$ lokalisiert, dem sogenannten „Nucleophilen Ellenbogen“, ein „strand-turn-helix“- Motiv. Durch die hohe Rigidität dieses Motivs wird das Nucleophil in energetisch ungünstigen Torsionswinkeln gehalten und die benachbarten Aminosäuren sind dadurch sterisch stark eingeschränkt. Der Nucleophile Ellenbogen ist weiterhin mitbeteiligt

an der Ausbildung der Oxyanionentasche, die üblicherweise von zwei Stickstoffatomen gebildet wird, von denen eines der Aminosäure entstammt, die dem Nukleophil in der Sequenz nachfolgt, das andere zu einer Aminosäure gehört, die in den meisten Fällen zwischen α A und β 3 liegt. Die Säurefunktion der katalytischen Triade wird zumeist von einem Aspartatrest ausgeübt, der sich hinter dem Strang β 7 befindet. Dritte Aminosäure der Triade ist ein hoch konserviertes Histidin, dessen Position sich jedoch von Vertreter zu Vertreter unterscheiden kann.

Die genannten Merkmale verbinden die α/β -Hydrolasen wie eine Art kleinster gemeinsamer Nenner, d.h. dies sind die Strukturelemente, die die meisten der Vertreter dieser Enzyme gemeinsam haben. Darüber hinaus unterscheiden sich die α/β -Hydrolasen aber durch unterschiedlich viele, teils große Insertionen, die in manchen Fällen sogar ganze Domänen bilden und jedem Enzym ihre charakteristischen Funktionen verleihen (HEIKINHEIMO *et al.*, 1999; NARDINI & DIJKSTRA, 1999).

Die Faltung ist Basis für Enzyme verschiedenster Substratspezifitäten. So findet man sie nicht nur bei Lipasen und Esterasen, sondern auch bei Dehalogenasen, Epoxidhydrolasen, vielen Proteasen, Thioesterasen, Peptidasen, sowie bei einigen nicht-enzymatischen Proteinen (RENAULT *et al.*, 2005). Seit der Entdeckung dieser Faltung 1992 wurden Vertreter dieser Strukturfamilie in der Datenbank ESTHER gesammelt (HOTELIER *et al.*, 2004). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt enthält sie 14.335 Einträge, die sich in insgesamt 90 Unterfamilien gliedern. Strukturell aufgeklärt wurden bislang 145 Proteinen aus 41 Unterfamilien. Auch sind viele Proteine noch unbekannter Funktion in der Datenbank enthalten.

1.6.5. Die Bedeutung der Deckelstruktur von Lipasen

Der Grund für das spezielle kinetische Verhalten der Lipasen (1.6.2) wurde erst aufgeklärt, nachdem ab 1990 die ersten Molekülstrukturen von Lipasen mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt wurden (GROCHULSKI *et al.*, 1994a; LAWSON *et al.*, 1994; VAN TILBEURGH *et al.*, 1993; BRZOWSKI *et al.*, 1991; WINKLER, F. K. *et al.*, 1990). Es zeigte sich, dass sich in direkter Nähe des aktiven Zentrums eine Peptidschleife (*loop*) befindet, die in Abwesenheit eines Substratmoleküls über dem aktiven Zentrum liegt und dieses verdeckt (Abb. 1.7). In Kristallstrukturen, in denen sich ein komplexierter Inhibitor im aktiven Zentrum befand, der zur Simulation des Übergangszustandes des Substrates diente, lag dieser *loop* in einer veränderten Konformation vor, das aktive Zentrum lag frei und rundherum war eine große hydrophobe Fläche exponiert. Die Röntgenkristallographischen Untersuchungen zeigten

weiterhin, dass dieser Loop bei einigen Lipasen sehr flexibel geartet (DEREWENDA *et al.*, 1994a; GROCHULSKI *et al.*, 1994b). MARTINELLE und HULT postulierten daraufhin, dass sich Lipasen in zwei Zuständen – geöffnet und geschlossen – befinden können, die sich im Gleichgewicht miteinander befinden.

Liegt jedoch eine Interphase und somit eine vorwiegend hydrophobe Umgebung vor, verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der offenen Konformation, in der die große hydrophobe Fläche rund um das aktive Zentrum exponiert ist. Die mobile Peptidschleife funktioniert bei der Lipolyse also wie eine Art Deckel (eng.: lid), der sich je nach Beschaffenheit der Umgebung öffnet und schließt (vgl. 1.6.3)

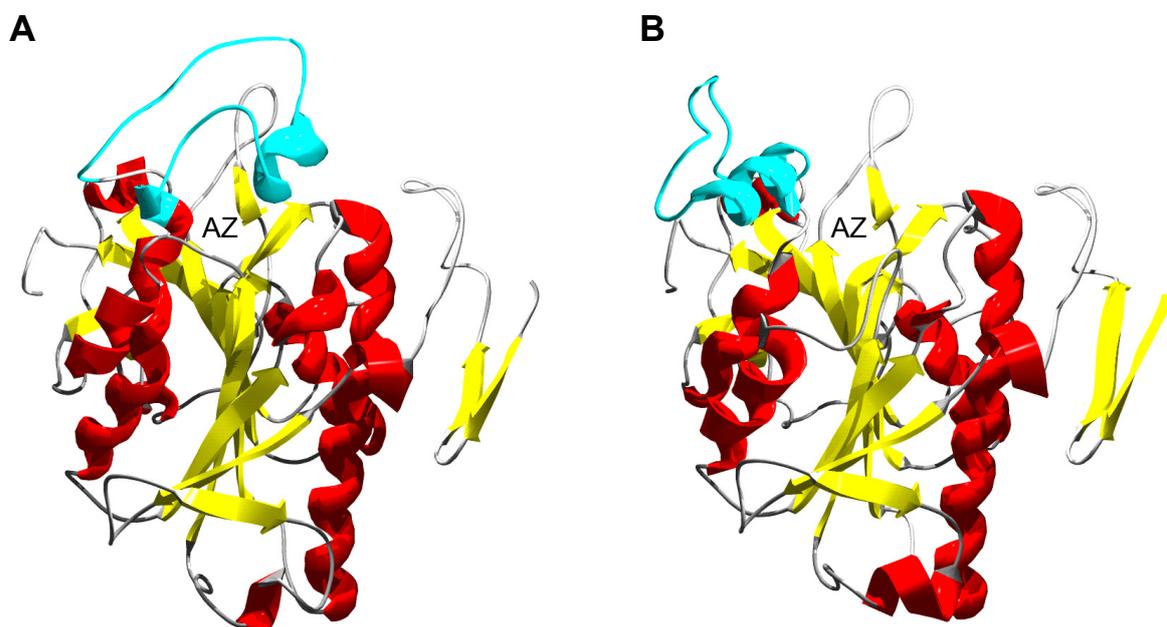


Abb. 1.7: Die Struktur der katalytischen Domäne der humanen Pankreas-Lipase in (A) geschlossener und (B) geöffneter Konformation. Der sog. Deckel der Lipase ist in hellblau dargestellt. In geschlossener Konformation schirmt er das aktive Zentrum (AZ) gegen die Umgebung ab (WINKLER, F. K. *et al.*, 1990).

Im Zuge der Charakterisierung weiterer Lipasen und Aufklärung ihrer molekularen Strukturen wurden jedoch auch solche gefunden, die zwar eine Deckelstruktur besaßen, jedoch keine (THIRSTRUP *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1993; LESUISSE *et al.*, 1993), oder sogar substratabhängige Interphasenaktivierung (VAN OORT *et al.*, 1989) aufwiesen, ihrem Substratspektrum nach jedoch eindeutig den Lipasen zugeordnet werden mussten. Weiterhin wurden Lipasen gefunden, denen die charakteristische Deckelstruktur gänzlich fehlte (VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001; UPPENBERG *et al.*, 1994; HJORTH *et al.*, 1993). Zur Definition von Lipasen wurde daher von VERGER 1997 vorgeschlagen, das Substratspektrum als Kriterium zu nutzen und so Lipasen als solche Enzyme zu definieren, die langkettige Acylglycerole mit

12 oder mehr Kohlenstoffatomen in der Acylkette hydrolysieren können. Die Funktion der Deckelstruktur blieb dabei jedoch unbeachtet. Die Definition von VERGER ist heute die am weitesten verbreitete, eine eindeutige und endgültige offizielle Festlegung erfolgte jedoch bislang nicht.

1.6.6. Die Lipase A aus *Bacillus subtilis*

Die *Bacillus subtilis* Lipase A (BSLA) wurde erstmals beschrieben von DARTOIS *et al.* (1992). 2001 wurde sie von EGGERT *et al.* gereinigt und biochemisch charakterisiert. Ihre Struktur konnte noch im selben Jahr durch VAN POUDEROYEN *et al.* aufgeklärt werden (Abb. 1.8). Die BSLA hat eine weitgehend globuläre Form. Ihre katalytische Triade wird von den Aminosäuren Ser77, Asp133 und His156 gebildet, die Oxyanionentasche von Ile12 und Met78. Sie gilt bis heute in vielerlei Hinsicht als Besonderheit, da sie (1) mit einem Molekulargewicht von nur 19,3 kDa und nur 181 Aminosäuren die kleinste der derzeit bekannten Lipasen ist. Sie besitzt (2) im Gegensatz zu den meisten anderen Lipasen keine Deckelstruktur und ist daher auch nicht Interphasen-aktivierbar (LESUISSE *et al.*, 1993). Das

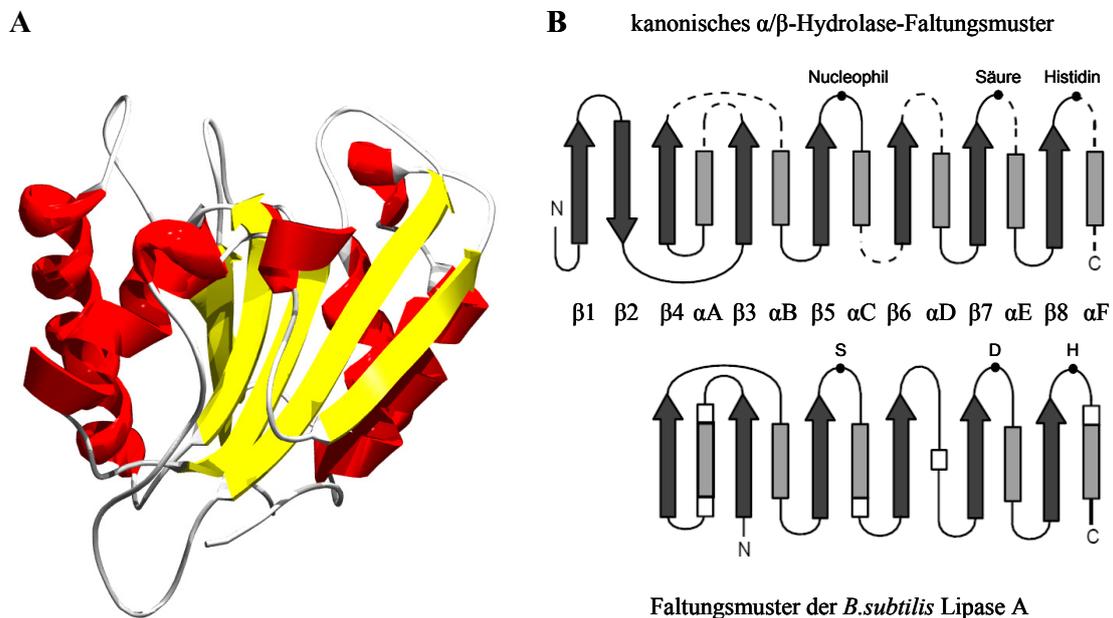


Abb. 1.8: Die Struktur der *Bacillus subtilis* Lipase A (BSLA): A: Die Kristallstruktur der BSLA nach van Pouderoyen *et al.* (2001). Das zentrale β -Faltblatt (gelbe Pfeile) ist umgeben von α -Helices (dargestellt als rote Windungen). B: Vergleichende Darstellung der Sekundärstrukturelemente der BSLA und der kanonischen α/β -Hydrolasefaltung.

Ser77 des aktiven Zentrums ist oberflächenlokalisiert und lösungsmittelzugänglich. In dem hoch konservierten Lipase-Konsensusmotiv G-X-S-X-G des aktiven Zentrums ist (3) bei der BSLA das erste Glycin gegen ein Alanin substituiert. Sie enthält (4) keine Cysteine und ist daher ohne Disulfidbrücken stabil. Die wohl bemerkenswerteste Besonderheit aus struktureller Sicht ist jedoch (5), dass ihr, verglichen mit der kanonischen α/β -Hydrolasefaltung, die Stränge $\beta 1$ und $\beta 2$ fehlen, die Helix αD durch eine einzelne helicale Windung substituiert und weiterhin αE stark verkürzt ist (). Die BSLA enthält damit sogar weniger Strukturelemente als die kanonische Faltung und wird daher auch als „minimale α/β -Hydrolase“ bezeichnet (VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001). Diese Eigenschaft macht sie zu einem äußerst interessanten Ausgangspunkt für die Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen in α/β -Hydrolasen, da sie quasi als eine Art Grundform betrachtet werden kann. In den letzten Jahren wurde die BSLA eingehend hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften und ihrem biotechnologischen Potential untersucht (EGGERT *et al.*, 2002). Sie weist maximale Aktivität gegenüber Substraten mit mittellangen Fettsäuren (C8) auf, zeigt jedoch auch Aktivität gegenüber *sn-1* und *sn-3* Glycerolestern mit langen Fettsäureseitenketten, weshalb sie als echte Lipase charakterisiert wurde (LESUISSE *et al.*, 1993). Ferner diente es in mehreren Arbeiten zur gerichteten Evolution von Enantioselektivität sowie zur Entwicklung neuer Methoden der gerichteten Evolution als Modellenzym. Im Zuge dessen konnte gezeigt werden, dass das Enzym Enantioselektivität gegenüber verschiedenen Substraten aufweist, und somit für die Produktion chiraler Alkohole biotechnologisch interessant ist (DETRY *et al.*, 2006; FUNKE *et al.*, 2005; FUNKE *et al.*, 2003). Aufgrund seiner geringen Größe konnte es weiterhin erfolgreich für Selektionsverfahren mittels Phage-Display verwendet werden (DRÖGE *et al.*, 2006).

1.6.7. Die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa*

Die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* (PAL) gehört mit einem Molekulargewicht von 29 kDa bereits zu den größeren bakteriellen Lipasen und wird in die Familie I.2 nach ARPIGNY & JAEGER (1999) eingeordnet. Sie ist weitgehend globulär geformt und besteht aus 285 Aminosäuren, denen zunächst ein 26 Aminosäuren zählendes Propeptid vorgelagert ist, das bei Sekretion über den TypII Sekretionsweg abgespalten wird. Dabei spielt die lipase-spezifische Foldase LipH, die zusammen mit LipA in einem bicistronischen Operon in *P. aeruginosa* codiert wird, eine essentielle Rolle für die Faltung der Lipase in ihre aktive Konformation (ROSENAU *et al.*, 2004). Ohne dieses Helfer-Enzym bleibt die Lipase inaktiv,

was die Möglichkeiten zur Expression im heterologen Wirt stark einschränkt. Abb. 1.9 zeigt die Kristallstruktur der PAL in offener Konformation, die von NARDINI *et al.* (2000) aufgeklärt wurde. Sie besteht aus einem Kern, der nach dem α/β -Hydrolase-Faltungsprinzip strukturiert ist und aus einem fünf-strängigen, zentralen β -Falblatt besteht, flankiert von vier α -Helices. Wie auch der BSLA fehlen der PAL verglichen mit der kanonischen α/β -Hydrolasefaltung die ersten beiden β -Stränge $\beta 1$ und $\beta 2$ der kanonischen Faltung. Zusätzlich zu diesem Kern sind jedoch im Gegensatz zur *Bacillus subtilis* Lipase A eine Reihe weiterer Strukturelemente vorhanden. So bilden die Helices $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 8$ eine Art Überbau, der die Cavität des aktiven Zentrums formt und maßgeblich an der Substratbindung beteiligt ist. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind Ser82, das am nukleophilen Ellenbogen lokalisiert ist, sowie Asp229 und His251. Die PAL weist weiterhin eine Disulfidbrücke zwischen Cys183 und Cys235 auf. Der Helix $\alpha 5$ wird die Funktion des Deckels zugeschrieben, wobei jedoch festzustellen ist, dass bei der PAL Interphasenaktivierbarkeit bislang nur nach Expression in heterologen Wirtssystemen wie z.B. *Streptomyces lividans*

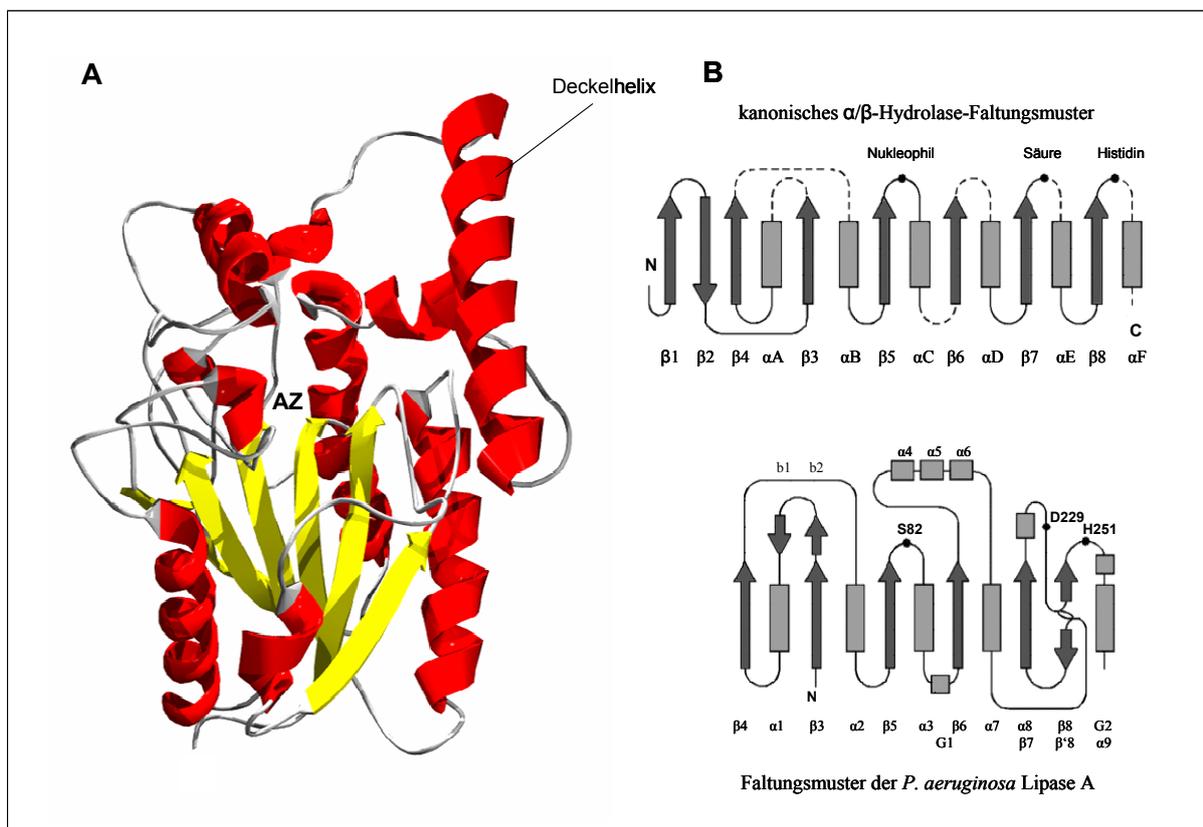


Abb. 1.9: Die Struktur der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A (PAL). A: Die Kristallstruktur nach NARDINI *et al.* (2000) in der offenen Konformation. Das zentrale β -Faltblatt (gelb) ist deutlich zu erkennen und umgeben von vier α -Helices (rot). Über dieser Basis sind die übrigen Helices zu einem komplexen, das aktive Zentrum (AZ) flankierenden Überbau angeordnet, von denen die größte die Helix $\alpha 5$ ist, die als Deckelhelix bezeichnet wird. AZ markiert das aktive Zentrum und den nukleophilen Ellenbogen, an dem das Nukleophil Ser8 lokalisiert ist. B: Anordnung der Sekundärstrukturelemente der kanonischen Faltung im Vergleich zur deutlich komplexeren Sekundärstruktur der PAL

beobachtet werden konnte (LIEBETON, 1999) was höchstwahrscheinlich mit ihrer starken Assoziation mit Lipopolysaccharid (LPS) bei Expression in *P. aeruginosa* zusammenhängt (STUER *et al.*, 1986).

Die PAL war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen zur Aufklärung des katalytischen Mechanismus Enantioselektivität von Lipasen, sowie zur Etablierung neuer Methoden der gerichteten Evolution (REETZ *et al.*, 2005; BOCOLA *et al.*, 2004; REETZ, 2004, 2001; LIEBETON *et al.*, 2000).

1.7. Ziele dieser Arbeit

Die BSLA ist in ihrer Eigenschaft als minimale α/β -Hydrolase ein besonders interessanter Vertreter zur Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen von α/β -Hydrolasen. Sie weist hohe Strukturhomologie zur Cutinase (197 AS) aus *Fusarium solani pisi* und zur Acetylxylan Esterase aus *Penicillium purpurogenum* (207 AS) die beide nur wenig größer sind als die BSLA. Allen Dreien fehlt der für Lipasen charakteristische Deckel und die damit verbundene Interphasenaktivierungskinetik. Die *loops* im Deckelbereich oberhalb des aktiven Zentrums sind bei der Cutinase und der Acetylxylan-Esterase jedoch im Vergleich zur BSLA etwas länger. Bei Homologievergleichen fielen auch Ähnlichkeiten zu größeren Lipasen wie der katalytischen Domäne der humanen Pankreas-Lipase (HPL) und der Lipase B aus *Candida antarctica* (CALB) auf, die wiederum ihrerseits ausgeprägte Deckelstrukturen und viele weitere zusätzliche Elemente enthalten, deren Funktionen vielfach im Detail ungeklärt sind. Es liegt der Schluss nahe, dass erst solche weiteren Strukturelemente den einzelnen α/β -Hydrolasen ihre spezifischen Funktionen verleihen.

Im Rahmen von Versuchen zur *in vitro* Evolution von Proteinen sollte nun die minimale α/β -Hydrolase *Bacillus subtilis* LipA als Grundgerüst für die Insertion weiterer Strukturmerkmale benutzt werden, um zu untersuchen, welchen Einfluss diese auf die Funktion des Enzyms haben. Da Evolution in der Natur häufig durch Rekombination homologer DNA-Bereiche erfolgt, sollten nicht völlig willkürliche Insertionen erfolgen, sondern zunächst ein auf struktureller Homologie basierender Ansatz verfolgt werden, der sich an verwandten α/β -Hydrolasen orientierte. Homologe *loops* aus den Deckelregionen der Cutinase, der Acetylxylanesterase sowie der katalytischen Domäne der humanen Pankreas-Lipase wurden mittels Megaprimer-PCR an ihrer jeweils homologen Position in die BSLA inseriert.

Ziel dieser Arbeit war, die dabei verringerten Aktivitäten durch Methoden der gerichteten Evolution wieder zu steigern und wenn möglich, dem Wildtyp anzugleichen. Neben der biochemischen Charakterisierung der Varianten sollten die durch die Insertionen verursachten Veränderungen der Enzymeigenschaften dabei eingehend untersucht werden. In einem komplementären Ansatz dazu sollte die ausgeprägte Deckelstruktur der sehr viel komplexeren Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* (PAL) deletiert und die entstehenden Varianten ebenfalls auf Aktivität untersucht, charakterisiert und gegebenenfalls durch gerichtete Evolution reaktiviert werden. Weiteres Ziel dieser Versuche war es, die Flexibilität der α/β -Hydrolasefaltung hinsichtlich großer struktureller Veränderungen zu untersuchen und damit ihre Eignung für die Konstruktion einer Art Baukastensystem zu prüfen, in welchem strukturierte Elemente von α/β -Hydrolasen zur gezielten Veränderung von Enzymeigenschaften wie Substratspezifität oder Enantioselektivität mit einem minimalen Grundgerüst kombiniert werden können. Es kamen dabei sowohl Methoden des Rationalen Designs als auch der gerichteten Evolution zum Einsatz.

Weiterhin sollten in Kooperation mit den Arbeitskreisen von Prof. Dr. M. T. Reetz und Prof. Dr. W. Thiel am MPI für Kohlenforschung in Mülheim a.d.R. die für die Steigerung der Enantioselektivität wesentlichen Mutationen einer in vorangegangenen Arbeiten erzeugten Mutante (1H8) der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A durch QM/MM-Methoden prognostiziert und experimentell ermittelt werden. Diese Arbeit sollte dazu den experimentellen Beitrag liefern.

Ziel dabei war die Aufklärung molekularer Mechanismen der enzymkatalysierten Lipolyse durch α/β -Hydrolasen, wobei den Möglichkeiten zur experimentellen Veränderung der Substratspezifität und der Enantioselektivität dieser Enzyme besonderes Interesse gelten sollte.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von den im Folgenden aufgelisteten Firmen in p. A.-Qualität bezogen.

Antibiotika:

SERVA (Heidelberg), SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen)

Chemikalien:

FLUKA (Sternheim), MERCK (Darmstadt), MERCK (Karlsruhe), SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen), DIFCO (Detroit, USA), ROCHE (Grenzach), ROTH (Karlsruhe).

Enzyme:

Lysozym: SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen);

DNA-Polymerasen: *Pfu*-DNA-Polymerase, Turbo-*Pfu*-Polymerase: STRATAGENE (Heidelberg), *Taq*-DNA-Polymerase: MGI-FERMENTAS (St. Leon-Roth), *Taq*-Goldstar Polymerase: EUROGENTEC (Seraing, Belgien), T7 DNA-Polymerase: MGI-FERMENTAS (St. Leon-Roth),

Restriktionsendo-nukleasen: MGI-FERMENTAS (St. Leon-Roth), NEW ENGLAND BIOLABS (Beverly, USA), ROCHE-APPLIED SCIENCE (Mannheim),

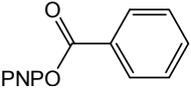
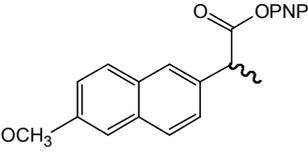
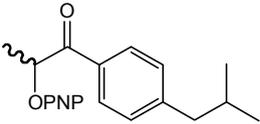
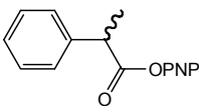
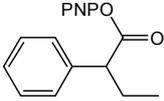
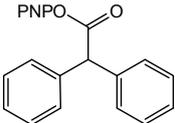
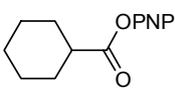
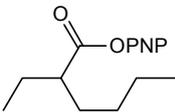
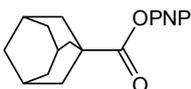
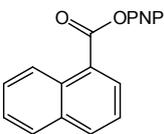
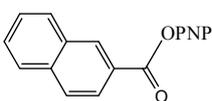
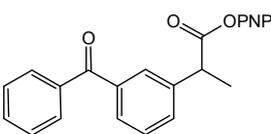
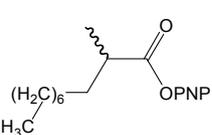
T4 DNA-Ligase: MGI-FERMENTAS (St. Leon-Roth), ROCHE-APPLIED SCIENCE (Mannheim),

S1-Nuklease: ROCHE-APPLIED SCIENCE (Mannheim).

2.2. Lipase-Substrate

para-Nitrophenyl-butyrat, -valerat, -caproat, -caprylat, -capronat, -laurat, -myristat, -palmitat und -stearat wurden von der Firma SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen) bezogen. Die in Tabelle 2.1 aufgelisteten *para*-Nitrophenyl-Ester sind nicht kommerziell erhältlich, sondern wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Reetz am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim a. d. R. von M. Hermes und J. D. Carballeira synthetisiert und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten nicht kommerziell erhältlichen Substrate

	Benzoessäure-4-nitrophenylester
	4-Nitrophenyl 2-(6-methoxy-naphtalen-2-yl)-propanoat [Naproxen-ester]
	4-Nitrophenyl 2-(4-isobutyl-phenyl)-propanoat [Ibuprofen-ester]
	4-Nitrophenyl 2-phenylpropanoat
	4-Nitrophenyl 2-phenylbutanoat
	4-Nitrophenyl 2,2-diphenylacetat
	4-Nitrophenyl Cyclohexancarboxylat
	4-Nitrophenyl 2-ethylhexanoat
	4-Nitrophenyl-adamantan-carboxylat
	4-Nitrophenyl 1-naphthoat
	4-Nitrophenyl 2-naphthoat
	4-Nitrophenyl 3-benzoylbenzoat [Ketoprofen-ester]
	(<i>R</i>)-und (<i>S</i>)-4-Nitrophenyl-2-Methyldecanoat

2.3. Bakterienstämme und Plasmide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Vektoren und Plasmide sind in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz und Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XL1Blue	<i>e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK- mK+) supE44 relA1 D(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZDM15]</i>	BULLOCK <i>et al.</i> (1987) STRATAGENE (Heidelberg)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F' dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)</i>	STUDIER & MOFFAT (1986) NOVAGEN (Madison, USA)
<i>P. aeruginosa</i> PABST7.1	<i>ΔlipA/lipH</i> ; chromosomal integrierte D180-Tet ^r lacI ^q , T7-RNA-Polymerase	SCHNEIDINGER (1997)

Tabelle 2.3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide

Vektoren für <i>E. coli</i>	genetische Marken	Referenz und Bezugsquelle
pET19b	ColE1 PT7Φ10 <i>lacIq</i> Ampr „His-Tag“	NOVAGEN (Madison, USA)
pET22b(+)	ColE1 PT7Φ10 <i>lacIq pelB</i> -Signalsequenz „His-Tag“ Ampr	NOVAGEN (Madison, USA)
pUC18	ColE1 P _{lac} lacZ' Amp ^r	YANISCH-PERRON <i>et al.</i> (1985)
pUC19	ColE1 P _{lac} lacZ' Amp ^r	YANISCH-PERRON <i>et al.</i> (1985)
Vektoren mit weitem Wirtsbereich		
pUCPKS	ColE1 P _{T7Φ10} P _{lac} SF Amp ^R	Watson <i>et al.</i> (1996)
pBBR1MCS	<i>lacZα Cm^r rep mob</i>	Kovach <i>et al.</i> (1994)
rekombinante Plasmide		
pUlipA	pUC18 mit 563 bp <i>lipA</i> -PCR-Fragment (ohne Signalsequenz)	EGGERT <i>et al.</i> (2001); FUNKE <i>et al.</i> (2003)
pET22lipA	pET22b(+) mit 557 bp <i>EcoRV/SacI</i> -Fragment aus pUlipA (<i>pelB-lipA</i> -Fusion, P _{lac} -kontrolliert).	EGGERT <i>et al.</i> (2001); FUNKE <i>et al.</i> (2003)
pET22lipA	pET22b(+) mit 557 bp <i>EcoRV/SacI</i> Fragment aus pUlipA (<i>pelB-lipA</i> -Fusion, P _{lac} -kontrolliert).	EGGERT <i>et al.</i> (2001); FUNKE <i>et al.</i> (2003)

pET22Cutilip	pET22b mit <i>lipA</i> +Cutinase-Deckelsequenz (<i>MlsI/HindIII</i> -kloniert)	EGGERT <i>et al.</i> (2004)
pET22Axelip	pET22b mit <i>MlsI/HindIII</i> -Fragment <i>lipA</i> + Acetylxylan-esterase-Deckelsequenz	EGGERT <i>et al.</i> (2004)
pET22HPlip	pET22lipA mit <i>lipA</i> +Human-Pancreas-Lipase –Deckelsequenz <i>BshTI/HindIII</i> -kloniert)	EGGERT <i>et al.</i> (2004)
pET19WTlipA	pET19b mit 549bp <i>NdeI/XhoI lipA</i> – PCR-Fragment, ohne Signalsequenz	FUNKE <i>et al.</i> (2003)
pET19Cutilip	pET19b mit <i>NdeI/XhoI Cutilip</i> – PCR-Fragment, ohne Signalsequenz	diese Arbeit
pET19Axelip	pET19b mit <i>NdeI/XhoI HP lip</i> – PCR-Fragment, ohne Signalsequenz	diese Arbeit
pET19HPlip	pET19b mit <i>NdeI/XhoI Cutilip</i> – PCR-Fragment, ohne Signalsequenz	diese Arbeit
pET22-C8D12	pET22Cutilip Punktmutante N91D	diese Arbeit
pET22-C9G4	pET22Cutilip Punktmutante Y148H	diese Arbeit
pET22-C12F1	pET22Cutilip Punktmutante N91S	diese Arbeit
pET22-C14E9	pET22Cutilip Punktmutante L123P	diese Arbeit
pET22-H1H2	pET22HPlip Punktmutante F17S, N94D	diese Arbeit
pET22-H4G7	pET22HPlip Punktmutante F17Y	diese Arbeit
pET22-H13C8	pET22HPlip Punktmutante K156E	diese Arbeit
pET22-H13D1	pET22HPlip Punktmutante N157D	diese Arbeit
pET19-C8D12	pET19Cutilip Punktmutante N91D	diese Arbeit
pET19-C9G4	pET19Cutilip Punktmutante Y148H	diese Arbeit
pET19-C12F1	pET19Cutilip Punktmutante N91S	diese Arbeit
pET19-C14E9	pET19Cutilip Punktmutante L123P	diese Arbeit
pET19-H1H2	pET19HPlip Punktmutante F17S, N94D	diese Arbeit
pET19-H4G7	pET19HPlip Punktmutante F17Y	diese Arbeit
pET19-H13C8	pET19HPlip Punktmutante K156E	diese Arbeit

pET19-H13D1	pET19HPlip Punktmutante N157D	diese Arbeit
pET19-F17Y	pET19Cutilip Punktmutante F17Y	diese Arbeit
pET19-F17L/A42V/N91S	pET19Cutilip Punktmutante F17L/A42V/N91S	diese Arbeit
pET19-N91S/N175H	pET19Cutilip Punktmutante N91S/N175H	diese Arbeit
pET19-N98Y	pET19Cutilip Punktmutante N98Y	diese Arbeit
pET19-S32P/V63A/N91S	pET19Cutilip Punktmutante S32P/V63A/N91S	diese Arbeit
pET19-N91D	pET19Cutilip Punktmutante N91D	diese Arbeit
pET19-N91V	pET19Cutilip Punktmutante N91V	diese Arbeit
pET19-N91L	pET19Cutilip Punktmutante N91L	diese Arbeit
pET19-F17A/Y148H	pET19Cutilip Punktmutante F17A/Y148H	diese Arbeit
pET19- F17S/Y148H	pET19Cutilip Punktmutante F17S/Y148H	diese Arbeit
pET19-N91W/L123P	pET19Cutilip Punktmutante N91W/L123P	diese Arbeit
pET19-N91V/Y148H	pET19Cutilip Punktmutante N91V/Y148H	diese Arbeit
pET19-F17Y/K35R/N94D	pET19HPlip Punktmutante F17Y/K35R/N94D	diese Arbeit
pET19-F17S/N157D	pET19Cutilip Punktmutante F17S/N157D	diese Arbeit
pET19-F17S/K156E	pET19Cutilip Punktmutante F17S/K156E	diese Arbeit
pET19-F17S/N94D/N120S/I162V/V163E	pET19Cutilip Punktmutante F17S/N94D/N120S/I162V/V163E	diese Arbeit
pET19-F17S/N94D/V163A	pET19Cutilip Punktmutante F17S/N94D/V163A	diese Arbeit
pET19-F17Y/M137L	pET19Cutilip Punktmutante F17Y/M137L	diese Arbeit
pUCPL6A	pUCPL7A, Af/III, T4Pol., religiert, Δ515 bp	LIEBETON (1999)

pUCPL6A-RFA	1171 <i>EcoRV</i> -Fragment aus pBGAT-in pUCPL6A	Diplomarbeit S. HAUSMANN (2004)
pUCPL6A-PALdel_lid	pUCPL6A, LipA Δ 117-L163	diese Arbeit
pUCPL6A-PALGly117	pUCPL6A, LipA Δ 117-L163 ersetzt durch singuläres Gly an Pos117	diese Arbeit
pUCPL6A-PALrd117	pUCPL6A-PAL Sättigungscodon NNS an Position 117	diese Arbeit
pUCPL6A-PALlid1	pUCPL6A, Δ 1121-T152	diese Arbeit
pUCPL6A-PALrdlid	pUCPL6A, Δ 1121-T152, Sättigungscodons NNS an Positionen 122-124	diese Arbeit

2.4. Verwendete Geräte und Software

PCR: Mastercycler Gradient und Mastercycler ep gradient EPPENDORF (Hamburg)
 Agarosegelelektrophoresekammern: iMupid Gel System, HELIXX TECHNOLOGIES (Scarborough, Kanada);
 Elektroporation: MicroPulser BIO-RAD (München)
 Kulturschüttler und Inkubatoren: HT-INFORS
 Zellaufschluss/Ultraschall: Ultraturrax T25 basic, IKA LABORATORIES (Staufen)
 Microtiterplattenschüttler: EDMUND-BÜHLER GMBH (Hechingen)
 Pickroboter: GENETIX Qpix (New Milton, UK)
 Pipettierroboter: TECAN Genesis Workstation 200, Software: FACTS, Gemini, Magellan, TECAN (Mannedorf, Schweiz)
 Microtiterplattenphotometer: Spektramax 250; Software: SOFTmaxPro Vers.3.2.1
 MOLECULAR DEVICES/MDS ANALYTICAL TECHNOLOGIES (Toronto, Kanada)
 SDS-PAGE: vertikales System „Mini-Protean“ BIO-RAD (München)

2.5. Oligonukleotide und PCR-Primer

Sämtliche in dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide und Primer wurden HPLC-gereinigt und lyophilisiert von der Firma THERMO-ELECTRON-CORPORATION (Ulm) über online-Bestellverfahren bezogen (<http://www.thermohyaid.de/cgi-bin/oligos-new/order.py>). Zur Verwendung wurden sie in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l in A. dest. gelöst, die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.6. Anzucht, Kultivierung und Lagerung von Bakterien

2.6.1. Nährmedien

Flüssigmedien:

LB-Medium: 10 g/L Trypton, 10 g/L Natriumchlorid, 5 g/L Hefeextrakt in A. dest.

LB/M9-Medium: 500 ml 2-fach-konzentriertes LB-Medium versetzt mit

100 ml M9-Lösung 1: 40 g/L Glucose

10 ml M9-Lösung 2: 25 g/L MgSO₄

10 ml M9-Lösung 3: 2 g/L CaCl₂ x 2 H₂O

100 ml M9-Lösung 4: 70 g/L Na₂HPO₄, 30 g/L KH₂PO₄, 10 g/L NH₄Cl, 5 g/L NaCl
ad. 1 L A. dest.

TB-Medium, pH 7,5: 12 g/L Trypton, 24 g/L Hefeextrakt, 100 ml/L 10-fach konzentrierter
Kpi-Puffer.

10-fach konz. Kpi-Puffer (0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄):
23 g/L KH₂PO₄, 164 g/L K₂HPO₄ in A. dest. lösen.

Festmedien:

Für Kulturen auf Festmedium wurde LB-Medium mit 15 g/L Agar-Agar (Roth) versetzt, autoklaviert, bei Bedarf nach Abkühlung mit Antibiotikum versetzt und anschließend in Petrischalen gegossen. Sobald das Medium erstarrt ist, können Agarplatten bei 4 °C über mehrere Wochen gelagert werden.

2.6.2. Anzucht und Kultivierung

Flüssig-Kulturen von *Escherichia coli* wurden, sofern nicht anders angegeben, in LB-Medium bei 37 °C und in Erlenmeyerkolben unter ständigem Schütteln inkubiert. *Pseudomonas aeruginosa* wurde standardmäßig in 2-fach konzentriertem LB-Medium bei 30 °C für ebenfalls unter Schütteln kultiviert. Plasmid-tragende Stämme wurden dabei stets durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums in der optimalen Konzentration (Tab. 2.4) unter Selektionsdruck gehalten.

Tabelle 2.4: Verwendete Antibiotika und ihre optimalen Konzentrationen

Antibiotikum	Konzentration im Kulturmedium (µg/ml)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ampicillin	100	-
Carbenicillin	100	400
Chloramphenicol	50	300
Tetracyclin	25	100

Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden im Reagenzglas auf dem Brutroller angezogen. Flüssigkulturen größerer Volumina wurden im Erlenmeyerkolben auf einem Brutschüttler (GFL, Burgwedel) bei 150 UpM bebrütet. Das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyerkolbens entsprach für 1L-Kulturen 1:5, für kleinere Kulturen 1:10. Übernachtskulturen wurden mindestens 16 h kultiviert. Hauptkulturen wurden jeweils aus einer Übernachtskultur mit 1/100 Volumen angeimpft.

Kulturen auf Festmedium wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C für ca. 16 h inkubiert, bzw. solange, bis sich deutlich erkennbare Kolonien gebildet hatten.

2.6.3. Anzucht im Hochdurchsatzverfahren

Kulturen für Aktivitätsscreening im Hochdurchsatz (HTS) wurden zu je 1 ml Volumen in Deepwell-Mikrotiterplatten im 96er-Format (96-DW-Masterblock 2 ml, Einzelgefäßvolumen je 2 ml (GREINER BIO-ONE, Frickenhausen)) bei 37 °C im Mikrotiterplattenschüttler (TiMix 5, EDMUND BÜHLER GMBH, Hechingen) bei 800 rpm angezogen (vgl. 2.19). Die Beimpfung der Kulturen erfolgte automatisiert von Festmedium (vgl. hierzu 2.19.).

2.6.4. Lagerung

Bakterienkulturen auf LB-Agarplatten wurden mit Parafilm (PECHINEY, Chicago, USA) verschlossen und je nach Bakterienstamm und seiner Funktion bei 4 °C max. 4 Wochen gelagert. Zur dauerhaften Lagerung wurden Gefrierkulturen angelegt, indem 1 ml Flüssigkultur mit 20-40 % Glycerin (alternativ 75 µl Dimethylsulfoxid) versetzt und in Kryogefäßen (NUNC, Wiesbaden) bei -80 °C eingefroren wurden.

2.7. Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde nach der von BIRNBOIM & DOLY (1979) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder unter Verwendung von Plasmid-isolationskits der Firma QIAGEN (Hilden) oder des Perfectprep Plasmid Mini-Kit (EPPENDORF, Hamburg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese (2.8) bestimmt.

2.8. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA und der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten im „iMupid mini gel system“ der Firma EUROGENTEC (Köln) durchgeführt. Dabei wurde im Wesentlichen nach der von SAMBROCK *et al.* 1989 beschriebenen Methode vorgegangen. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 x TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM EDTA; pH 8,3) benutzt. Als Größenstandard für die DNA-Banden wurde, soweit nicht anders bezeichnet, die „1 kb-ladder“ der Firma INVITROGEN (Karlsruhe) verwendet. Die Dokumentation der Gelelektrophorese-Ergebnisse erfolgte im Videodokumentationssystem „Gel Jet Imager Plus“ der Firma INTAS (Göttingen). Zur gezielten Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das „Gel-Extraction-Kit“ der Firma Eppendorf (Hamburg) benutzt.

2.9. *in vitro*-Rekombination von Nukleinsäuren

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

2.10. Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

2.10.1. Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock erfolgte nach der Methode von HANAHAN, 1983. Die Menge kompetenter *E. coli*-Zellen richtete sich dabei nach der Art und Präparationsmethode der DNA und lag im Bereich von 10 µl für vollständige Plasmide bis zu ca. 100 µl für Ligationsansätze. Ligationsansätze wurden nach Möglichkeit zuvor durch Dialyse entsalzt, mit A. dest. verdünnt oder per „Gel-Extraction-Kit“ (Eppendorf, Köln) gereinigt, um die Transformationseffizienz zu erhöhen.

2.10.2. Elektroporation von *E. coli*

Die Elektroporation von *E. coli* wurde mittels eines MicroPulser (BIORAD, München) nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Transformationskompetenz wurde in diesem

Fälle durch mehrfaches Entsalzen der Zellen, durch waschen der pelletierten Zellen mit eiskaltem, sterilem A. dest/ 10 % Glycerol. Auch dabei wurden die Empfehlungen des Herstellers befolgt.

2.10.3. Hitzschock-Transformation von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa-Zellen wurden ebenfalls per Hitzeschock transformiert, wobei hier der Hitzeschock für 3 min bei 50 °C durchgeführt wurde. Transformationskompetenz der Zellen wurde erreicht, indem Zellen der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{580} = 0,3-0,6$) dreimal mit sterilem, eiskaltem 150 mM $MnCl_2$ gewaschen, anschließend in 1/100 Volumen eiskaltem 150 mM $MnCl_2$ / 20 % Glycerol aufgenommen wurden und bei -80 °C in 100 µl Aliquoten mindestens 16 h gelagert wurden.

2.11. Amplifikation und Modifikation von Nukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.11.1. Standard-PCR

Für die reine Amplifikation von DNA zu Klonierungszwecken wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach SAIKI *et al.* (1988) durchgeführt. Standardmäßig wurden PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt und es wurden die vom jeweiligen Hersteller der Polymerase mitgelieferten Puffer und Chemikalienzusätze verwendet, sowie Primer und Templat-DNA in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration (ca. 1 ng Matrizen-DNA; je 5 pmol Primer, 2,5 U *Taq*- bzw. 1 U *Pfu*-Polymerase, je 0,2 mM dNTP). Der Standard-Temperaturzyklus bestand aus folgenden Schritten und wurde pro PCR 30 Mal durchlaufen: 1 min Denaturierung bei 95 °C, 1 min Annealing bei 50-60 °C, je nach Schmelztemperatur der DNA, Elongation bei 72 °C für 1 min pro kb der Matrize. Spezielle Anwendungen der Methode, die außer der reinen Amplifikation für Klonierungszwecke noch weitere Funktionen erfüllten, sind im Folgenden beschrieben.

2.11.2. Ortsspezifische Mutagenese

Zur Insertion einer oder mehrerer definierter Mutationen diente die Quikchange[®]-Methode nach KUNKEL (1985) (STRATAGENE, Heidelberg) als Orientierung. Dabei wurde als Matrizen-DNA ausschließlich Plasmide verwendet, die zuvor in einem Bakterienstamm mit funktionierendem Methylierungssystem vervielfältigt worden war. Die Mutageneseprimer wurden so gewählt, dass sie dieselbe Mutation kodierten, aber zueinander komplementär waren und so je an homologer Position am kodierenden und nicht-kodierenden Strang der Matrizen-DNA banden. Es wurde hierbei eine im Vergleich zur Standard-PCR (2.11.1) höhere Matrizen-DNA Konzentration eingesetzt, um der Eigenkomplementation der Primer kompetitiv entgegenzuwirken. Die Elongationsphase wurde dabei auf 6 min ausgedehnt und bei verringerter Temperatur von 68 °C ausgeführt, um eine höhere Prozessivität der *Pfu*-Polymerase zu gewährleisten. Auf diese Weise wurde jeder Primer über die volle Länge des Plasmids elongiert und es entstand doppelsträngiges, zirkuläres PCR-Produkt. Denaturierung Annealing erfolgten wie im Standard-PCR-Protoll. Im Anschluss an die Reaktion wurden zu jedem Ansatz 10 U der Restriktionsendonuklease *DpnI* hinzugegeben, welche ausschließlich methylierte DNA hydrolysierte und so die Matrizen-DNA (Wildtyp) fragmentierte, das nicht-methylierte PCR-Produkt jedoch nicht tangierte. Dieses konnte anschließend direkt in *E. coli* transformiert werden. Sollten mehrere Mutationen in ein Gen inseriert werden, wurden

mehrere Quikchange-Reaktionen nacheinander durchgeführt. Das Vorhandensein der gewünschten Mutation wurde anschließend durch Sequenzierung der DNA nachgewiesen.

2.11.3. Sättigungsmutagenese

Sättigungsmutagenesen wurden durchgeführt, um ein bestimmtes Basen-Triplett vollständig zu mutagenisieren und so im Austausch gegen die Wildtyp-Aminosäure sämtliche anderen natürlichen Aminosäuren an dieser Position in das Zielprotein einzubauen. Hierzu wurde die von SARKAR & SOMMER (1990) beschriebene Methode der „Megaprimer“-PCR angewandt. Dabei wurde in einer ersten PCR-Standard-Reaktion (s. 2.11.1) zur Herstellung des sog. Megaprimers ein Gemisch von Oligonukleotiden als forward-Primer eingesetzt. Die Oligonukleotide des Gemisches waren identisch bis auf die jeweiligen Codons, die sich an der jeweils zu sättigenden Position befanden. Dieses Codon war randomisiert, d.h. jeder Primer des Gemisches codierte an dieser Stelle für eine der 20 proteinogenen Aminosäuren in äquimolarem Verhältnis. Als reverse-Primer diente ein Standard-Primer der das Zielgen flankierte. Als PCR-Produkt dieser ersten Reaktion entstand damit der Teil des Zielgens zwischen reverse-Primer und der Bindestelle der Mutagenese-Primer inklusive der jeweiligen Mutation. Dieses PCR-Produkt diente in einer zweiten Reaktion als reverse-Primer an einer neuen DNA-Matrize. Diese neue Matrize enthielt dasselbe zu mutierende Gen, wurde jedoch an dem dem Megaprimer gegenüberliegenden Ende von einer Sequenz flankiert, die im ersten Templat nicht vorhanden war. An diese flankierende Sequenz hybridisierte ein forward-Primer der nun in der zweiten Reaktion zusammen mit dem Megaprimer eingesetzt wurde, so dass das mutierte Gen vollständig amplifiziert wurde. Über entsprechende Restriktionsschnittstellen, die entweder in den Primersequenzen vorlagen oder aufgrund der Wahl der passenden Matrizen-DNA wurde das mutierte Gen dann in einen Expressionsvektor kloniert. Optional kann in der zweiten Reaktion dabei der reverse-Primer der ersten Reaktion zusätzlich eingesetzt werden um die Ausbeute zu erhöhen.

2.11.4. Ungerichtete Mutagenese mittels epPCR

Zur Herstellung von Mutantenbibliotheken wurde die Methode der fehlerhaften PCR (*error prone PCR*) (CADWELL & JOYCE, 1994, 1992; ZHOU *et al.*, 1991) angewandt, bei der die *Taq*-Polymerase durch erhöhte $MgCl_2$ - und $MnCl_2$ -Konzentration in ihrer Funktion so beeinflusst wird, dass Basenfehlpaarungen bei der Synthese des jeweils neuen DNA-Stranges vorkommen und somit Punktmutationen im PCR-Produkt entstehen. In dieser Arbeit wurde nach einiger Optimierung standardmäßig nach JAEGER *et al.* (2001) eine Fehlerrate von 2-4 pro kb eingestellt durch 6,0 mM $MgCl_2$ und 0,15 mM, sofern nicht anders vermerkt.

2.12. Sequenzierung von DNA

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

2.13. Chromatographische Reinigung der Lipase-Varianten

Die Reinigung der verschiedenen Proteinvarianten erfolgte nach der intrazellulären Expression der korrespondierenden Gene mit Hilfe des Vektors pET19b im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) als N-terminale Poly-Histidin-Fusionsproteine durch immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) nach PORATH *et al.* (1975). Je nach Variante wurde die Expression im 50 bis 5000 ml - Maßstab durchgeführt. Exemplarisch wird hier die

Reinigung im 5 L Maßstab beschrieben: Im Anschluss an die Überexpression (2.6) wurden die enzymhaltigen Zellen durch Zentrifugation geerntet (SORVALL „SLC-4000“, KENDRO LABORATORY PRODUCTS, Langenselbold, 6000 UpM, 20 min, 4 °C), in 15 ml Lyse-Puffer (30 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄; pH 8,0) mit 20 mg Lysozym und 0,01 mg DNaseI bzw. Complete Protease Inhibitor aufgenommen und nach 30 min Inkubation bei 0 °C mit Ultraschall aufgeschlossen (Ultraschall-Desintegrator: BANDELIN Sonopuls HD60 mit Kegelspitze MS72). Der so gewonnene Zellrohextrakt wurde zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugiert (SORVALL, SS-34, 18.000 UpM, 30 min, 4 °C), der dabei enthaltende Überstand filtriert (Porengröße 5 µm, SCHLECHER & SCHUELL, Dassel) und anschließend über eine mit mindestens fünf Säulenvolumen equilibrierte „Ni-NTA superflow“-Säule (30 ml Säulenvolumen, QIAGEN, Hilden) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min gepumpt. Die Säule wurde mit Wasch-Puffer (50 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm Lichtwellenlänge konstant blieb und anschließend mit Elutions-Puffer (250 mM Imidazol 300 mM NaCl; 50 mM NaH₂PO₄; pH 8,0) bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Das Lipase-haltige Eluat wurde zur Entsalzung direkt auf eine mit mindestens fünf Säulenvolumen Lipase-Puffer (2 mM Glycin/NaOH; pH 11,0) equilibrierte „Sephadex G-25 Medium“-Säule (1 l Säulenvolumen, AMERSHAM-BIOSCIENCES, Freiburg) gepumpt. Diese wurde dann mit Lipase-Puffer mit einer Flussrate von 20 ml/min gespült und die Proteinelutionsfraktion aufgefangen. Gegebenenfalls wurde die Proteinlösung anschließend aufkonzentriert („Vivacell 250“, VIVASCIENCE, Hannover) und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C oder bei 4 °C gelagert.

2.14. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von BRADFORD (1976) spektralphotometrisch („UV-1602“, SHIMADZU, Duisburg) bestimmt, wobei als Referenzsubstanz Rinderserumalbumin (BSA) diente. Alternativ dazu wurde das BCA-Kit der Firma PIERCE (Rockford, USA) benutzt, wobei die Bestimmung nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.15. Aufkonzentrierung von Proteinen durch TCA-Fällung

Proteinproben mit geringer Konzentration wurden vor weiteren Analysen mit Trichloressigsäure (TCA) nach PETERSON (1977) gefällt und aufkonzentriert. Dazu wurde die Probe mit 1/10 Volumen 1 % (w/v) SDS-Lösung versetzt, 5 min bei RT inkubiert und mit 1/10 Volumen 70 % (v/v) Trichloressigsäure durch 5 min Inkubation bei RT gefällt. Nach Zentrifugation (30 min, RT, 13000 rpm) wurde das Sediment zweimal mit eiskaltem, 80 %igem Aceton gewaschen und im gewünschten Volumen A. dest oder SDS-Probenpuffer (2.16) aufgenommen.

2.16. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS in einem diskontinuierlichem Gelsystem (LAEMMLI, 1970), welches sich aus einem 5 %igem Sammelgel und aus einem 15 %igem Trenngel zusammensetzte. Dazu wurde die „Mini Protean II Dual Slap Cell“-Gelapparatur der Firma BIORAD (München) bei einer Spannung von 150 V verwendet. Vor der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteinproben in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8, 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250)

aufgenommen und 10 min bei 98 °C denaturiert. Gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Elektrophorese durch eine TCA-Fällung nach PETERSON (1977) präzipitiert und in A. dest aufgenommen. Die aufgetrennten Proteine wurden mit „SimplyBlue SafeStain“ der Firma INVITROGEN (Karlsruhe) gefärbt.

2.17. Spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Lipase-Aktivität

Lipase-Aktivitäten von Kulturüberständen oder Zellrohextrakten wurden in dieser Arbeit standardmäßig nach der von WINKLER & STUCKMANN (1979) beschriebenen Methode durchgeführt. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Substrate sind Ester aus verschiedenen Carbonsäuren mit *para*-Nitrophenol als Alkoholfunktion und sind unter 2.2 aufgeführt. Der photometrische Aktivitätstest beruht auf der Detektion des *para*-Nitrophenolates, das bei der Hydrolyse frei wird und bei einem pH-Wert oberhalb 7,0 Licht der Wellenlänge 410 nm absorbiert. Diese Gelbfärbung ist im Photometer quantifizierbar und daher gut geeignet für Hochdurchsatz-Screening-Verfahren zur Durchmusterung großer Enzymbibliotheken auf hydrolytische Aktivität. Als Standardsubstrat diente in dieser Arbeit *para*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP).

pNPP-Test nach WINKLER & STUCKMANN (1979):

8 mM *para*-Nitrophenyl-Palmitat gelöst in Isopropanol wird im Verhältnis 1:10 mit Sörensen-Phosphat-Puffer (50 mM Na₂HPO₄ / 50 mM K₂HPO₄ im Verhältnis 17:1 mit 1 mg/ml Gummi arabicum und 2 mg/ml Natriumdesoxycholat (NaDOC)) vermischt (Endkonzentration im Test: 0,8 mM). Nach Zugabe der Enzymprobe kann die Absorptionsänderung des Gemisches bei 410 nm über die Zeit im Photometer aufgezeichnet werden (Abb. 2.1). Die Enzymaktivität läßt sich daraus nach Formel 1 (Anhang) bestimmen. Der molare Extinktionskoeffizient wird für *p*NPP mit 15000 M⁻¹cm⁻¹ angegeben.

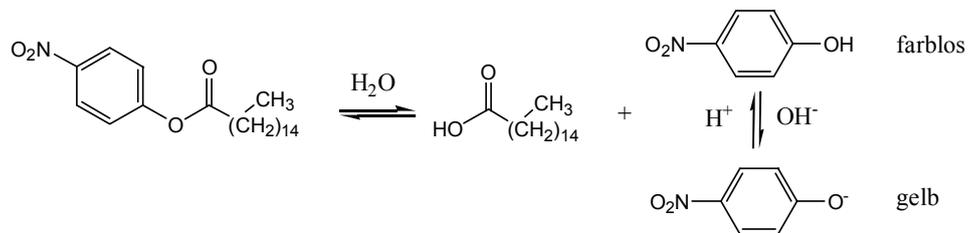


Abb. 2.1: Hydrolyse von *para*-Nitrophenylpalmitat

2.18. Bestimmung von Enzymstabilitäten

Zur Bestimmung der Temperaturstabilitäten von BSLA-Varianten wurden im LipA-Lagerungspuffer (Glycin/NaOH, pH11) die entsprechenden Enzymkonzentrationen eingestellt (Cutlip- und Axelip-Varianten: 20 µg/ml; HPlip-Varianten: 50µg/ml) und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben entnommen und auf lipolytische Restaktivität gegenüber *p*NPP hin untersucht (2.17).

2.19. Hochdurchsatz-Screening von Variantenbibliotheken

Die mittels epPCR hergestellten Bibliotheken mutierter Gene der Lipasevarianten wurden in den Expressionsvektor pET19b kloniert (2.9) und in den T7-Expressionstamm *E. coli*

BL21(DE3) transformiert (2.10). Die Zellen wurden auf Selektiv-Agarplatten (Ampicillin) vereinzelt und nach ausreichender Entwicklung der Kolonien (37 °C ÜN) automatisiert und in großer Zahl (500 – 5000 pro Durchgang) per Pickroboter (Qpix, GENETIX) in 96-Deepwell-Mikrotiterplatten mit TB-Medium/Ampicillin überführt und kultiviert (s. 2.6.3). Die Proteinexpression erfolgte durch Induktion mit 0,4 mM IPTG für 4 h.

Anschließend wurden je 20 µl jeder Zellsuspension in flache, durchsichtige ELISA-Mikrotiterplatten (96-MTP 0,5 ml, (GREINER BIO-ONE, Frickenhausen)) überführt. Sämtliche der im folgenden beschriebenen Pipettierschritte wurden in einem automatisierten Verfahren in einer TECAN Workstation Genesis 200 Freedom der Firma TECAN (Crailsheim) durchgeführt. Mit demselben Gerät wurden die Mikrotiterplatten nach dem Pipettieren automatisch in ein Genios Spektrophotometer (TECAN, Crailsheim) transportiert und vermessen.

Die Lyse der Zellen zur Freisetzung der Enzyme erfolgte direkt in den Mikrotiterplatten (96-MTP 0,5 ml, GREINER BIO-ONE (Frickenhausen)) in denen auch die Absorptionsmessung durchgeführt wurden. Hierzu wurden pro Probe 20 µl Sörensenpuffer mit 1 mg/ml Lysozym in den MTP vorgelegt und 20 µl Zellsuspension dazupipettiert. Nach einer Inkubation von ca. 10 min bei RT war die Lyse vollständig und 160 µl Substratemulsion wurden zum Lysat pipettiert und die MTP zur Messung ins Photometer transportiert, wo die Absorptionsänderung bei 410 nm Wellenlänge über 12 min aufgezeichnet wurde und per Software (Magellan, Fa. TECAN, Crailsheim) ausgewertet werden konnte.

Die *p*NPP-Konzentration in der Substratlösung wurde angepasst auf 8,89 mM in Isopropanol, um die Endkonzentration *p*NPP in der Lösung auf 0,8 mM einzustellen. Sörensenpuffer und Substrat wurden erst direkt vor der Messung vermischt. Standardsubstrat für Lipase-Aktivität war im Zuge dieser Arbeit *p*NPP.

In Fällen, in denen ein vollautomatisiertes Hochdurchsatz-Screening aufgrund des Reaktionsverhaltens der Enzymvarianten nachteilhaft erschien, wurden die Pipettierschritte per Mehrkanalpipette (EPPENDORF, Hamburg) durchgeführt, die Messung erfolgte im Spektralphotometer Spektramax 250 (MOLECULAR DEVICES) und wurde mit Hilfe der Software SOFTmax pro 3.2.1 ausgewertet.

2.20. Aktivitäts-Screening auf Tributyrin-Agarplatten

Tributyrin-Emulsion (7,5 ml Tributyrin, 7,5 ml A. dest und 0,75 g Gummi arabicum 2 min bei 70 W Ultraschall emulgieren) wird mit 0,5 l LB-Selektiv-Agar vermischt und in Petrischalen gegossen. Die Lagerung kann bis zu vier Wochen bei 4 °C erfolgen. Die Emulsion trübt den Agar stark ein. Auf die Tributyrin-Agarplatten werden in ausreichend hoher Verdünnung (vorherige Optimierung) die zu untersuchenden Bakterienkulturen ausplattiert und ÜN bei optimaler Wuchstemperatur bis zur ausreichenden Koloniebildung inkubiert (für *E. coli*: 37 °C ÜN). Um Kolonien, deren Zellen lipolytische Enzyme exprimieren, wird das Tributyrin hydrolysiert und es bilden sich deutlich sichtbare Klärhöfe um die Kolonien, in denen der Agar durchsichtig ist. Die gewünschten Kolonien können in Flüssigmedium überführt und konserviert werden. Zellen, die intrazelluläres Protein exprimieren, können im Anschluss an die Wuchsphase einige Zeit bei 4 °C inkubiert werden um Zellyse hervorzurufen und so die Freisetzung der Enzyme/ Klärhofbildung zu erreichen.

2.21. Bestimmung von Enantioselektivität gegenüber *para*-Nitrophenyl-2-Methyldekanolat

Die beiden Enantiomere des *para*-Nitrophenyl-Esters 2-Methyldekansäure lagen in entantiomerenreiner Form vor. Zur Bestimmung der Enantioselektivität von Lipasen

gegenüber diesem Substrat wurden in jeweils parallelen Reaktionen die Umsätze der Enantiomere spektrophotometrisch gemessen. Anhand des Umsatzes nach einer Zeit t , die sich nach der Reaktionsgeschwindigkeit des jeweiligen Enzyms richtete und in dieser Arbeit, soweit nicht anders angegeben, 5 min betrug, wurde der *ee*-Wert nach CHEN *et al.* (1982) die Enantioselektivität des Enzyms berechnet (Formel s. Anhang).

3. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Varianten der *Bacillus subtilis* Lipase A (BSLA) durch Insertion von Peptidschleifen (*loops*) und Deckelstrukturen der Cutinase aus *Fusarium solani* *pisi*, der Acetylxylylan Esterase aus *Penicillium purpurogenum* sowie der humanen Pankreaslipase konstruiert (Abb. 3.1). Alle drei resultierenden Varianten Cutilip, Axelip und HPlip zeigten Aktivität gegenüber dem Modellsubstrat *para*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP), wenn auch weniger als das Wildtyp-Enzym BSLA. Auf Tributyrin-Agar ausplattierte *E. coli*-Zellen, welche Deckelvarianten exprimierten, zeigten um Kolonien kleinere Höfe als BSLA-exprimierende Zellen (EGGERT *et al.*, 2004). Als Grund dafür wurde angenommen, dass die Deckelbereiche trotz der Homologie der Positionen, an denen sie inseriert wurden und trotz der angenommenen Flexibilität der α/β -Hydrolasestruktur, allein durch ihre Größe die

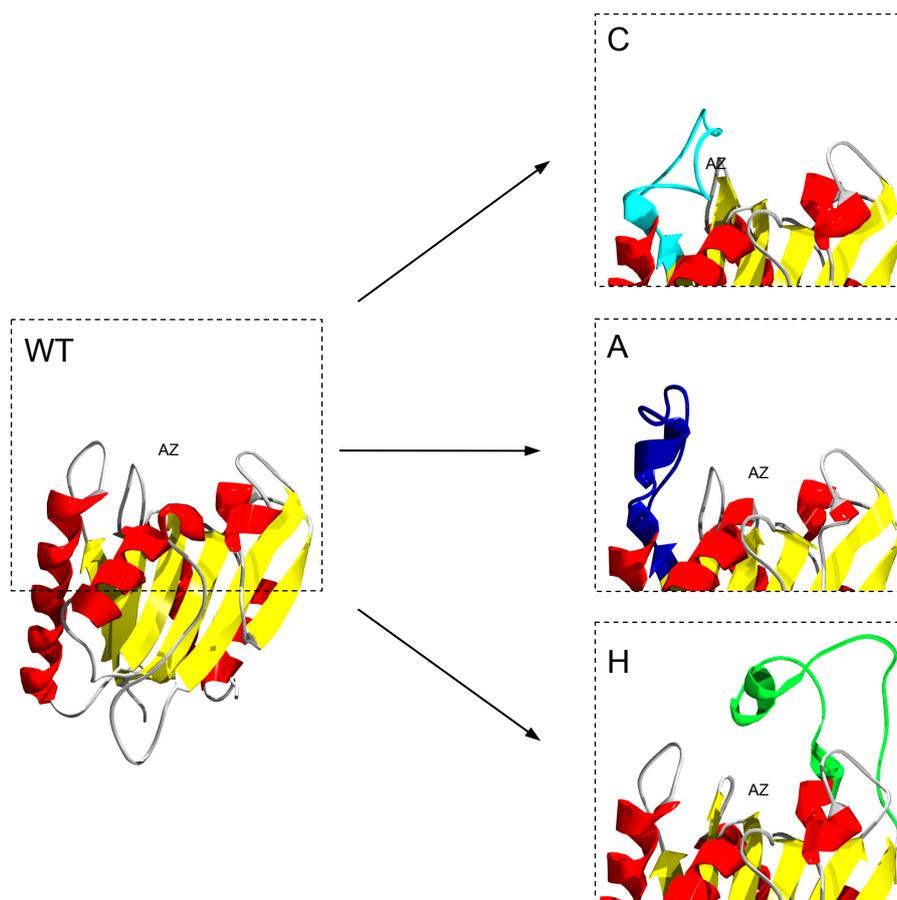


Abb. 3.1: Die Deckelvarianten der *Bacillus subtilis* Lipase A. Links ist die Wildtyp-BSLA ohne Deckel dargestellt (WT), rechts die Varianten Cutilip (C), Axelip (A) und HPlip (H). Die jeweils inserierten Strukturelemente sind farbig hervorgehoben. Die übrige Struktur ist nach Sekundärstrukturelementen gefärbt: α -Helices in rot, β -Faltblätter in gelb. Die jeweiligen Insertionen bilden Verlängerungen von *loops* in direkter Nachbarschaft zum aktiven Zentrum (AZ).

Konformation der BSLA so stark veränderten, dass sich dies in deutlich verringerter Aktivität bemerkbar machte. Da basale Aktivität jedoch nach wie vor vorhanden war, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die minimale α/β -Hydrolase BSLA zwar prinzipiell flexibel genug ist, um große Insertionen aufzunehmen, dass jedoch eine weitere Anpassung oder Justierung an das Proteinerückgrat erfolgen sollte. Diese Feinjustierung könnte durch weitere Modifikationen der Strukturelemente und des Basisproteins erreicht werden, beispielsweise durch Punktmutationen, die geringe Konformationsänderungen des Gesamtproteins zur Folge haben und so die katalytischen Aminosäuren im aktiven Zentrum optimal ausrichten. Diese Punktmutationen auf rationalem Wege zu ermitteln, erfordert die genaue Kenntnis der Struktur der zugrunde liegenden Enzyme und sind auch in exakten Modellen nur äußerst schwierig vorherzusagen (vgl. 3.6). Da die vorliegenden Varianten bislang nicht kristallisiert wurden und über Art und Ausmaß der durch die Insertionen hervorgerufenen Veränderungen nur anhand von Homologiemodellen Hypothesen aufgestellt werden können, hat die Feinjustierung durch gerichtete Evolution hier die größten Erfolgsaussichten.

Als Methodik wurde dabei die fehlerhafte PCR (epPCR) mit anschließendem Hochdurchsatz-Screening gewählt. Die Mutagenese mittels epPCR beschränkte sich dabei nicht auf den Bereich der Deckelstrukturen, sondern erfolgte über die gesamte Länge der jeweiligen Gene, da auch Mutationen im übrigen Protein leichte Konformationsänderungen der Gesamtstruktur und damit eine Reorientierung des aktiven Zentrums zur Folge haben können. Die Schlüsselstellen für eine erfolgreiche Adaption müssen nicht notwendigerweise im Deckelbereich selbst liegen. Da die Axelip-Deckelvariante im Vergleich zu den anderen wesentlich höhere Aktivität zeigte, richtete sich der Fokus bei der gerichteten Evolution zunächst auf die weniger aktiven Deckelvarianten Cutilip und HPlip, da erwartet wurde, dass Reaktivierungseffekte hier deutlicher in Erscheinung treten und daher leichter nachweisbar sind.

3.1. Klonierung und Expression der Deckelvarianten in pET19b

Zur Expression der rekombinanten Proteinbanken wurde das pET-Expressionssystem (NOVAGEN/MERCK BIOSCIENCES) verwendet, wobei der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (MOFFAT & STUDIER, 1986) als heterologer Wirt diente. Die Varianten lagen zunächst im Vektor pET22b vor und wurden in diesem Vektor einer ersten Mutagenese unterzogen. Um eine spätere Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie zu ermöglichen, wurden sie durch Umklonierung in den Vektor pET19b mit einem N-terminalen Histidin-Decamer

fusioniert. Die Klonierung erfolgte durch PCR-Amplifikation mit den Primern *Bup19/22* und *downA19* (2.5) zur *in-frame*-Klonierung über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* (5') und *XhoI* (3'). Die in pET22b-Konstrukten N-terminale *pelB*-Sequenz, die für den Transport des anhängigen Proteins ins Periplasma verantwortlich ist, ist in pET22b nicht vorhanden. Die intrazelluläre Expression der Varianten wurde mittels SDS-PAGE nachgewiesen und ist in Abb. 3.2 dargestellt. Alle Enzymvarianten konnten in signifikanten Mengen produziert werden.

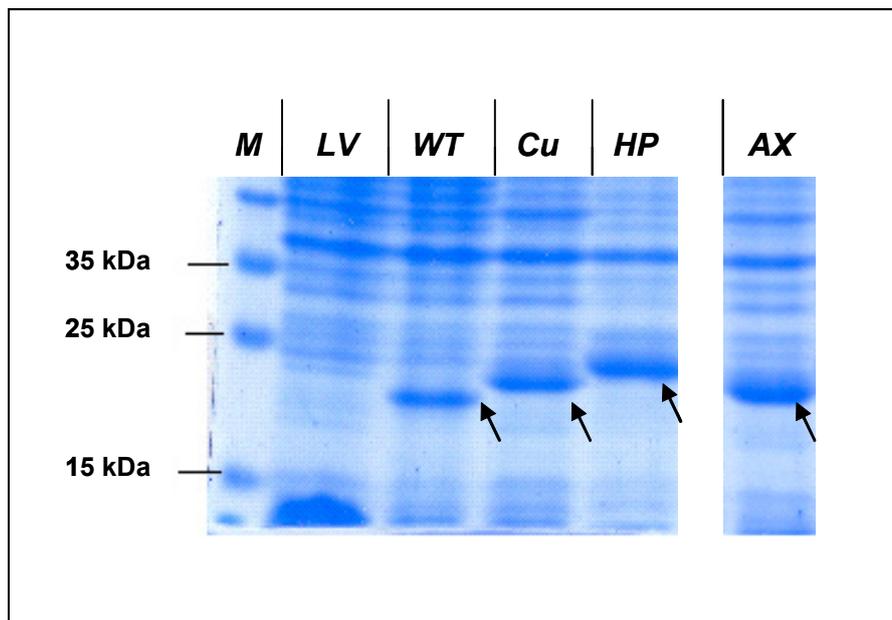


Abb. 3.2: SDS-PAGE der Zellextrakte von Lipase-exprimierenden *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen. Im Vergleich zum Zellextrakt von mit Leervektor (LV) transformierten Zellen lassen sich die Überexpressionsbanden von Wildtyp-BSLA (WT), Cutilip (Cu), HPlip (HP) und Axelip (AX) deutlich erkennen. Alle Banden liegen in der erwarteten Höhe und zeigen die durch die Insertion verursachten Größenunterschiede mit Molekulargewichten von 19,3 kDa (BSLA), 19,8 kDa (Cutilip und Axelip) und 22, kDa (HPlip).

3.2. Entwicklung eines Screeningprozesses zur Detektion von Varianten mit gesteigerter Aktivität gegenüber *para*-Nitrophenylpalmitat

Ein verlässliches Screeningsystem zur Detektion positiv mutierter Varianten ist neben der Mutagenese der entscheidende Bestandteil der gerichteten Evolution von Enzymen. Automatisierte Systeme bieten dabei zwar ein hohes Maß an Effizienz, dennoch existieren eine Reihe von Faktoren, die die Vergleichbarkeit der Proben innerhalb einer Variantenbank beeinträchtigen (KENSY *et al.*, 2005; HERMANN *et al.*, 2003). Die bedeutendsten sind (1) Fluktuationen in Zelldichte und Protein-Expressionsraten innerhalb der verschiedenen

Kulturen einer Enzym-Variantenbank, (2) Pipettierfehler und (3) Instabilität der Enzyme und/oder der Substrate z.B. durch Autohydrolyseerscheinungen. Diese Faktoren wurden daher im Vorfeld analysiert und optimiert, um bei der Beurteilung und Auswahl positiver Varianten entsprechend berücksichtigt werden zu können.

3.2.1. Wuchsverhalten und Expression von BSLA in *E. coli* BL21(DE3) in Deepwell-Mikrotiterplatten

Das Wuchsverhalten von Bakterienkulturen in Deepwell-Mikrotiterplatten (DW-MTP) unterschied sich mitunter erheblich von dem in klassischen mikrobiologischen Gefäßen wie Erlenmeyer- oder Schikanekolben, was u.a. durch Unterschiede im Gasaustausch mit der Umgebung begründet wird (KENSY *et al.*, 2005; HERMANN *et al.*, 2003). Die in der Arbeitsgruppe etablierten Protokolle zur Anzucht, Überexpression und Aufreinigung von BSLA in *E. coli* BL21(DE3) (DETRY *et al.*, 2006) konnten daher nicht ohne Weiteres

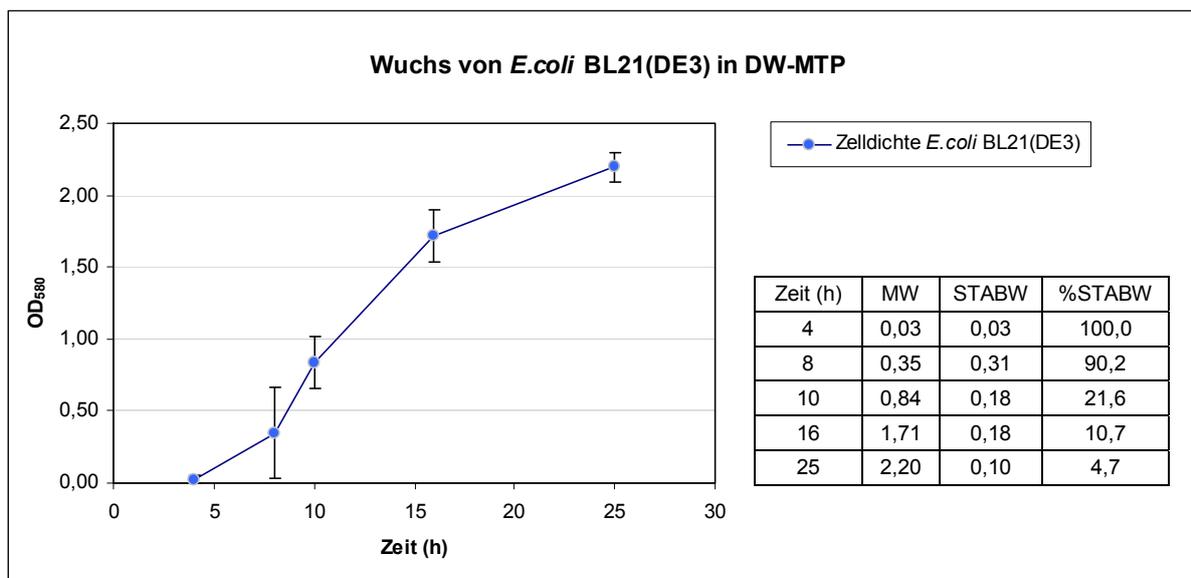


Abb. 3.3: Wuchskurve von *E. coli* BL21(DE3) in Deepwell-Mikrotiterplatten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der Zelldichten von 93 *E. coli*-Kulturen, die in DW-Mikrotiterplatten bei 800 U/min Schüttelfrequenz und bei 37 °C über einen Zeitraum von 25 h gemessen wurden.

auf das Screeningsystem übertragen werden. Im Laufe der Versuche stellte sich der Zeitpunkt der Induktion und der daran gekoppelten Aktivitätsmessung für den Screeningenerfolg als entscheidend heraus. In der Regel erfolgt bei Überexpressionkulturen von *E. coli* die Induktion während der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von ca. 0,4 (OD₅₈₀). In den hier verwendeten DW-MTP wichen die Zelldichten der Einzelkulturen, obwohl die Inokulation per Roboter mit hoher Präzision erfolgt war, in diesem Bereich so stark

voneinander ab (Abb. 3.3), dass eine Induktion nicht sinnvoll war. Erst bei Erreichen der stationären Wachphase nahmen diese Schwankungen ab. Um im Screening vergleichbare Enzymmengen in jeder Probe zu erhalten, war es notwendig, die Proteinüberexpression in einer Phase zu induzieren, in der weitgehend die gleiche Zahl vitaler Zellen in jeder Kultur vorhanden waren. Entgegen der klassischen Vorgehensweise wurde daher in diesem Screeningprozess erst in der stationären Wachphase induziert, um so die Vergleichbarkeit der Einzelproben so weit wie möglich herzustellen.

Trotz Induktion bei weitgehend gleicher Zelldichte traten jedoch Schwankungen der lipolytischen Aktivitäten der einzelnen Kulturen jeder Mikrotiterplatte auf. Relativ betrachtet wurden auch diese geringer, je länger die Inkubation unter Expressionsbedingungen andauerte. Abb. 3.4 zeigt Aktivitätsmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der Proteinüberexpression.

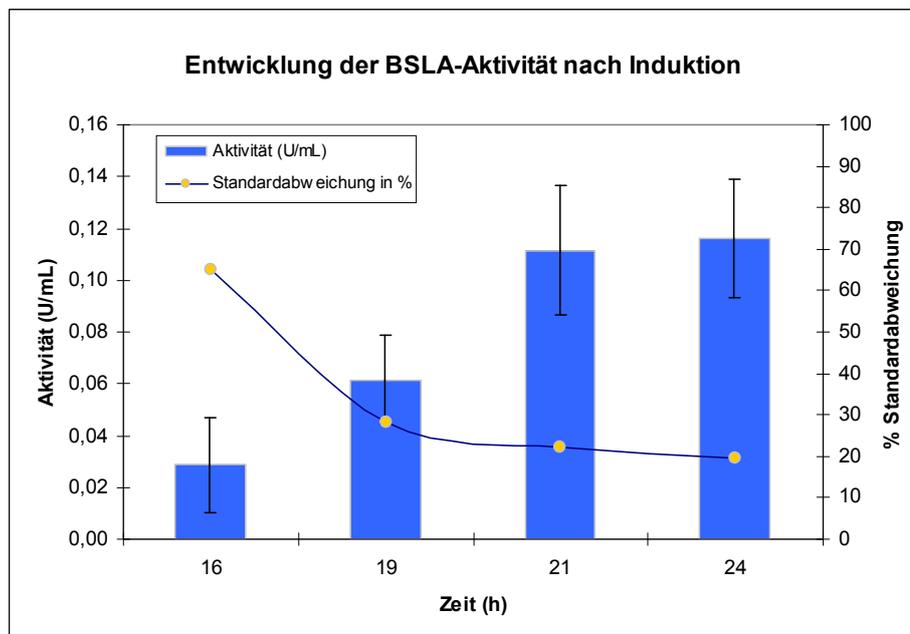


Abb. 3.4: Lipolytische Aktivitäten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Proteinüberexpression in *E. coli* BL21(DE3) LipA. Die Kulturen wurden nach Inokulation per Roboter Qpix in LB-Medium für 16 h bei 37 °C bei 800 U/min in DW-MTP angezogen und anschließend zur Induktion in einer Endkonzentration von 0,4 mM mit IPTG versetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Aktivität gegenüber *para*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP) spektrophotometrisch bestimmt.

Auch die Wahl des Mediums für die Kultivierung in DW-Mikrotiterplatten hatte einen Einfluss. Die Aktivität in LB-Medium war hier teils erheblich geringer als bei Anzucht im Erlenmeierkolben oder Schikanekolben. Es wurde daher das Wachverhalten und die Aktivitätsentwicklung von BL21(DE3)LipA in drei verschiedenen mikrobiologischen Komplexmedien (LB, LB/M9, und TB) unter Screening-Bedingungen miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, dass sich das beste Verhältnis von Zelldichte zu Lipase-Aktivität in

TB-Medium ergab (Abb. 3.5). Da speziell für die Enzymvariante HPlip im Screening auch geringe Aktivitäten detektierbar gemacht werden sollten, wurde basierend auf diesen Ergebnissen im Screening dieser Varianten vorwiegend mit TB-Medium gearbeitet.

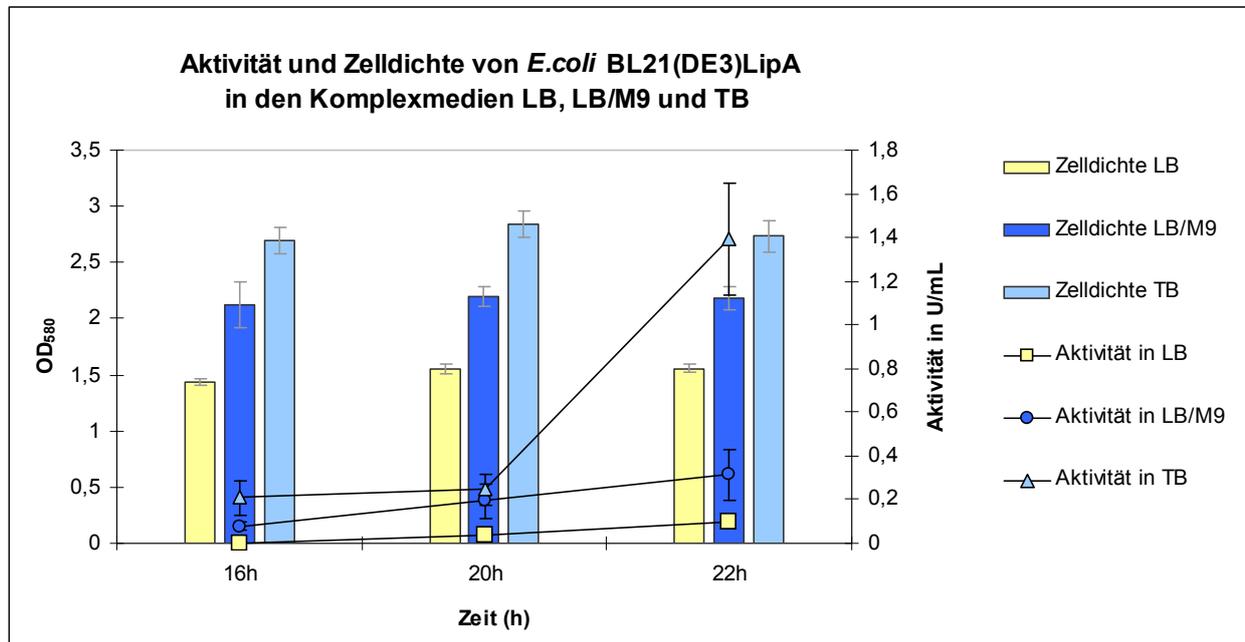


Abb. 3.5: Darstellung der Zelldichte im Vergleich zur BSLA-Aktivität in drei verschiedenen Komplexmedien LB, LB/M9 und TB. Die Anzucht erfolgte in DW-MTP bei 37 °C im Mikrotiterplattenschüttler bei 800 U/min nach automatisierter Inokulation per Qpix-Roboter (GENETIX). Nach 16 h erfolgte die Induktion der Proteinüberexpression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,4 mM. Die erreichten Zelldichten in den einzelnen Proben unterscheiden sich signifikant. Das günstigste Verhältnis von Zelldichte zu Aktivität ergab sich in TB-Medium.

3.2.2. Optimierung des Zellaufschlussverfahrens zur Vereinfachung des Hochdurchsatzscreenings

Die Aktivität intrazellulärer Enzyme wird in Hochdurchsatz-Screeningverfahren im Allgemeinen im Zelllysat gemessen. In gängigen Verfahren werden dabei vor dem Zellaufschluss sämtliche Kulturen einer Bank durch Überimpfung in weitere MTP dupliziert, um nach Lyse und Vermessung des einen Anteils später die Plasmide positiver Varianten aus dem Duplikat isolieren zu können.

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren für *E. coli* etabliert, bei dem nicht die gesamten Kulturen aufgeschlossen werden müssen, sondern nur die im Screening eingesetzten Aliquote. Dies kann in derselben Mikrotiterplatte erfolgen, in der im Anschluss die Aktivitätsmessung stattfindet. So bleiben ursprünglichen Kulturen erhalten. Neben der Einsparung des aufwändigen zusätzlichen Arbeitsschrittes wird auf diese Weise Pipettierfehlern vorgebeugt,

die durch inhomogene Viskositäten der Zellysate bei der Übertragung der sehr kleinen Volumina (wenige μl) im Screening zu signifikanten Meßfehlern führen können.

Dazu wurden aus einer homogenen, BSLA-exprimierenden *E. coli* BL21(DE3)-Kultur 20 μl Proben in photometergängigen 96-well Mikrotiterplatten mit je 20 μl Lysozymlösungen verschiedener Konzentrationen versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aktivitätsmessung erfolgte direkt nach Zugabe von je 160 μl Substratlösung (Endkonzentration 0,8 mM *p*NPP). Es wurden zunächst verschiedene Lysozymkonzentrationen und zwei verschiedene Puffer getestet (Abb. 3.6) wobei sich herausstellte, dass der Zellaufschluss in Sörensenpuffer, der für die Substratlösung im Screening verwendet wurde, ebenso effiziente Zellyse ermöglicht wie Lysepuffer, der für etablierte Zellaufschlussverfahren bei Proteiaufreinigungen im größeren Maßstab verwendet wird (30 mM Imidazol; 300 mM NaCl; 50 mM NaH_2PO_4 ; pH 8,0). Es zeigte sich, dass die gemessene Aktivität der Lysate knapp 50 % höher war als die der nicht aufgeschlossenen Zellen. Die Verwendung von höheren Konzentrationen Lysozym führte nicht zu einer weiteren Steigerung der Aktivität, ebensowenig eine Verlängerung der Inkubationszeit (nicht abgebildet), weshalb von einem vollständigen Zellaufschluss durch 1 mg/ml Lysozym in diesem Verfahren ausgegangen werden kann.

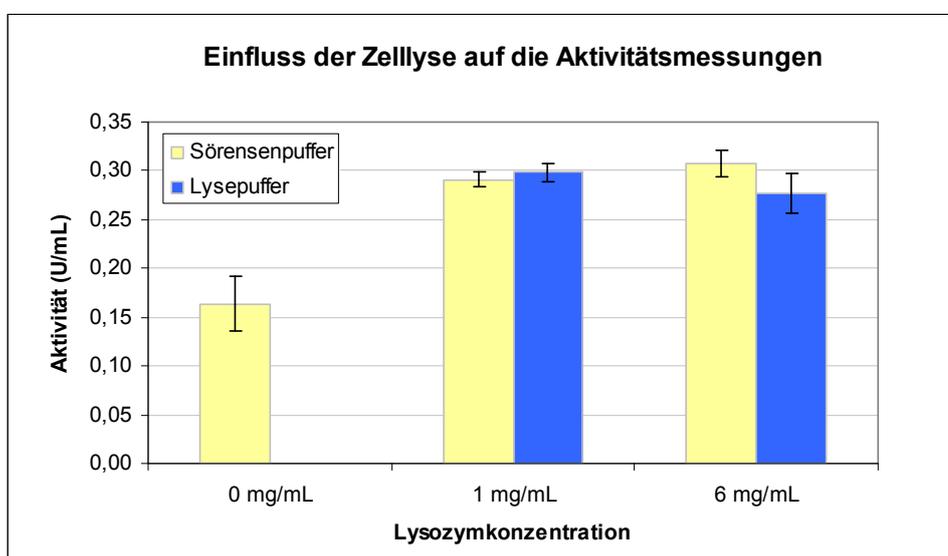


Abb. 3.6: Etablierung des Zellaufschlussverfahrens in Mikrotiterplatten. Je 20 μl Zellsuspension wurden vorgelegt, anschließend wurden Lysozymlösungen von je 1 mg/ml und 6 mg/ml Lysozym in Lysepuffer (2.13) sowie Sörensenpuffer zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Lipaseaktivität der Lysate gemessen. Als Kontrolle diente Assay-Puffer (Sörensen) ohne Lysozym. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte der Messungen sechs voneinander unabhängiger Proben.

3.2.3. Festlegung eines Schwellenwertes zur Definition von positiven Varianten

Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Schwankungen der Aktivität in Überexpressionskulturen von *E. coli* BL21(DE3) stellen im Screening insbesondere ein Problem durch das Zustandekommen falsch-positiver und falsch-negativer Messsignale dar. Falsch-negative Varianten fallen bei der Bewertung der Enzymaktivitäten als solche nicht auf und gehen als möglicherweise wertvolles Ergebnis verloren. Falsch-positive stellen ein Problem dar, indem sie einen erheblich höheren Arbeits- und Materialaufwand verursachen. Schwankungen, die sich nicht durch vorherige Optimierung der Screeningbedingungen vermeiden ließen, mussten daher bei der Beurteilung der Screeningergebnisse berücksichtigt werden, insbesondere bei der Definition des kritischen Aktivitätswertes, ab dem eine Variante als „positiv“ klassifiziert werden sollte. Bei der Festlegung dieses Richtwertes diene eine Anzahl von mindestens 30 zuvor vermessener Kontrollproben als Orientierung.

In jedem Screeningansatz wurden mindestens 30 Kulturen der jeweiligen Kontrollgruppen in einer separaten DW-MTP angezogen und durchliefen dasselbe Verfahren wie die eigentlichen Proben. Die Kontrollgruppen wurden dabei aus derselben Charge transformationskompetenter *E. coli*-Zellen durch Transformation mit pET19lipA erstellt. Nach der Proteinüberexpression wurde die durchschnittliche Aktivität dieser Kontrollgruppe ermittelt sowie die maximale, prozentuale Abweichung vom Mittelwert (in %). Bei der späteren Auswertung der Screening-Ergebnisse wurde stets das *worst-case*-Szenario angenommen, indem davon ausgegangen wurde, dass der Aktivitätswert der jeweiligen Kontrollprobe auf jeder Mikrotiterplatte der niedrigst mögliche Wert sei (maximale

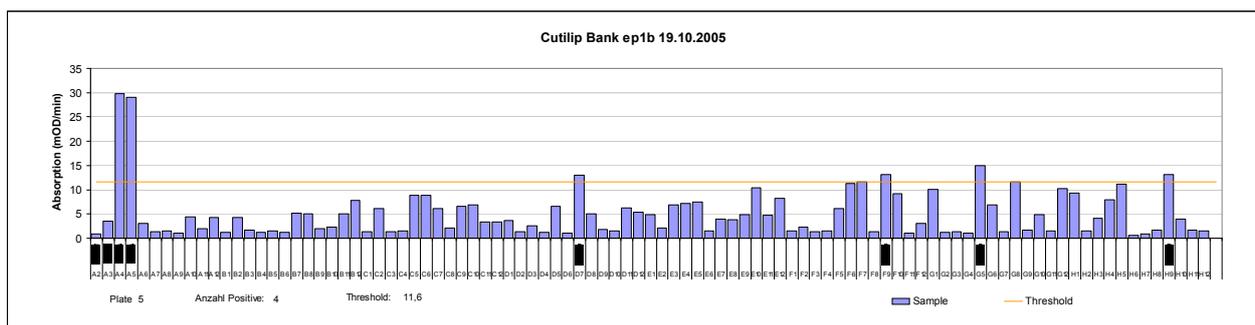


Abb. 3.7: Auswertungsschema eines Screeningprozesses. Um die Schwankung der Aktivitäten der Einzelkulturen zu berücksichtigen, wurde ein Richtwert definiert, oberhalb dessen eine Variante als positiv deklariert wurde. Der Richtwert (orange Linie) wurde für jede Mikrotiterplatte nach Eingabe der Daten der Kontrollplatte per Software (*Magellan*, *SOFTmaxPro* und *Excel*) berechnet und automatisch in das Diagramm eingefügt (Threshold). Links im Diagramm waren stets die Werte der Negativkontrolle (negKtr) sowie die Positivkontrollen BSLA und Cutilip angegeben, wobei letztere als Grundlage für die Festlegung des Schwellenwertes diene. Die positiven Proben wurden zusätzlich unter der x-Achse angezeigt. Über Grenzfälle wurde im Einzelnen entschieden.

Abweichung). Der Prozentsatz der maximalen Abweichung der Kontrollgruppe wurde zum Aktivitätswert der jeweiligen Kontrollprobe hinzuaddiert (Formel 3.1). So ergab sich ein Wert, der mit hinreichender Wahrscheinlichkeit oberhalb der Schwankungsbreite der jeweiligen Kontrolle lag und dennoch das Wuchsverhalten der Kulturen jeder Mikrotiterplatte individuell berücksichtigte. Proben, deren Aktivität über diesem Wert lagen, wurden anschließend als „positiv“ ausselektiert. Die Auswertung der Daten konnte somit durch Anwendung einer entsprechenden Berechnung innerhalb der Software *Magellan* (TECAN) bzw. *SOFTmaxPro* (MOLECULAR DEVICES) weitgehend automatisiert werden. Die graphische Darstellung erfolgte entweder in den jeweiligen Programmen selbst oder durch Export der Dateien in MICROSOFT-*Excel* (Abb. 3.7) Dennoch wurde jede Platte während des Screenings noch einmal gesondert überprüft und über Grenzfälle im einzelnen entschieden. In Fällen, in denen die *worst-case*-Annahme für den jeweiligen Kontrollwert nicht praktikabel war, wurde der Richtwert manuell festgelegt.

$T = \frac{x + 2 \cdot M \cdot x}{100}$		
T	=	Schwellenwert
M	=	Maximale Abweichung der Aktivitäten der Kontrollgruppe vom Mittelwert
x	=	Mittelwert der Aktivitäten der Kontrollgruppe

Formel 3.1.: Festlegung des Schwellenwertes für positive Proben im Hochdurchsatz-Screening.

Positive Klone wurden aus der jeweils korrespondierenden DW-Mikrotiterplatte entnommen, ihre Plasmid-DNA isoliert und erneut in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Pro positivem Klon wurden mindestens acht Retransformanden in DW-MTP angezogen und ihre Aktivität erneut bestimmt, um die vorherigen Ergebnisse zu reproduzieren. Durch dieses automatisierte Protokoll war es möglich, auch große Variantenbanken effizient zu screenen.

3.3. Gerichtete Evolution der Deckelvarianten der *Bacillus subtilis* Lipase A: Reaktivierung der Varianten Cutilip und HPlip

Zur gerichteten Evolution der Deckelvarianten Cutilip und HPlip wurden zunächst jeweils Variantenbanken durch Zufallsmutagenese erstellt. Diese erfolgte mittels fehlerhafter PCR. Durch Verwendung von *Taq*-DNA-Polymerase bei 6,0 mM MgSO₄ und 0,15 mM MnSO₄ wurde dabei eine durchschnittliche Fehlerrate von 3-4 pro 1.000 bp erreicht, ermittelt aus 40

verschiedenen sequenzierten Varianten. Versuche mit höherer Fehlerrate von 5-7 pro kb (JAEGER *et al.*, 2001) wurden ebenfalls durchgeführt. Ein Screening der ersten 2.200 Klone einer solchen Bank zeigte jedoch einen Aktivitätsverlust bei über 90 % der Proben ohne die Entstehung einer verbesserten Variante, so dass ein solcher Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Die epPCR-Banken wurden wie beschrieben kloniert, transformiert und anschließend im Hochdurchsatzverfahren auf Aktivität untersucht. Pro Generation und Ausgangsvariante umfassten die untersuchten Banken ca. 3.500 Einzelklone. Insgesamt wurden drei Generationen mit Cutilip-Konstrukten und zwei Generationen mit HPlip-Konstrukten durchgeführt, so dass sich ein Gesamtumfang von ca. 17.500 Klonen für die Banken aus der ungerichteten Mutagenese ergab. Der Anteil aktiver Klone lag jeweils zwischen 50 und 80 %. Nach jedem Screening wurden je 20 bis 30 der aktivsten Klone isoliert und nach Retransformation der Plasmide in Mehrfachbestimmung erneut auf Aktivität untersucht. Falsch-positive wurden dabei aussortiert und verworfen. Zwischen vier und sechs der aktivsten Varianten pro Generation wurden nach Bestätigung der Aktivität sequenziert.

Die Aktivitäten der Deckelvarianten Cutilip und HPlip gegenüber *pNPP* konnte durch die gerichtete Evolution innerhalb von zwei bzw. drei Generationen epPCR erheblich gesteigert werden. Im Falle der Cutilip-Variante wurde die Aktivität von 8 % auf 45 % der Wildtypaktivität gesteigert, im Falle der Variante HPlip von knapp 2 % auf rund 16 % der Wildtypaktivität. Besonders auffällig war, dass in keiner der Varianten Mutationen in den zentralen β -Faltblättern auftraten. Einzige Ausnahme ist der Austausch K35R in HPlip, der an der ersten Position des β 4-Stranges stattfand, jedoch vermutlich nur geringe Auswirkungen auf die Enzymaktivität hat. Die genauen Auswirkungen der Einzelmutationen werden in Kapitel 4 diskutiert.

In beiden evolvierten Deckelvarianten traten während der ungerichteten Mutagenese unabhängig voneinander verschiedene Mutationen des Phenylalanins an Position 17 auf. In der Cutilip-Deckelvariante traten weiterhin mehrfach Mutationen an Position 91 auf. Diese *Hotspot*-Positionen wurden daher im Anschluss einer Sättigungsmutagenese unterzogen. Dies wurde sowohl mit den beiden Deckelvarianten durchgeführt als auch mit einigen ihrer Punktmutanten aus der ersten Generation, um eventuelle Synergieeffekte aus Kombinationen von positiven Mutationen zu erreichen. Eine Übersicht über die Enzymvarianten, mit denen eine Sättigungsmutagenese durchgeführt wurde, ist weiter unten in Tab. 3.1 gegeben.

3.3.1. Die Aktivität der Cutilip-Varianten gegenüber pNPP konnte bis auf 45 % Wildtypaktivität gesteigert werden

Nach zwei Generation ungerichteter Mutagenese der Cutilip-Deckelvariante konnte die Dreifach-Punktmutante A59T/ N91S/ Q187L identifiziert werden, deren Aktivität gegenüber *para*-Nitrophenylpalmitat im Vergleich zum Ausgangskonstrukt Cutilip um 70 % gesteigert war (Abb. 3.8). Da bereits in der ersten Generation an den Positionen F17 und N91 mehrfach unterschiedliche Mutationen aufgetreten waren, wurde Cutilip an diesen Positionen jeweils einer Sättigungsmutagenese unterzogen (Tab. 3.1), wobei die Aktivität im Falle der Position 17 durch Austausch des Phenylalanins durch Tyrosin noch einmal um 21 % erhöht werden konnte. An Position 91 bewirkte das Ersetzen des Asparagins durch Leucin eine weitere

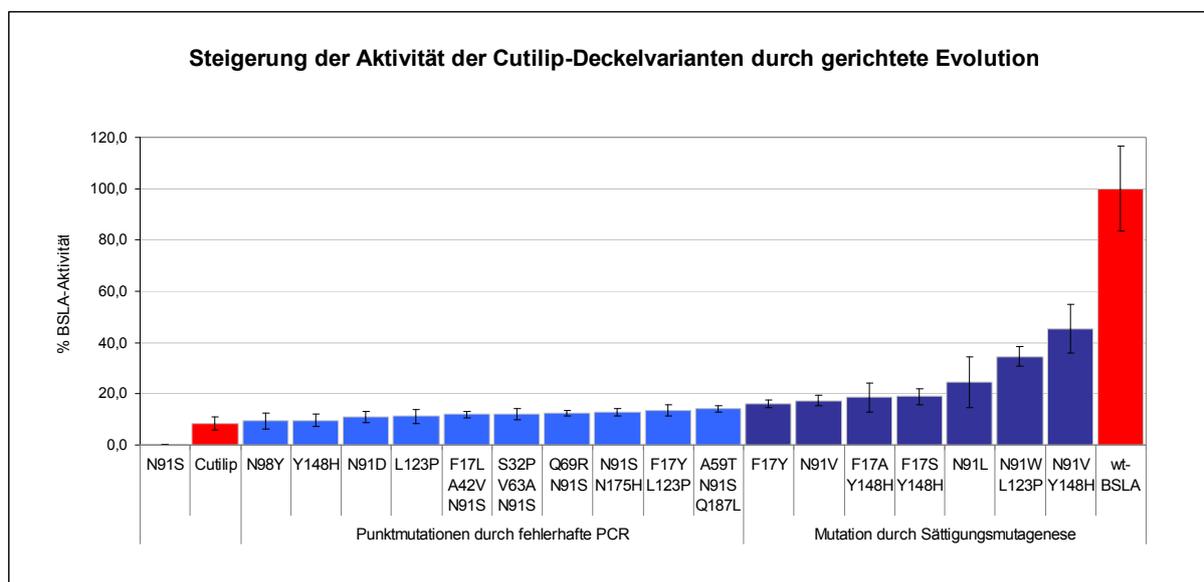


Abb. 3.8: Steigerung der lipolytischen Aktivität der Cutilip-Deckelvariante durch fehlerhafte PCR und Sättigungsmutagenese. Die Aktivitäten des Ausgangskonstruktes Cutilip sowie der Wildtyp-BSLA sind in rot dargestellt, die Varianten aus der ungerichteten Mutagenese in hellblau. Sie sind nach Reihenfolge ihres Auftretens im Verlauf der Evolution geordnet. Mutanten aus Sättigungsmutagenesen sind in dunkelblau dargestellt. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Mutationen der einzelnen Varianten angegeben.

Erhöhung der Aktivität um 37 %. An denselben Positionen wurden daraufhin auch die anderen positiven Varianten der ersten Generation L123P und Y148H gesättigt, was zu einer maximalen Aktivitätssteigerung durch Kombination der Mutationen N91V und Y148H führte. Diese Mutante wies 543 % der Cutilip-Aktivität auf, was umgerechnet 45 % der Aktivität der Wildtyp-BSLA bedeutet.

Interessanterweise hatte die Mutation N91S einzeln in Cutilip eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge, sofern es als 10xHis-Fusionsprotein exprimiert wurde. Wie weiter unten beschrieben, war dies nicht der Fall in Varianten, die in pET22b ohne 10xHis-Fusion

exprimiert wurden. Das Histidin-Dekamer scheint daher in dieser Variante eine Inaktivierung zur Folge zu haben.

3.3.2. Die Aktivität der HPlip-Varianten konnte lediglich auf 16 % der Wildtypaktivität gesteigert werden.

Auch die Aktivität von HPlip konnte durch ungerichtete Mutagenese um ein Vielfaches gesteigert werden (Abb. 3.9), die Aktivitätsoptimierung dieser Deckelvariante erwies sich jedoch als schwieriger als die des Cutilip-Konstruktes. Insgesamt traten neun aktivitätssteigernde Mutationen auf, davon lagen vier im inserierten Deckelbereich. Die aktivste Mutante F17Y/ M137L wies im Vergleich zum Ausgangskonstrukt HPlip eine 11-fach gesteigerte Aktivität auf. Verglichen mit der Aktivität der Wildtyp-BSLA waren dies

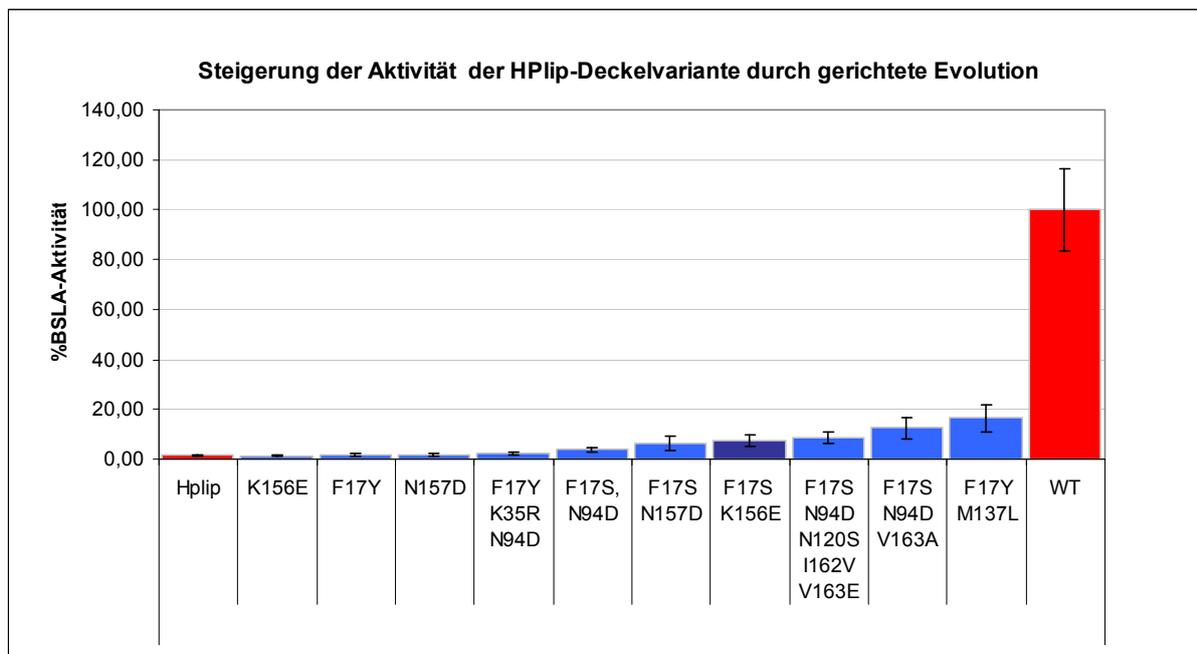


Abb.3.9: Aktivitätssteigerung der Variante HPlip durch gerichtete Evolution. Wildtyp-Aktivitäten sind in rot dargestellt, Aktivitäten von Varianten aus epPCR-Mutagenese in hellblau, Varianten aus Sättigungsmutagenese in dunkelblau. Die aktivste Variante zeigt 16 % BSLA-Aktivität.

jedoch lediglich ca. 16 %. In diesem Fall zeigte sich die Aminosäure F17 als besonders bedeutend, da sie in fast allen positiven Mutanten zu Serin oder zu Tyrosin mutiert war. Interessanterweise traten diese Mutationen in den meisten Fällen bereits während der ungerichteten Mutagenese auf, die spätere Sättigungsmutagenese erbrachte hier keine weiteren vorteilhaften Substitutionen (Tab. 3.1). Nur in Kombination mit K156 aus der ersten Generation konnte hier eine weitere positive Variante isoliert werden, die zwar im Screening

der Sättigungsbank als positiv identifiziert wurde, deren Aktivität jedoch hinter denen der Varianten aus der ungerichteten Mutagenese zurückblieb. Auch an Position V163 traten zwei verschiedene Mutationen auf. Auch an Position N82, die der *Hotspot*-Position N91 der Cutilip-Deckelvariante entspricht*, wurde mit der HPlip-Deckelvariante eine Sättigungsmutagenese durchgeführt. Hier konnte jedoch im Screening keine Variante mit gesteigerter Aktivität gegenüber *pNPP* identifiziert werden. Die meisten Klone der angelegten Sättigungsbank zeigten auch nach Verlängerung der Meßdauer um 30 min keinerlei lipolytische Aktivität.

3.3.3. Die Aminosäuren an den Position 17 und 82 sind entscheidend für die Aktivität der Wildtyp-BSLA.

Im Zuge der gerichteten Evolution der beiden Deckelvarianten Cutilip und HPlip hatte sich das Phenylalanin an Position 17 als kritisch für die Aktivität gegenüber *pNPP* herausgestellt, die Position 91, die in der Wildtyp-BSLA der Position 82 entspricht, hatte sich nur in der Cutilip-Sequenz als *Hotspot*-Position erwiesen. Ihre Sättigung hatte in den HPlip-Varianten zu keiner weiteren Aktivitätssteigerung geführt. In weiteren Versuchen sollte nun untersucht werden, ob die Mutationen an diesen Positionen die möglicherweise durch die großen Deckelinsertionen bedingten Aktivitätsverluste komplementieren oder aber eine generell kritische Position für die Aktivität der BSLA unter den verwendeten Bedingungen darstellt.

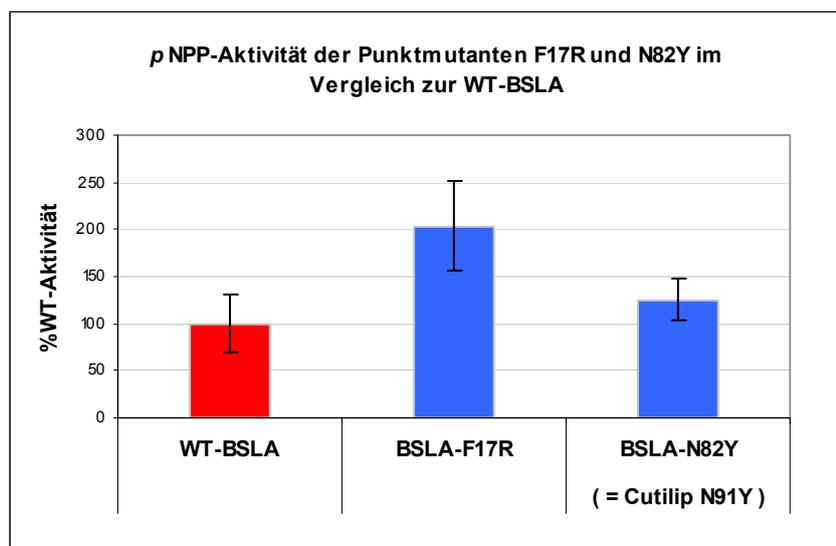


Abb. 3.10: Steigerung der Aktivität der Wildtyp-BSLA gegenüber *pNPP* durch Sättigungsmutagenese an den Positionen 17 und 82. Die Aktivitäten wurden auf die WT-BSLA (100 %) bezogen. Die Mutante F17R zeigte verdoppelte Aktivität, die Substitution des Aspartat durch Tyrosin an Position 82 bewirkte eine ca. 25 %ige Steigerung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Messungen aus je vier verschiedenen Expressionen.

Die Positionen wurden daher auch im Wildtyp-Enzym BSLA jeweils einer Sättigungsmutagenese unterzogen. Die in den resultierenden Banken auftretenden Aktivitäten waren breit gestreut von inaktiv bis deutlich aktiver als die WT-BSLA. Die aktivsten Varianten wurden isoliert und retransformiert. Nach der Reproduktion wurde jeweils die Mutanten mit der höchsten Aktivität sequenziert. Es zeigte sich, dass die Aminosäuresubstitution von Phenylalanin zu Arginin an Position 17 in der WT-BSLA eine Aktivitätssteigerung gegenüber *p*NPP um 104 % zur Folge hatte. An Position 82 bewirkte die Substitution von Asparagin durch Tyrosin eine Erhöhung der Aktivität um ca. 25 % (Abb. 3.10). Diese Mutationen waren beim Screening der Sättigungsbanken der jeweiligen Deckelvarianten nicht auffällig geworden.

Tab. 3.1: Aufstellung der als positiv identifizierten Mutationen nach Screening der Sättigungsbanken an den Positionen F17 und N91 (bzw. N82). Im Falle der Deckelvariante HPlip und der HPlip-Punktmutante N157D konnte durch die Sättigungsmutagenese an Position 17 keine weiter verbesserte Variante identifiziert werden, als die, die bereits in der ungerichteten Mutagenese aufgetreten waren (F17Y). Durch Sättigung der Position 82 konnte bei keiner der HPlip-Varianten eine Steigerung der Aktivität erreicht werden.

Enzym / Variante	Mutationen aus Sättigungsmutagenese	
WT-BSLA	F17R	Einfachmutanten
	N82Y	
Cutilip	F17Y	Einfachmutanten
	N91V	
	N91L	
Cutilip-L123P	F17Y	Doppelmutanten
	N91W	
Cutilip-Y148	F17A	
	F17S	
	N91V	
HPlip	-	
HPlip-K156E	F17S	Doppelmutante
HPlip-N157D	-	

3.4. Charakterisierung und Substratspektrum der Varianten

3.4.1. Aktivitäten gegenüber Fettsäureestern verschiedener Kettenlänge

Zur weiteren Charakterisierung der Deckelvarianten wurden ihre Aktivitäten gegenüber *p*NP-Estern von Fettsäuren verschiedener Länge untersucht (Abb. 1.12-14). Da nicht alle der verwendeten Substrate unter den im Screening verwendeten Bedingungen stabil waren, wurde hierbei ein anderes Protokoll zur Messung der Enzymaktivität verwendet, als das im

Screening eingesetzt: Es wurde Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) mit 1 % Gummi arabicum anstelle des im Screening verwendeten Sørensen-Phosphat-Puffers verwendet und die Substrate in DMSO anstelle von Isopropanol gelöst, bevor die Substratemulsion hergestellt wurde. Die übrigen Schritte erfolgten nach Standardverfahren.

Bei den Cutilip-Deckelvarianten zeigten sich die höchsten Aktivitäten bei Substraten mit kurzen Fettsäureseitenketten (Abb. 3.11). Eine deutliche Ausnahme davon war die Cutilip-Doppelmutante N91W/L123P, die die höchste Aktivität gegenüber *p*NP-Caprylat (C8:0) aufwies. Des Weiteren nahm bei allen vermessenen Enzymen die Aktivität mit steigender Kettenlänge ab bis zu einer Fettsäurekettenlänge von zwölf C-Atomen. Dann jedoch wurden die Unterschiede gegenüber längeren Fettsäureestern zunehmend geringer. Dieses Muster verlief bei allen gemessenen Enzymen, außer der genannten Doppelmutante, nahezu gleich. Letztere zeigte im Vergleich zu den anderen Deckelvarianten eine deutlich erhöhte Aktivität gegenüber allen Substraten mit Ausnahme von *p*NP-Butyrat (C4:0).

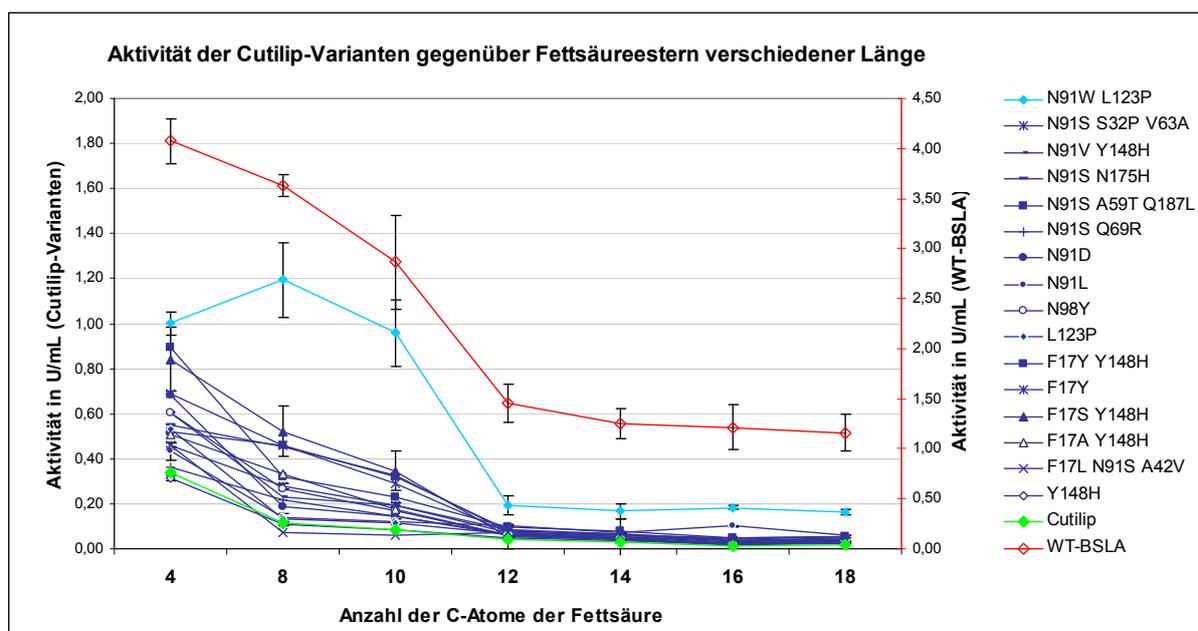


Abb. 3.11: Aktivitätsspektrum der Cutilip-Punktmutanten gegenüber Fettsäure-*p*NP-Estern. Aufgrund der großen Aktivitätsunterschiede beziehen sich die Werte der WT-BSLA (rot) sich auf die rechte der beiden Y-Achsen des Diagrammes, alle übrigen auf die linke. Dargestellt sind Mittelwerte der Aktivitäten je vier voneinander unabhängiger Kulturansätze. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Fehlerbalken nur für einige repräsentative Enzyme angegeben. Alle Varianten wurden jeweils gleichzeitig und gegebenenfalls in Verdünnung in derselben Substratemulsion in Mikrotiterplatten vermessen. Die Substrate wurden zunächst in DMSO gelöst und anschließend in Tris-HCl-Puffer pH 8,0 mit 1 % Gummi arabicum emulgiert. Die jeweiligen Punktmutationen sind in der Legende rechts angegeben.

Für die HPlip-Varianten zeigte sich ein leicht abgewandeltes Bild (Abb. 3.12). Die Aktivitäten gegenüber *p*NP-Butyrat waren vergleichsweise hoch fielen jedoch mit zunehmender Länge der Fettsäure ab. Die Aktivitäten gegenüber *p*NP-Dodekanoat und *p*NP-

Myristat jedoch waren anschließend wieder leicht höher als die der mittellangen FS-Ester C8:0 und C10:0. Mit weiter steigender FS-Kettenlänge sank die Aktivität wieder ab. Dieses Muster zeigte sich für sämtliche Varianten. Wie bei den Cutilip-Varianten gab es auch hier eine Punktmutante (F17Y/M137L), die eine insgesamt höhere Aktivität gegenüber allen Substraten aufwies. Weiterhin fiel auf, dass die Varianten, in denen an Position 17 Phenylalanin durch Serin ersetzt war (Abb. 3.12, blau), eine deutlich höhere Aktivität gegenüber dem kurzen Fettsäureester *p*NP-Butyrat aufwiesen als andere, und sogar die ansonsten aktivste Variante F17Y/M137L übertrafen. Offenbar bewirkt die Mutation F17S eine für kurzkettige Fettsäuren spezifische Substratpräferenz.

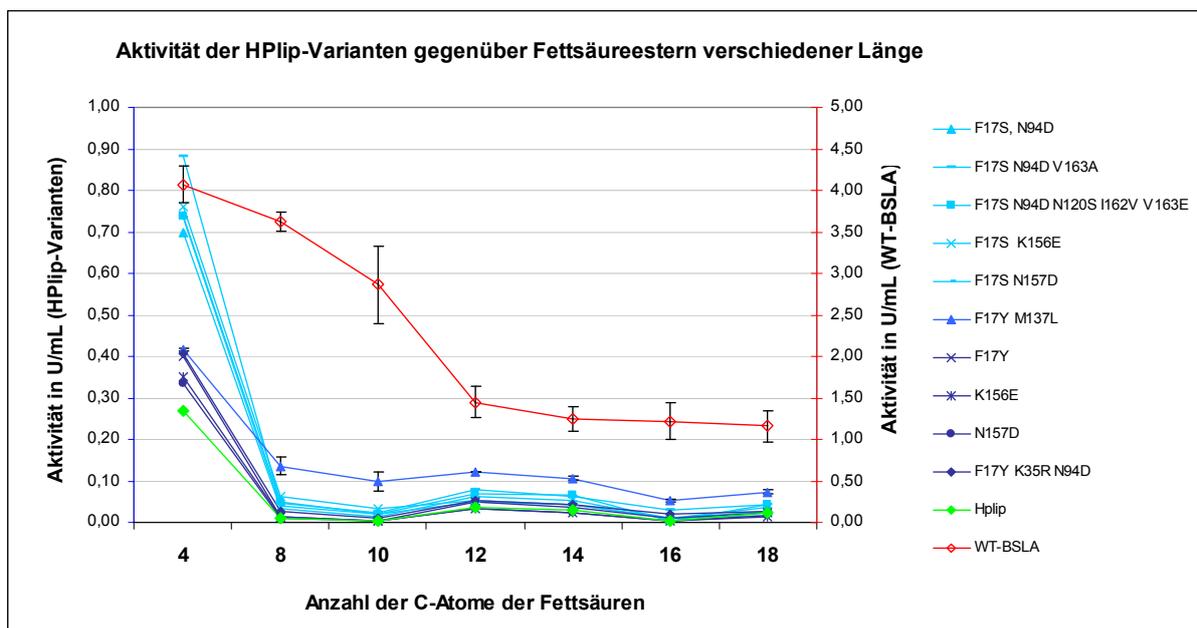


Abb. 3.12: Aktivitätsspektrum der HPLip-Punktmutanten gegenüber Fettsäure-*p*NP-Estern. Aufgrund der großen Aktivitätsunterschiede sind zwei unterschiedliche Y-Achsen angegeben - Die Werte der WT-BSLA (rot) beziehen sich auf die rechts dargestellte Y-Achse des Diagrammes, alle übrigen auf die linke. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht für alle Werte Fehlerbalken angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte der Aktivitäten von je 4 voneinander unabhängigen Kulturansätzen. Alle Varianten wurden jeweils gleichzeitig in derselben Substratemulsion in Mikrotiterplatten vermessen. Die Substrate wurden zunächst in DMSO gelöst und anschließend in Tris-HCl-Puffer pH 8,0 mit 1 % Gummi arabicum emulgiert.

Die aus den Sättigungsmutagenesen an Position 17 und 82 hervorgegangenen aktivsten Mutanten des Wildtypenzym BSLA F17R und N82Y ließen solche Tendenzen nicht erkennen (Abb. 3.13). So zeigte die Mutante F17R zwar eine leicht höhere Aktivität gegenüber dem kurzkettigen Substrat *p*NP-Butyrat (C4:0) als die WT-BSLA, jedoch fiel die Aktivität nicht so drastisch gegenüber *p*NP-Caprylat (C8:0) ab, wie bei den F17S-HPLip-Mutanten, sondern blieb auch bei längererkettigen Substraten dem Wildtyp ähnlich. Auch fiel auf, dass sich die im Sörensen-Phosphatpuffer deutlichen Aktivitätsunterschiede zwischen WT-BSLA und ihren Punktmutanten unter diesen Bedingungen nicht reproduzieren ließen.

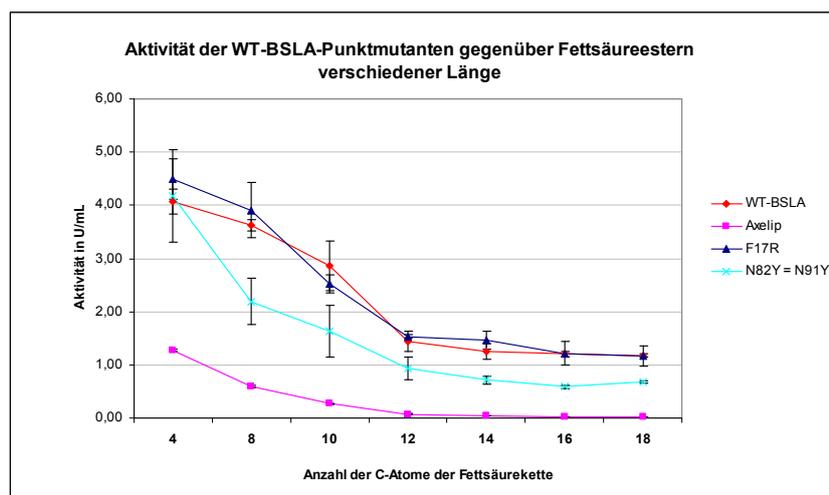


Abb. 3.13: Aktivitätsspektrum der WT-BSLA und ihrer Mutanten gegenüber Fettsäure-*p*NP-Estern unterschiedlicher Länge. Dargestellt ist weiterhin das Aktivitätsspektrum der Axelip-Deckelvariante.

Während im Sørensen-Phosphatpuffer die F17R-Mutante die doppelte Aktivität im Vergleich zum WT aufwies und die N82Y-Mutante immerhin eine Zunahme von 25 %, war letztere im DMSO/Tris-HCl-System gegenüber den meisten Fettsäureestern, mit Ausnahme von *p*NP-Butyrat (C4:0), sogar nur rund halb so aktiv wie die WT-BSLA.

In Abb. 3.13 ist weiterhin das Aktivitätsspektrum der Deckelvariante Axelip gegenüber diesen Substraten dargestellt, deren Aktivität größenordnungsmäßig der aktivsten Cutilip-Variante ähnelt. Die Kurve zeigt deutlich die Substratpräferenz im Bereich der kürzeren Fettsäure-*p*NP-Ester, jedoch mit im Vergleich zum WT geringerer Gesamtaktivität. Auch wirkte die Präferenz der kurzkettigen Fettsäureester nicht so stringent wie im Falle der WT-BSLA, da hier bei 12 Kohlenstoffatomen in der Fettsäure eine Art Schwellenwert zu sein schien, ab dem sich die Aktivität nicht mehr signifikant ändert.

3.4.2. Substratspezifität der evolvierten Deckel-Varianten gegenüber verzweigten Substraten

Neben der Aktivität gegenüber unverzweigten Fettsäureestern wurden auch die Aktivitäten gegenüber verzweigten Substraten bestimmt. Es handelte sich dabei um racemisch vorliegende *para*-Nitrophenyl-Ester verschiedener pharmazeutisch und technisch eingesetzter Carbonsäuren, die ebenfalls eine einfache Verzweigung in α -Position aufweisen. Diese Substrate wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. T. Reetz am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim a. d. R. synthetisiert und für diese Arbeit freundlicherweise

zur Verfügung gestellt. Ziel war die Untersuchung des Einflusses der Deckelinsertionen auf die Substratspezifität des Enzyms hinsichtlich voluminöser Substratseitenketten.

Generell zeigte sich, dass die höchsten Gesamtaktivitäten gegenüber *p*NP-Cyclohexancarboxylat auftraten und dass die Aktivität gegen Null tendierte, sobald einer der beiden Zweige größer als eine Methylgruppe war (Abb. 3.14 – Die Abbildung ist im Anhang 8.1. vergrößert dargestellt). Im Vergleich zur WT-BSLA zeigte die Deckelvariante Axelip eine deutlich veränderte Substratpräferenz gegenüber den untersuchten Substraten. Sie zeigte sogar höhere Aktivitäten gegenüber aromatisch substituierten Propionsäure-Estern (Abb. 3.14 A, C, D) als die WT-BSLA mit Ausnahme des Ibuprofen-Esters (Abb. 3.14 B). Gegenüber *p*NP-Cyclohexancarboxylat war ihre Aktivität dagegen, verglichen mit der der WT-BSLA, um ca. 60 % geringer, bei allerdings insgesamt deutlich höheren absoluten Aktivitäten. Ebenfalls hohe Aktivität zeigt die Cutilip-Doppelmutante F17S/Y148H. Im Gegensatz zur

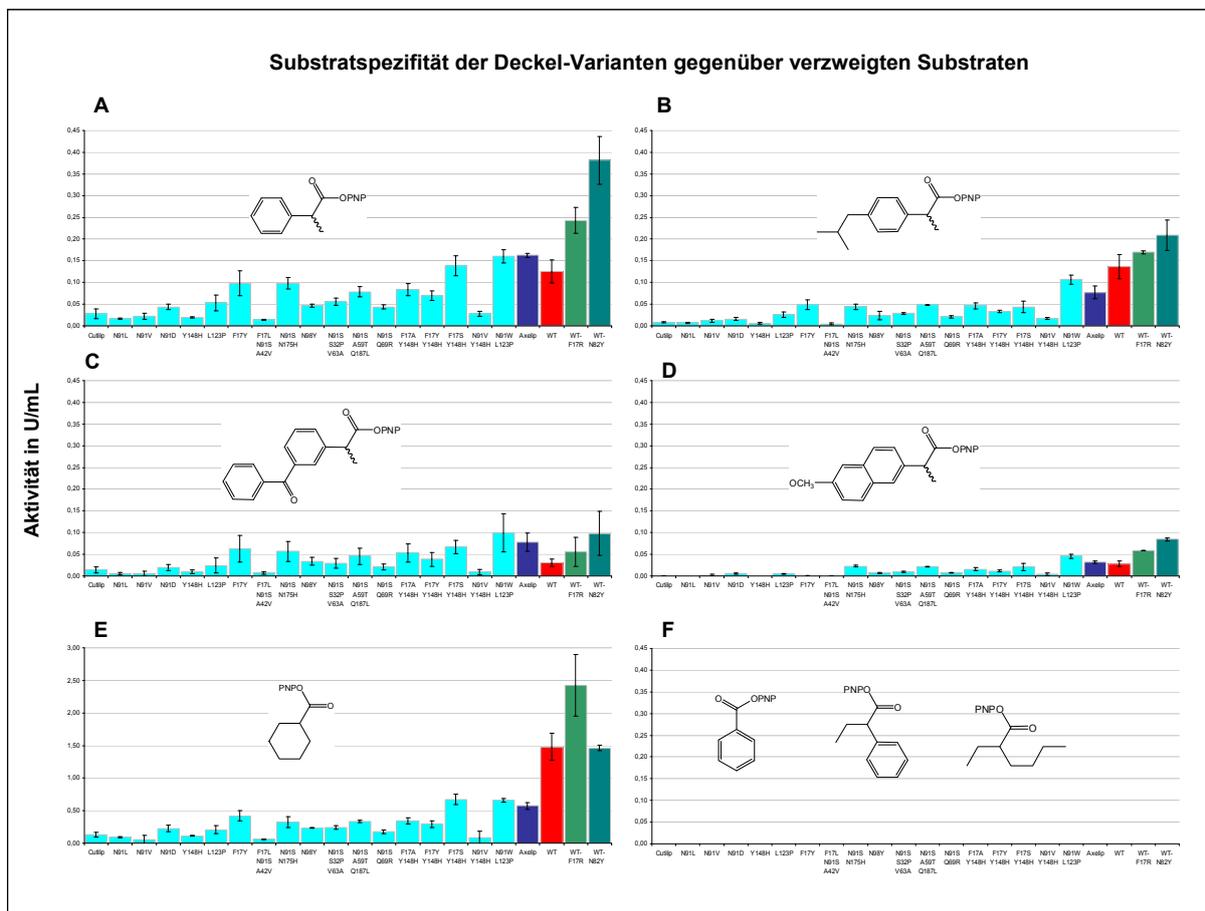


Abb. 3.14: Substratspezifität der Cutilip- und Axelip-Deckelvarianten bezüglich α -substituierter *p*NP-Ester (Die Daten sind im Anhang vergrößert abgebildet). Die Aktivität des Wildtyps ist jeweils in rot dargestellt. Die gezeigten Substrate sind jeweils *p*NP-Ester von (A) 2-Phenylpropanoat, (B) 2-(4-Isobutylphenyl)-Propionsäure [Ibuprofen-Ester], (C) 2-(3-Benzoylphenyl)-Propionsäure [Ketoprofen-Ester], (D) 2-(6-Methoxy-2-naphthyl)-Propionsäure [Naproxen-Ester], (E) Cyclohexancarboxylat, (F) Benzoesäure (links), 2-Phenylbutanoat (Mitte) und 2-Ethylhexanoat (rechts). Gegenüber den letztgenannten Substraten trat nur äußerst geringe Aktivität auf. Der Übersichtlichkeit halber sind einige weitere Varianten mit nur sehr geringer Aktivität in diesen Diagrammen nicht dargestellt.

Axelip-Deckelvariante ist die nicht-evolvierte Cutilip-Deckelvariante nur schwach aktiv gegenüber den verwendeten Substraten. Durch die entstandenen Punktmutationen wurde eine deutliche Steigerung erreicht.

Für die HPlip-Varianten konnte hier keine, oder aber nur äußerst schwache Restaktivität beobachtet werden (ohne Abbildung). Wie auch im Falle der unverzweigten Carbonsäureester (Abb 3.14) wurde hier deutlich, dass die Aminosäuren F17 und N91 eine wesentliche Rolle für die Enzymaktivität spielen, da nahezu alle Varianten mit wesentlich gesteigerter Aktivität eine Substitution an diesen Positionen beinhalteten. Dies gilt jedoch auch für die entsprechenden Positionen der WT-BSLA, deren Punktmutanten F17R und N82Y deutlich höhere Aktivitäten aufwiesen, als der Wildtyp. Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Positionen zeigte sich darin, dass die Mutation N82Y der WT-BSLA eine drastische Erhöhung der Aktivität gegenüber Substraten mit großen aromatischen Seitenketten zur Folge hatte, während die Mutation F17R zwar auch eine Aktivitätssteigerung bewirkte, jedoch in geringerem Maße. Gegenüber Cyclohexancarboxylat wurde dagegen der umgekehrte Fall deutlich: F17R bewirkte deutliche Aktivitätszunahmen, während N82Y nahezu keine Auswirkung hatte. Bei den evolvierten Cutilip-Varianten scheinen weiterhin Mutationen wie Y148H, die sich gegenüber unverzweigten Substraten als vorteilhaft erwiesen hatten, gegenüber dem *p*NP-Cyclohexancarboxylat-Ester eher nachteilig zu sein.

Gegenüber den in Abb. 3.14 F dargestellten Substraten war keines der untersuchten Enzyme nennenswert aktiv. Erst nach mehreren Stunden zeigte sich in den Proben der WT-BSLA, ihrer Punktmutanten und der Axelip-Deckelvariante ein schwacher Umsatz (ohne Abbildung), der auf eine möglicherweise evolvierbare Aktivität hinweist.

3.4.3. Enantioselektivität der Deckelvarianten gegenüber *p*NP-2-Methyldekanolat

Neben gesättigten Fettsäureestern zeigte die WT-BSLA auch Aktivität gegenüber dem verzweigten Substrat *p*NP-2-Methyldekanolat, deren Enantiomere in reiner Form im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. T. Reetz am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim a.d.R. synthetisiert wurden und für diese Arbeit ebenfalls freundlicherweise zu Verfügung gestellt wurden. Die WT-BSLA zeigte gegenüber diesem Substrat Selektivität bezüglich des *R*-Enantiomers mit einem *ee*-Wert von $78,3 \pm 3,0$ % bei einem Umsatz von $38,8 \pm 1,1$ % (Abb. 3.15)

Auch die Deckelvarianten waren enantioselektiv, es zeigte sich hierbei jedoch, dass durch die Insertion der großen Deckelbereiche sowohl im Falle der Cutilip-Deckelvariante als auch bei der Axelip-Deckelvariante die Enantioselektivität auf ca. 50 % *ee* herabgesetzt wurde. Dabei

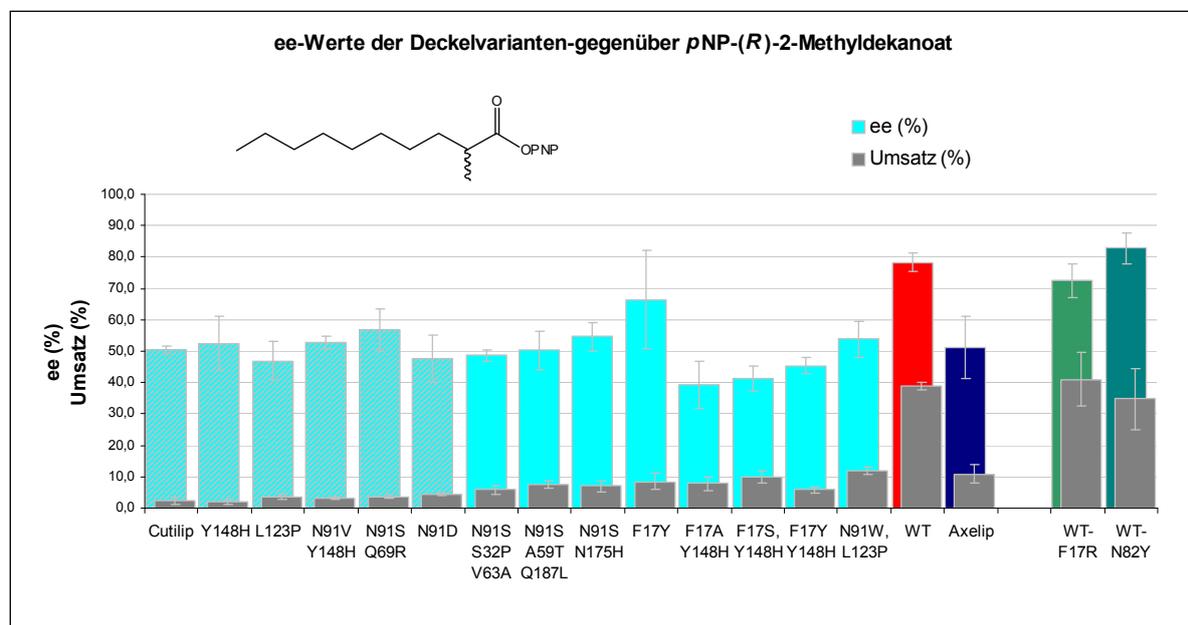


Abb. 3.15: Enantioselektivität der Deckelvarianten gegenüber *p*NP-2-Methyldecanoat. *ee*-Werte sind jeweils farbig dargestellt, Umsätze in grau im Vordergrund. *ee*-Werte bei Umsätzen unter 5 % sind grau schattiert. *R*- und *S*-Substrate lagen separat in einer Enkonzentration von 0,8 mM vor, nach Zugabe der Substratlösung wurde die Absorptionsänderungen bei 410 nm über 5 min im linearen Bereich aufgezeichnet und anschließend die Umsätze und die *ee*-Werte nach CHEN *et al.* (1982) berechnet. Angegeben sind Mittelwerte aus sechs voneinander unabhängigen Messungen. Die WT-BSLA ist rot gekennzeichnet

lagen die Umsätze der Axelip Variante mit $10,9 \pm 3,0$ % deutlich höher als die der Cutilip-Variante, wo bei einem geringem Umsatz von $2,3 \pm 0,9$ % eigentlich nur eine Tendenz aufgezeigt werden kann. Werte mit Umsätzen von unter 5 % sind daher in Abb. 3.15 grau schattiert angegeben. Die übrigen Werte lassen darauf schließen, dass die gerichtete Evolution der Cutilip-Deckelvariante trotz deutlicher Steigerung der Aktivitäten die Enantioselektivität bezüglich *p*NP-2-(*R*)-Methyldecanoat wenig beeinflusst hat. Im Falle der drei an den Positionen F17 und Y148 mutierten Varianten sanken die *ee*-Werte um 5-10 %, im Falle der N91-Mutanten blieben sie im Bereich zwischen $48,7 \pm 1,7$ % (Dreifachmutante N91S/S32P/V63A) und $54,6 \pm 4,7$ % (N91S/N175H). Einzige Ausnahme mit einer deutlichen Steigerung um ca. 16 % im Vergleich zum Ausgangskonstrukt war die Cutilip-Einzelmutante F17Y mit einem *ee*-Wert-Wert von $66,5 \pm 15,6$ %.

Bei der WT-BSLA dagegen wurde die *R*-Selektivität durch die Einzelmutation F17R leicht verringert. Auch ihr Umsatz, der gegenüber den meisten weiteren Substraten im Vergleich zur nicht-mutierten BSLA erhöht war, ist in diesem Fall interessanterweise auf gleichem

Niveau. Die HPlip-Deckelvarianten zeigten gegenüber *pNP*-2-Methyldekanolat nur sehr schwache Aktivität, so dass die Bestimmung von *ee*-Werten nicht erfolgen konnte.

3.4.4. Temperaturstabilität der Deckelvarianten

Im Rahmen einer Diplomarbeit, die im Zuge dieser Dissertation betreut wurde, konnten die Deckelvarianten Cutilip, Axelip und HPlip sowie einige Punktmutanten aus der ersten Generation der epPCR-Mutagenese in größerem Maßstab (5L) in *E. coli* BL21 überexprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die gereinigten Proteine wurden hinsichtlich ihrer Temperaturstabilität untersucht.

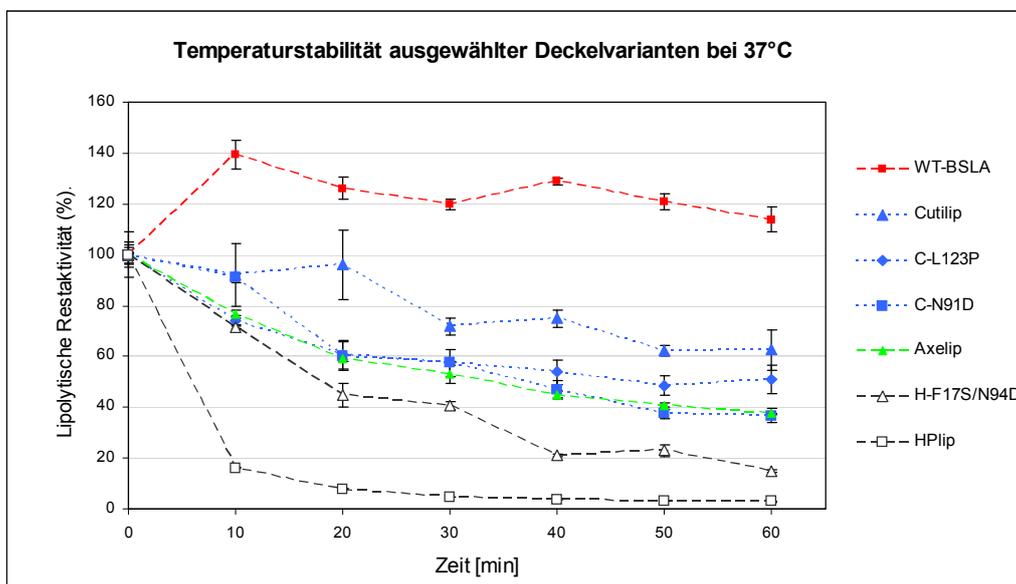


Abb. 3.16: Aktivitätsverlust von BSLA-Deckelvarianten nach Inkubation bei 37 °C. Rot: WT-BSLA; blau: Cutilip-Varianten; grün: Axelip; schwarz: HPlip-Varianten. Die jeweilige lipolytische Restaktivität wurde im Anschluss an die Inkubation unter Standard-Bedingungen bei Raumtemperatur gemessen. Der Temperaturverlauf zeigt, dass die Stabilität umso geringer wird, je größer der inserierte Deckelbereich ist.

Es wurde deutlich, dass die Größe der Deckelinsertion einen starken Einfluss auf die Enzymstabilität hatte. Bereits bei 37 °C zeigten sich nach einstündiger Inkubation deutliche Aktivitätsverluste. Abb. 3.16 zeigt den Verlauf der Restaktivität bei dieser Temperatur über einen Zeitraum von einer Stunde. Cutilip erwies sich dabei am stabilsten – ihre Restaktivität belief sich nach einer Stunde auf ca. 60 %. Ihre beiden Punktmutanten L123P und N91D zeigten jeweils ca. 50 % und 40 % Restaktivität. Axelip, deren Deckelinsertion um zwei Aminosäuren größer ist, als die der Cutilip-Varianten zeigte dagegen nur noch eine geringe Aktivität von 20 % nach einer Stunde. Im Falle der HPlip-Variante mit der deutlich größeren Deckelinsertion von 25 zusätzlichen Aminosäuren im Vergleich zur WT-BSLA verliefen die

Aktivitätsverluste deutlich schneller und lagen bei nur noch 20 % Restaktivität nach bereits 20 Minuten. Die HPlip-Punktmutante F17S/N94D aus der gerichteten Evolution verlor ihre Aktivität dabei allerdings langsamer als die nicht-evolierte HPlip.

Auch bei höheren Temperaturen waren die Deckelvarianten deutlich instabiler als die WT-BSLA (Abb. 3.17). Bei 45 °C waren alle HPlip-Varianten nach einer Stunde inaktiv, Axelip und die Cutilip-Varianten zeigten nur noch schwache Restaktivitäten von 10 bis 20 %, wobei auch hier die nicht mutierte Deckelvariante Cutilip die größte Stabilität aufwies. Alle Enzyme verloren ihre Aktivität vollständig nach einstündiger Inkubation bei 50 °C.

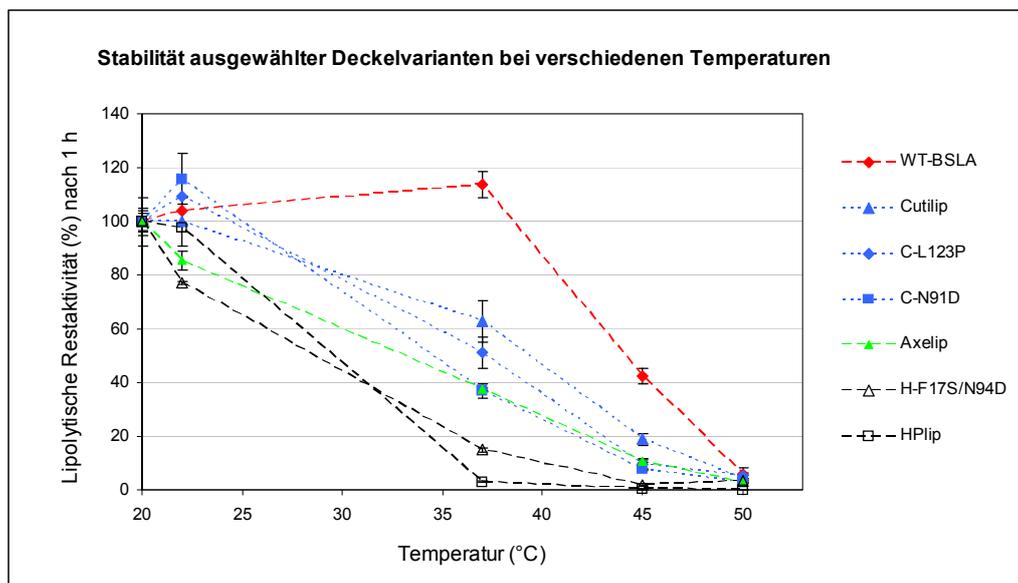


Abb. 3.17: Lipolytische Restaktivität der aufgereinigten BSLA-Deckelvarianten nach einstündiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen. Rot: WT-BSLA; blau: Cutilip-Varianten; grün: Axelip; schwarz: HPlip-Varianten. Die lipolytische Restaktivität wurde im Anschluss an die Inkubation unter Standard-Bedingungen gemessen.

3.5. Deletion der Deckelstruktur der Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa*

In den zuvor beschriebenen Versuchen wurden verschiedene flexible Strukturelemente in die sehr kleine Lipase BSLA inseriert und so ihre Substratspezifität verändert. Parallel dazu wurde in dieser Arbeit ein komplementärer Ansatz verfolgt, in dem aus einer größeren Lipase, der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A (PAL), ein solches Strukturelement entfernt werden sollte. Ziel war es dabei, die Flexibilität der α/β -Hydrolasen hinsichtlich größerer Deletionen zu untersuchen. Als Zielstruktur wurde der Deckelbereich der PAL gewählt. Dieser wird von der Helix $\alpha 5$ und ihren benachbarten *Loop*-Strukturen gebildet (Abb. 3.18). Er galt aus mehreren Gründen als vielversprechende Zielstruktur. (1) Die putativen „Scharniere“ der Deckelregion D116 und S164 liegen in der von NARDINI *et al.* (2000) gelösten Kristallstruktur in der geöffneten Konformation räumlich dicht beieinander. Bei direkter Verbindung dieser beiden Aminosäuren schien es wahrscheinlich, dass die Struktur der PAL weitgehend erhalten bliebe, trotz der großen Deletion des Deckelbereiches. (2) Vergleiche der Strukturen der PAL mit der Lipase B aus *Candida antarctica* (CALB) zeigten, dass beide Enzyme in den Regionen vor und nach der Deckelhelix strukturhomolog sind, die CALB jedoch anstelle der in PAL vorhandenen großen Deckelhelix zwischen den Positionen I121

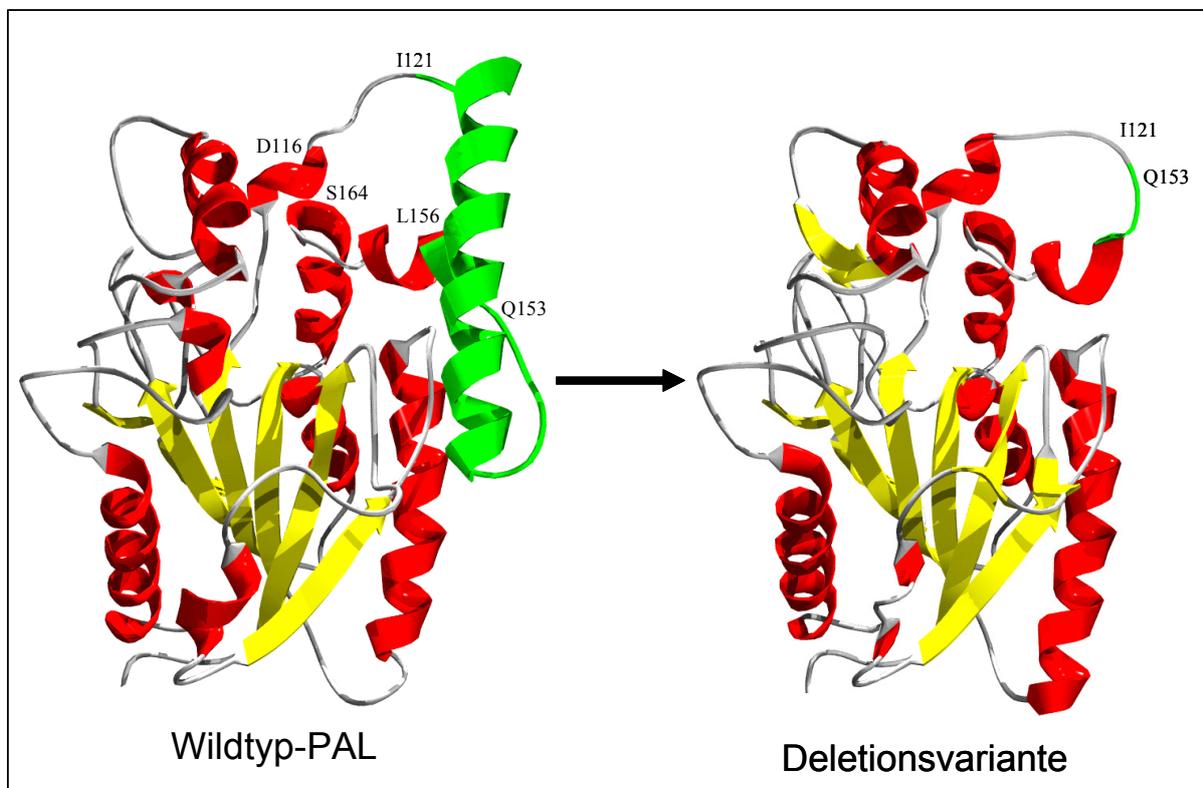


Abb. 3.18: Konstruktion einer deckeldefizienten Variante der *P. aeruginosa* Lipase A, die anhand von Homologievergleichen mit der Lipase LipB aus *Candida antarctica* erzeugt wurde. Die Aminosäurepositionen 122-152 wurden deletiert, AS153-155 dienten als Verbindung zwischen den benachbarten Helices.

und L156 nur eine kurze Verbindung von drei Aminosäuren aufweist (Abb. 3.18). Diese beiden Überlegungen dienten als Grundlage für die experimentelle Deletion der Deckelstruktur der PAL in zwei verschiedenen Ansätzen.

Im ersten Ansatz wurden Varianten der PAL konstruiert, in denen die Positionen 117 bis 163 deletiert waren. Mehrere Varianten wurden erzeugt: In der Variante PALdel117 waren die Aminosäuren D116 und S164 direkt miteinander verbunden. In einer alternativen Strategie wurde die Variante PALGly117 konstruiert, in der der Deckelbereich durch ein singuläres Glycin ersetzt war, um die strukturelle Flexibilität zu erhöhen und damit das Entstehen funktioneller Konformationen zu erleichtern. Weiterhin wurde die Sättigungsbank PALrd117 konstruiert, in der dieses Glycin117 durch sämtliche weiteren proteinogenen Aminosäuren ersetzt war, um das Spektrum der möglichen strukturellen Konformationen auszuschöpfen.

Im zweiten Ansatz, der auf Strukturhomologie zu CalB beruhte, waren die „Scharniere“ I121 und L156 zu weit voneinander entfernt, um eine direkte Verbindung ohne strukturelle Einschränkungen zu ermöglichen. Es wurden daher zur Konstruktion der Varianten PALld1 drei Aminosäuren weniger deletiert und so die PAL-Positionen 153-156 als verbindendes Element der Helices $\alpha 4$ und $\alpha 6$ benutzt, so wie auch in CALB die Verbindung aus drei Aminosäuren besteht. In einer zweiten Strategie wurden diese drei Aminosäurepositionen randomisiert und so die Variantenbank PALrdld erzeugt.

Sämtliche erzeugten Varianten wurden auf lipolytische Aktivität untersucht, sowohl mittels Agarplattentests gegenüber Tributyrin als auch gegenüber *p*NPP im Mikrotiterplattenformat. Im Falle der Bank PALrd117 umfasste das Screening 300 Klone, im Falle der Bank PALrdld 2.000. Es konnte jedoch keinerlei Aktivität detektiert werden. Expressionsuntersuchungen der Einzelvarianten PALdel117, PALGly117 und PALld1 erfolgten per SDS-PAGE. Die Gene der Varianten wurden daraufhin vereinigt und als *Pool* einer ungerichteten Mutagenese mittels epPCR unterzogen. Das anschließende Screening auf Tributyrin-Agarplatten sollte zeigen, ob durch Punktmutationen eine Reaktivierung und eine Wiederherstellung der Expressionsfähigkeit erreicht werden kann. Nach Screening von ca. 30.000 Varianten wurden die Versuche abgebrochen, da keinerlei Aktivität nachgewiesen werden konnte.

3.6. Konstruktion enantioselektiver Punktmutanten der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung enantioselektiver Varianten der Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* (PAL). In vorangegangenen Arbeiten (BOCOLA *et al.*, 2004; LIEBETON *et al.*, 2000; REETZ *et al.*, 1997) konnte die Enantioselektivität des Enzyms durch gerichtete Evolution gegenüber dem chiralen Substrat *para*-Nitrophenyl-(*S*)-2-Methyldekanoat um ein Vielfaches gesteigert werden. Dabei wurde eine Vielzahl von Mutationen akkumuliert, von denen man annahm, dass nicht alle einen Einfluss auf die Selektivität des Enzyms ausübten. Die selektivste der dabei erzeugten Varianten war die Mutante 1H8. Sie wies die sechs Aminosäureaustausche D20N, S53P, S155M, L162G, T180I und T234S auf. Da ihre Kristallstruktur experimentell bislang nicht zugänglich war, wurde von BOCOLA *et al.* (2004) ein Modell erstellt, basierend auf der Kristallstruktur des Wildtypenzym, um die Mechanismen der Enantioselektivität dieser Mutante zu untersuchen. In einer umfangreichen, theoretischen Studie wurden dabei durch molekulare Modellierung (MM) und quantenmechanische Rechnungen (QM) die Übergangszustände des *R*- und *S*-2-Methyldekansäure-*p*NP-Esters bei der Hydrolyse durch die Wildtyp-Lipase und die 1H8-Mutante, sowie acht weiterer Punktmutanten simuliert und miteinander verglichen. Weiterhin wurden molekulardynamische (MD) Simulationen mit den jeweiligen Michaelis-Menten-Komplexen und tetraedrischen Intermediaten über 1 ns durchgeführt. Anhand dieser Rechnungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die erhöhte Enantioselektivität maßgeblich durch die Kombination der beiden Aminosäureaustausche S53P und L162G hervorgerufen wird. Beide zusammen ermöglichen die Bewegung einer weiteren Aminosäure, H83, ins aktive Zentrum, welche dort die Bindung des *R*-Enantiomers sterisch beeinträchtigt. Die drei Mutationen D20N, T180I und T234S dagegen haben keinerlei Auswirkung und die Mutation an Position 155 ist sogar eher kontraproduktiv im Hinblick auf Enantioselektivität. In dieser Arbeit wurden nun insgesamt 25 verschiedene Punktmutanten der PAL zielgerichtet konstruiert, die sowohl sämtliche Einzelmutationen der 1H8-Mutante als auch verschiedene Kombinationen dieser Mutationen enthielten. Weiterhin wurde die Funktion der Aminosäure H83 bei der Katalyse des *p*NP-2-Methyldekanoat durch Austausch gegen Alanin, Phenylalanin und Leucin untersucht. Ziel war es, die Bedeutung der einzelnen Mutationen sowie bestimmter Kombinationen für die Selektivität des Enzyms aufzuklären. Die dabei ermittelten Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

3.6.1. Die Mutationen S53P und L162G wirken kooperativ auf die Enantioselektivität

Eine Untersuchung jeder Mutation der 1H8-Mutante einzeln ergab, dass mit Ausnahme der Mutation L162G, die als Einzige in direkter Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert ist und eine Steigerung des E-Wertes auf 33 bewirkte, keine der Mutationen allein einen Einfluss auf die Selektivität des Enzyms hatte. Die Doppelmutante M8 mit den Aminosäuresubstitutionen S53P/L162G dagegen wies mit einem E-Wert von 63,7 sogar eine höhere Enantioselektivität auf, als die ursprüngliche Mutante 1H8, die einen E-Wert von 50 hinsichtlich des *S*-Enantiomers zeigte. Zusätzliche Austausche an Position 155, die sich in den vorangegangenen Evolutionsexperimenten als *Hotspot* erwiesen hatte (LIEBETON *et al.*, 2000; REETZ *et al.*, 1997), bewirkten dagegen eine Verringerung der E-Werte im Vergleich zur 1H8-Mutante. Für S155M ergab sich ein Wert von 41,7, im Falle von S155F ein Wert von 57,9. Die ermittelten Daten sind in Tab. 3.2 zusammengefasst. Sie bestätigen weitgehend die Schlussfolgerungen aus den theoretischen Berechnungen, denen zufolge der Austausch L162G eine Erweiterung der Bindetasche bewirkt und so die Bindung des chiralen Substrates erleichtert. Weiterhin wurde postuliert, dass in Kombination mit S53P die sterischen Beschränkungen des Histidins an Position 83 aufgehoben werden, das dadurch in Wechselwirkung mit dem Oxyanion des *S*-Enantiomers treten kann.

Tab. 3.2: Enantioselektivität der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung von *para*-Nitrophenyl-*rac*-2-Methyldekansäure-Ester durch verschiedene, von der Mutante 1H8 abgeleitete Einzelmutanten, sowie durch das Wildtypenzym PAL. Varianten von besonderem Interesse (s. Text) sind hellblau unterlegt.

Variante	Mutationen	E-Wert	ee-Wert	Umsatz (%)
WT ³	Wildtyp	1,2	6,8 ± 1,6	43,7 ± 1,5
1H8 ⁴	D20N,S53P,S155M,L162G,T180I,T234S	50,1	95,1 ± 0,8	19,8 ± 2,1
M1	D20N	1,3	11,0 ± 0,9	19,0 ± 0,9
M2	S53P	3,1	48,0 ± 0,8	17,0 ± 1,2
M3	S155M	1,5	19,0 ± 1,2	20,0 ± 1,0
M4	S155F	2,1	33,0 ± 1,1	15,0 ± 1,4
M5	L162G	32,8	89,0 ± 0,8	41,6 ± 1,6
M6	T180I	1,4	15,0 ± 1,0	24,0 ± 0,5
M7	T234S	1,3	11,0 ± 0,3	21,0 ± 0,3
M8	L162G, S53P	63,7	96,2 ± 0,6	17,9 ± 3,7
M9	L162G, S53P, S155M	41,7	91,6 ± 0,8	39,5 ± 3,4
M10	L162G, S53P, S155F	57,9	94,5 ± 0,3	34,4 ± 2,9

³ Reetz *et al.* (1997)

⁴ Bocola *et al.* (2004)

3.6.2. Die Funktion des Histidin an Position 83

Die Aminosäure an Position 83 war bislang bei der Optimierung der Enantioselektivität der PAL weder in Ansätzen mittels gerichteter Evolution noch in Studien zum rationalen Design des Enzyms in Erscheinung getreten. In den QM/MM-Berechnungen und den MD-Simulationen zur Analyse der 1H8-Mutante wurde dem Histidin an dieser Position jedoch eine kritische Rolle bei der Diskriminierung zwischen *R*- und *S*-Enantiomer des Substrates zugeschrieben (Bocola et al., 2004), da durch die Mutationen S53P und L162G seine sterischen Beschränkungen aufgehoben werden. So kann sich seine Seitenkette ins aktive Zentrum bewegen und die Bindung des *S*-Enantiomers sterisch erleichtern und möglicher-

Tab. 3.3: Enantioselektivitäten der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung von *para*-Nitrophenyl-*rac*-2-Methyldekan säure-Ester durch verschiedene H83-Mutanten der PAL sowie einiger ihrer Varianten im Vergleich mit dem Wildtyp der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A sowie der 1H8-Mutante. Varianten von besonderer Bedeutung (s. Text) sind farblich unterlegt.

Variante	Mutationen	E-Wert	ee-Wert	Umsatz (%)
WT	Wild Type	1,2	6,8 ± 1,6	43,7 ± 1,5
1H8	D20N,S53P,S155M,L162G,T180I,T234S	50,1	95,1 ± 0,8	19,8 ± 2,1
M11	H83A	1,4	13,3 ± 0,5	21,8 ± 2,6
M12	H83L	1,8	27,9 ± 0,8	11,3 ± 0,9
M13	H83F	1,1	5,8 ± 2,0	14,0 ± 2,7
M14	L162G, H83A	54,3	92,9 ± 0,6	41,5 ± 2,0
M15	L162G, H83L	41	94,1 ± 1,0	19,6 ± 0,3
M16	L162G, H83F	7,5	73,9 ± 2,2	14,0 ± 3,2
M17	L162G, S53P, H83A	59,8	92,9 ± 0,6	44,1 ± 1,3
M18	L162G, S53P, H83L	47,9	93,6 ± 0,2	33,4 ± 2,1
M19	L162G, S53P, H83F	5,4	62,6 ± 3,2	26,4 ± 5,3
M20	L162G, S53P, S155M, H83A	32,3	90,6 ± 0,6	34,5 ± 1,2
M21	L162G, S53P, S155M, H83L	25,5	89,9 ± 0,1	29,6 ± 3,2
M22	L162G, S53P, S155M, H83F	32,9	90,2 ± 3,5	38,2 ± 3,6
M23	L162G, S53P, S155F, H83A	31,4	92,3 ± 0,4	20,6 ± 1,6
M24	L162G, S53P, S155F, H83L	53,2	94,7 ± 0,5	28,3 ± 2,6
M25	L162G, S53P, S155F, H83F	6,4	69,7 ± 2,5	17,1 ± 4,6

weise eine stabilisierende H-Brücke zu dessen Oxyanion ausbilden. Durch Konstruktion entsprechender Mutanten sollte dieses Modell überprüft werden. Es zeigte sich jedoch entgegen den Erwartungen, dass auch Varianten, in denen das Histidin gegen Alanin oder Leucin ersetzt war, eine hohe Enantioselektivität aufwiesen (Tab. 3.3), sowohl in Kombination mit L162G als auch in Dreifachmutanten zusammen mit S53P und L162G. Dieselben Kombinationen mit Phenylalanin an Position 83 dagegen waren kaum selektiv,

obwohl Phenylalanin sterisch dem Histidin deutlich ähnlicher ist als Alanin oder Leucin. Auch in den Vierfachmutanten M23-25 mit der zusätzlichen Mutation S155F zeigte sich dieses Muster. In den analogen Vierfachmutanten mit S155M dagegen hatte H83F überraschenderweise keine negativen Auswirkungen auf die Enantioselektivität im Vergleich zu H83A und H83L. Mögliche Erklärungen werden anhand des bestehenden Modells in Abschnitt 4.6 diskutiert.

4. DISKUSSION

4.1. Konstruktion und Evolution von Deckelvarianten der Lipasen aus *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas aeruginosa*

Die gerichtete Evolution hat sich seit Beginn der 1990er Jahre als Schlüsseltechnologie zur Neu- und Weiterentwicklung von Enzymen fest etabliert und wird heute sowohl im akademischen Bereich als auch für technische Anwendungen vielseitig eingesetzt (DALBY, 2007; KAUR & SHARMA, 2006). Parallel zu den Fortschritten auf diesem Gebiet entwickelten sich in den letzten Jahren zudem die Verfahren der Strukturanalytik und *in silico*-Modellierung von Proteinen bedeutend weiter, so dass sich heute Methoden des rationalen Designs mit denen gerichteter Evolution zu äußerst erfolgreichen Strategien der Enzymoptimierung ergänzen (CHICA *et al.*, 2005; BORNSCHEUER & POHL, 2001). Vor allem die Verbesserung der Qualität der Variantenbanken durch Beschränkung auf zuvor auf rationalem Wege ermittelte, sensible Teilbereiche der Zielproteine (*focussed libraries*) führte in jüngster Zeit zu bedeutenden Erfolgen (REETZ *et al.*, 2006c). Die Methoden der Mutagenese selbst blieben jedoch weitgehend beschränkt auf sequentielle Methoden wie Kassetten- und Sättigungsmutagenese (1.5.2.), die eine Art Feinabstimmung bereits vorhandener Funktionen bewirken. Dabei wurde die Struktur der Proteine selbst meist nur unwesentlich verändert. Dies ist einerseits der Tatsache zuzurechnen, dass vielfach solche Enzyme optimiert werden, die durch die vorangegangene natürliche Evolution die gewünschten Fähigkeiten bereits weitgehend entwickeln konnten und durch nur relativ geringe strukturelle Veränderungen optimiert werden können (REETZ *et al.*, 2006a; SCHMITT *et al.*, 2002). Andererseits lassen sich große Konformationsänderungen nur in seltenen Fällen vorhersagen und modellieren und sind daher per rationalem Design kaum zugänglich. Bedeutende Fortschritte mit Sekundär- und Tertiärstruktur-orientierten Ansätzen der gerichteten Evolution wurden in den letzten Jahren auf dem Gebiet des *de novo* Design von Proteinen publiziert (KODER & DUTTON, 2006; HECHT *et al.*, 2004; BOLON *et al.*, 2002; TAYLOR *et al.*, 2001; WEST & HECHT, 1995; KAMTEKAR *et al.*, 1993; HECHT *et al.*, 1990).

In dieser Arbeit wurde ein Ansatz verfolgt, der speziell auf die Veränderung der Enzymstruktur bzw. größerer funktioneller Elemente abzielte, um so die Substratbindungseigenschaften zweier Lipasen aus *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas aeruginosa* zu beeinflussen. Ausgangspunkt der Arbeiten war die Überlegung, dass α/β -Hydrolasen eine Art modularen Aufbau zeigen, d.h. dass sie zwar eine gemeinsame Grundstruktur besitzen, die

spezifischen Eigenschaften wie Substratspezifität aber hauptsächlich durch Strukturelemente hervorgerufen werden, welche sich zwischen den einzelnen Vertretern eines Zweiges dieser Enzymfamilie wie z.B. den Lipasen stark unterscheiden können. Hinweise dafür liefern u. a. die Arbeiten von CARRIÈRE und VERGER (HALIMI *et al.*, 2005; CHAHINIAN *et al.*, 2002; CARRIÈRE *et al.*, 1998; CARRIÈRE *et al.*, 1997) sowie QIAN *et al.* (2007), die bereits einzelne Teile zwischen homologen Lipasen übertragen konnten. Diese Enzyme waren einander allerdings eng verwandt (CARRIÈRE *et al.*, 1997). Es besteht die Hypothese, dass sich die α/β -Hydrolasen im Zuge divergenter Evolution durch Akkumulation solcher zusätzlicher Strukturelemente entwickelt haben (HEIKINHEIMO *et al.*, 1999; OLLIS & GOLDMAN, 1992).

Ziel der Arbeiten war es, eine solche Entwicklung *in vitro* nachzuvollziehen, indem Strukturelemente homologer α/β -Hydrolasen auf die *Bacillus subtilis* Lipase A in ihrer Eigenschaft als minimale α/β -Hydrolase übertragen wurden, um so ihre Substratbindungseigenschaften zu beeinflussen. Ferner sollte geprüft werden, ob diese neuen Strukturelemente anschließend durch gerichtete Evolution in einer Art Feinabstimmung an die BSLA angepasst werden können. Die Ergebnisse sollten Möglichkeiten zur Entwicklung neuer α/β -Hydrolasen aufzeigen und für weitergehende Arbeiten auf diesem Gebiet Anhaltspunkte liefern wie z.B. der Konstruktion einer Art ‚Baukastensystem‘ aus α/β -Hydrolase-Strukturelementen.

Parallel sollte untersucht werden, ob der umgekehrte Ansatz ebenfalls durchführbar ist, einer α/β -Hydrolase bereits vorhandene Strukturelemente deletieren zu können. Dazu sollte der putative Deckel (NARDINI *et al.*, 2000) der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A entfernt werden, um einerseits veränderte Substratpräferenzen zu beobachten, andererseits jedoch auch Möglichkeiten zu untersuchen, die Expression und Faltung des Enzyms zu vereinfachen.

4.2. Etablierung und Optimierung des Screeningverfahrens

Das Screeningsystem legt bei einer gerichteten Evolution den entscheidenden Selektionsdruck an und ist daher neben der Mutagenese der kritische Faktor bei einer evolutiven Enzymoptimierung. Der Einsatz moderner Automatisierungstechnologien in Form von Robotern haben den theoretisch möglichen Durchsatz in den letzten Jahren zwar enorm erhöht (REYMOND & BABIAK, 2007), jedoch setzen sie standardisierte Meßgrößen und einen reibungslosen Verlauf der Prozesse voraus. Bei dem äußerst arbeits- und zeitintensiven Umgang mit großen Variantenbanken in lebenden Zellen, der im Falle eines Prozessabbruches mit hohem Zeit- und Materialverlust einhergeht, ist im Vorfeld eine sehr sorgfältige Analyse und Optimierung möglicher Fehlerquellen erforderlich. In dieser Arbeit

traten immer wieder Schwankungen der Zelldichten und der Enzymaktivitäten auf, die die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen beeinträchtigte. Eine der möglichen Fehlerquellen ist das unregelmäßige Volumen des Inokulates beim Animpfen der Kulturen in den verwendeten DW-MTP. Durch Verwendung einheitlicher Stahlspitzen im Pickroboter ‚Qpix‘ konnte dies weitestgehend ausgeglichen werden. Dennoch trat unregelmäßiger Wuchs der *E. coli*-Kulturen in den verwendeten Deepwell-Mikrotiterplatten immer wieder auf (3.2.1). Dass sich das Wuchsverhalten von mikrobiologischen Laborstämmen in Mikrotiterplatten von dem in klassischen mikrobiologischen Gefäßen wie Erlenmeyer- oder Schikanekolben unterscheidet, ist in der Literatur oft beschrieben (KUMAR *et al.*, 2004), die Ursachen dafür sind jedoch bislang nicht vollständig aufgeklärt. Der von HERMANN *et al.* (2003) als Ursache angeführte unregelmäßige Gasaustausch in diesen Gefäßen im Vergleich zu Erlenmeyer- und Schikanekolben ist unter Standard-Laborbedingungen kaum zu beheben (KENSY *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde die Proteinexpression in der stationären Phase praktiziert. Dies birgt das Risiko einer geringeren Proteinexpression, führt aber zu einer stark verbesserten Vergleichbarkeit der einzelnen Proben, was in einem Screening-Prozess der entscheidende Gesichtspunkt ist. Weiterhin konnte durch die Verwendung eines geeigneten Vollmediums das Verhältnis von Zelldichte zu lipolytischer Aktivität optimiert werden. Ein dazu alternatives Verfahren besteht darin, zunächst in kleineren Volumina von ca. 0,2 ml eine Art Vorkultur anzulegen, diese nach Erreichen der stationären Phase auf 1,2 ml aufzufüllen und in der folgenden logarithmischen Wuchsphase die Proteinüberexpression zu induzieren. Zwar wird so eine höhere Proteinexpression erreicht, die langen Wartezeiten und zusätzlichen Zelldichtemessungen sind jedoch bei einem geforderten sehr hohen Durchsatz im täglichen Laborbetrieb nicht praktikabel und wurden daher in dieser Arbeit vermieden.

Durch Definition eines Schwellenwertes für positive Varianten im Screening und seine Einbindung in die jeweilige Photometer-Software konnte ein Auswertungsschema erstellt werden, in welches die Datenmengen schnell und einfach eingelesen und graphisch übersichtlich dargestellt werden konnten. Dies vereinfachte die Auswertung der teils großen Mengen von Meßergebnissen aus dem Hochdurchsatzscreening.

Auch die Probenaufbereitung aus den DW-MTP für den Hochdurchsatz-Lipase-Test konnte im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt werden, indem eine Methode zur Zellyse direkt in Photometer-geeigneten Mikrotiterplatten etabliert wurde. Es konnten so zwei äußerst aufwändige Arbeitsschritte eingespart werden: Bislang wurde die Lyse von *E. coli*-Zellen in denselben DW-Mikrotiterplatten durchgeführt, in denen auch die Anzucht erfolgt war. Um dabei nicht die Plasmid-DNA für eine spätere Isolierung der Gene erfolgreich evolvierter

Proteinvarianten zu verlieren, mussten die Kulturplatten durch Überimpfung in je eine weitere Mikrotiterplatte kopiert werden, die dann bis zur weiteren Verwendung konserviert wurde. Zur Trennung der Zellbestandteile war weiterhin ein Zentrifugationsschritt erforderlich, der aufgrund der begrenzten Zentrifugenkapazität von vier MTP zeitaufwändig war und für Mikrotiterplatten aus Kunststoff obendrein mit einem Bruchrisiko verbunden war. Durch das nun optimierte Lyseverfahren für die kleinvolumigen Proben von ca. 20 µl direkt in den Photometer-geeigneten MTP wurde sowohl dieser Zentrifugationsschritt als auch das Kopieren der Variantenbanken überflüssig. Dies bedeutet neben einer großen Zeitersparnis auch, dass der Verbrauch kostenintensiver Mikrotiterplatten halbiert wird. Weiterhin können die Plasmide positiv evolvierter Varianten auf diese Weise direkt aus den Kulturplatten isoliert werden. Dies minimiert das Risiko, positive Varianten durch Überwachsen von Kreuzkontaminationen zu verlieren, was beim erneuten Überimpfen von DW-MTP-Kulturen in bisher gängigen Verfahren leicht passieren kann.

Auch Pipettierfehler werden in diesem Verfahren minimiert, da sich homogene Zellkulturen sehr viel leichter und genauer pipettieren lassen als Lysate, in denen DNA, aggregiertes Zellmaterial sowie unvollständige Lyse trotz der Zentrifugation störende Inhomogenitäten wie Verklumpungen und Viskositätsunterschiede erzeugen. Diese können beim Pipettieren mit Mehrkanalpipetten oder dem 96fachen TeMo-Modul der Tecan-Workstation zu Verstopfungen einzelner Spitzen führen und so die Ergebnisse stark verfälschen. Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren eliminiert diese Fehlerquellen und ist einfach und effizient.

4.3. Konstruktion von Deckelvarianten der *Bacillus subtilis* Lipase A

4.3.1. Konzeption des Versuchsansatzes – Struktur als Voraussetzung für Funktion

Die *Bacillus subtilis* Lipase A diente als Basis für die Insertion von Deckel- und deckelähnlichen Peptiden (*loops*) anderer α/β -Hydrolasen. Diese wurden aufgrund von *in silico*-Homologievergleichen ausgewählt. Dazu wurden zunächst mit Hilfe der Algorithmen VAST (GIBRAT *et al.*, 1996; MADEJ *et al.*, 1995) und DALI (HOLM & SANDER, 1993) geeignete Strukturhomologe der BSLA in der PROTEIN DATA BANK (BERMAN *et al.*, 2000) ermittelt. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. B. W. Dijkstra an der Universität Groningen wurden durch *in silico* Überlagerung von α/β -Hydrolasen Strukturmerkmale identifiziert, die sich für eine Übertragung eigneten. Auf die Homologie in diesen Bereichen und auch auf eine gewisse „Passform“ wurde dabei großen Wert gelegt, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass die Struktur von Proteinen die wesentliche Voraussetzung für ihre

Funktionalität ist (BESENMATTER *et al.*, 2004; HECHT *et al.*, 2004; WEST *et al.*, 1999). Es wurde daher in diesem Versuchsansatz davon ausgegangen, dass durch die Verwendung solcher Strukturelemente die Wahrscheinlichkeit, funktionelle Varianten zu erhalten, maximiert wird. Eine Alternative hätte darin bestanden, ein randomisiertes Oligopeptid einzufügen und durch Screening funktionelle Varianten zu ermitteln. Je nach Grad der Randomisierung hätte dies jedoch zu einer sehr hohen Anzahl möglicher Varianten mit einem weiten Sequenzraum geführt, der mittels Hochdurchsatzscreening nicht erschließbar gewesen wäre. Stattdessen wurden in dieser Arbeit Insertionen gewählt, deren Struktur sich im Zuge der natürlichen Evolution bereits als funktionell erwiesen hatte und diese auf eine andere Basis übertragen. Auf diese Weise bewegt man sich ausschließlich auf den sogenannten „Funktionsinseln“ des Sequenzraumes (WRIGHT, 1932) oder „Gipfeln der Fitnesslandschaft“ (EIGEN *et al.*, 1989; EIGEN, 1984)(Abb. 4.1).

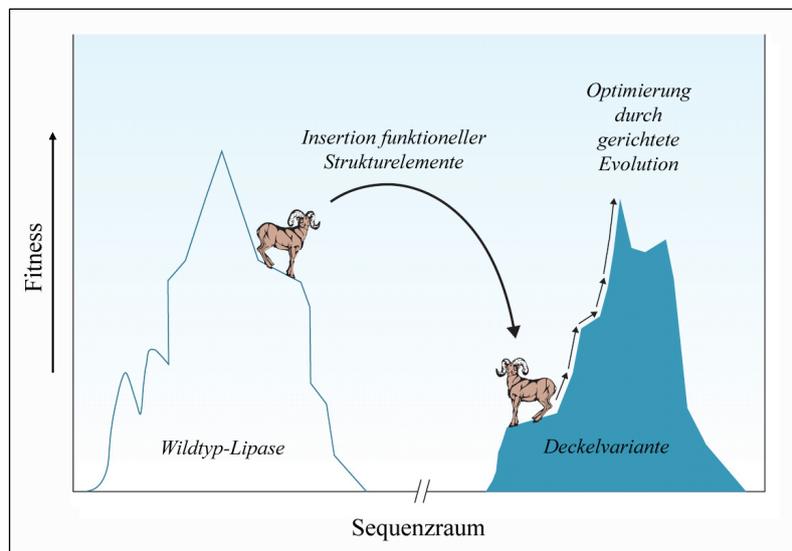


Abb. 4.1 : Illustration des Sequenzraum-Konzeptes nach EIGEN (1986; 1971) Von den möglichen Sequenzen eines Proteins bilden nur äußerst wenige funktionelle Strukturen. Diese können quasi als Inseln in einem metaphorischen Ozean der Möglichkeiten, dem Sequenzraum, betrachtet werden. Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz nutzt ausschließlich Strukturelemente, die sich im Laufe der Evolution bereits als funktionell erwiesen haben und rekombiniert diese auf Homologiebasis, um so die Funktion nach Möglichkeit beizubehalten und wenn möglich, zu übertragen. Im Anschluss an den „großen Sprung“ erfolgt dann eine Optimierung mittels gerichteter Evolution in kleineren Schritten (Abbildung modifiziert nach BOLON *et al.* (2002)).

Im Anschluss kann dann eine Optimierung mit einer vergleichsweise geringen „Schrittweite“ im Sequenzraum erfolgen, um die Fitness weiter zu erhöhen. Dies kann mittels sequentieller Mutageneseverfahren erfolgen, wie z.B. fehlerhafte PCR und Kassetten- oder Sättigungsmutagenese (WONG, T. S. *et al.*, 2006; HIBBERT & DALBY, 2005; ADAMCZAK & KRISHNA, 2004; BORNSCHEUER, 2002a; LIEBETON *et al.*, 2000).

Die Variante Cutilip wurde konstruiert, indem die Positionen 39-51 der BSLA gegen Sequenzabschnitt 73-94 der Cutinase aus *Fusarium solani pisi* ausgetauscht wurden. Damit wurden 13 Aminosäuren aus der BSLA entfernt und 22 Aminosäuren aus der Cutinase eingefügt. Die Sequenz der resultierenden Variante Cutilip ist damit um neun Aminosäuren verlängert. Vorausgesetzt, die Grundstruktur des Enzyms bleibt erhalten, verschiebt sich somit die Bezeichnung der homologen Positionen ab der Insertion im Vergleich zur WT-BSLA, so dass die Aminosäuren des aktiven Zentrums nun S86, D142 und H165 sind. Die Deckelinsertion befindet sich zwischen den Positionen V39 und A60.

	WT-BSLA	Cutilip	Axelip	HPlip
Aminosäurepositionen der jeweiligen Insertion	-	V39 – A60	V39 – G62	P153 – V180
Aminosäuren des aktiven Zentrums	S77, D133, H156	S86, D142, H165	S88, D144, H157	S77, D133, H181

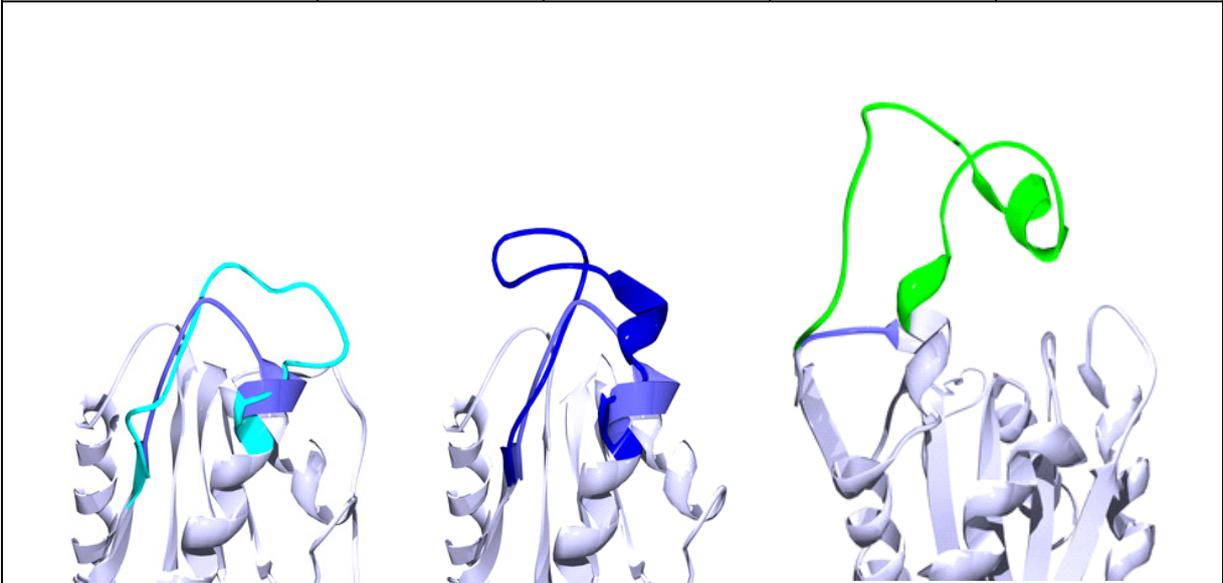


Abb. 4.2: Positionen der Insertionen und der Aminosäuren des aktiven Zentrums in der Proteinsequenz (Tabelle) und in Strukturmodellen der jeweiligen Variante (unten): Cutilip (links, Insertion türkis) Axelip (Mitte, Insertion dunkelblau) und HPlip (rechts, Insertion grün). Das Basisgerüst der BSLA ist in weiß dargestellt, die Bereiche des WT-Enzyms, die durch die Insertion entfallen, sind in hellblau von der übrigen Struktur unterschieden.

Zur Konstruktion der Variante Axelip wurden ebenfalls die Aminosäuren 39-51 der BSLA entfernt und an ihre Stelle der Sequenzabschnitt 41-64 der Acetylxy lanesterase aus *Penicillium purpurogenum* inseriert (Abb. 4.2). Mit dieser Insertion von 24 Aminosäuren verlängert sich die Axelipsequenz damit um elf Positionen. Die Aminosäuren des aktiven

Zentrums sind folglich S88, D144 und H167, die Deckelinsertion wird begrenzt von V39 bis G62.

Im Falle der Variante HPLip befindet sich die Deckelinsertion in der Nähe des C-Terminus des Proteins: Die Aminosäuren 153-155 wurden ausgetauscht gegen den Sequenzabschnitt 235-262 der humanen Pankreaslipase. Die Sequenz der HPLip-Variante ist also im Vergleich zur WT-BSLA um 25 Aminosäuren erweitert. Die Nummerierung verschiebt sich im Vergleich zur BSLA für die letzte Helix des Enzyms und für das Histidin des aktiven Zentrums, nicht jedoch für das aktive Serin und das aktive Aspartat. Das aktive Zentrum der Variante HPLip ist daher S77, D133 und H181. Die Deckelinsertion liegt zwischen P153 und V180 und somit direkt vor dem aktiven Histidin. Eine Besonderheit dieser Insertion ist eine Disulfidbrücke, die sich zwischen den Cysteinen 155 und 179 befindet. Diese hält in der humanen Pankreaslipase, dem Ursprungsenzym des Peptids, die „Scharniere“ (WINKLER, F. K. *et al.*, 1990) des Deckels zusammen. Bei der Konstruktion der Variante HPLip wurde explizit darauf geachtet, diese Cysteine beizubehalten. Die Bezeichnungen und Charakteristika der Varianten sind in Abb. 4.2 zusammenfassend dargestellt.

4.3.2. Alle drei konstruierten Deckelvarianten zeigten Aktivität gegenüber *para*-Nitrophenylpalmitat

Alle drei konstruierten Varianten zeigten Aktivität gegenüber dem Standardsubstrat pNPP, was darauf schließen lässt, dass sich die katalytischen Aminosäuren in ihrer relativen Position zueinander durch die Insertion der Deckelbereiche zwar vermutlich verschoben haben, aber noch in einer katalytisch aktiven Konformation vorlagen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Insertionen tatsächlich als verlängerte Peptidschleifen an der BSLA vorlagen und mit der Konformation des aktiven Zentrums auch die Gesamtstruktur der *Bacillus subtilis*-Lipase in ihren Grundzügen erhalten blieb. Beachtlich ist dies insbesondere im Falle der Variante HPLip, denn die Insertion entspricht mit 25 zusätzlichen Aminosäuren und nahezu 3 kDa immerhin ca. 14 % der BSLA-Masse. Hier befindet sich eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C155 und C179 (Abb. 4.3). Sie scheint das Deckelpeptid an seiner Basis zusammenzuhalten, ähnlich wie es in seinem Ursprungsenzym, der humanen Pankreas Lipase, der Fall ist. Die Disposition des aktiven H181 könnte dennoch groß genug sein um die vorhandene deutliche Abschwächung der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp zu verursachen. Eine andere mögliche Ursache für die starke Verringerung der Aktivität wäre eine ungünstige Faltung des Deckelpeptides ins aktive Zentrum hinein. Bei der gegebenen Gesamtgröße des

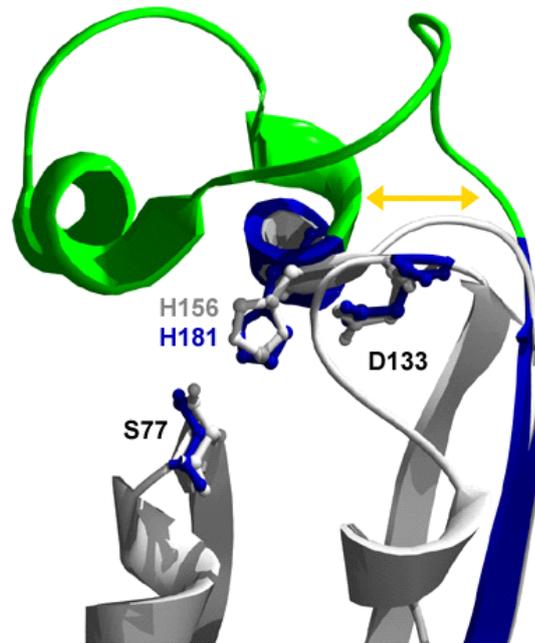


Abb. 4.3: Überlagerung der aktiven Zentren der Wildtyp-BSLA (grün) und der Deckelvariante HPlip (blau/grün). Der gelbe Pfeil symbolisiert die Disulfidbrücke zwischen C155 und C179, die eine Art „Scharnier“ der Deckelinsertion bilden.

Peptides wäre es möglich, dass es das aktive Zentrum teilweise verdeckt und - je nach Mobilität der Aminosäurekette - blockiert. Um die Struktur und Faltung dieser großen Insertion erschöpfend aufzuklären, wäre eine Kristallstruktur des Enzyms erforderlich. Dies war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich. Daher wurden die hier beschriebenen Schlussfolgerungen anhand der bestehenden Kristallstruktur der Wildtyp-BSLA (VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001), einer weiteren Struktur der BSLA mit gebundenem Inhibitor (DRÖGE *et al.*, 2006) sowie anhand von Modellen der Deckelvarianten abgeleitet. Letztere wurden mit dem Programm MOLOC unter Verwendung des integrierten MAB-Kraftfeldes (GERBER & MÜLLER, 1995) erstellt.

4.3.3. Die BSLA-Deckelvariante Axelip zeigt ein deutlich verändertes Substratspektrum

Die BSLA-Deckelvariante Axelip zeigte in vielfacher Hinsicht hochinteressante Eigenschaften. Ihre spezifische Aktivität gegenüber dem Standardsubstrat *p*NPP war zwar geringer als die der Wildtyp-Lipase, jedoch deutlich höher als die der Varianten Cutilip und HPlip. Aus diesem Grund war von einer gerichteten Evolution im Falle dieser Deckelvariante zunächst abgesehen worden. Ein durch die Deckelinsertion verursachter teilweiser Aktivitätsverlust war von vornherein nicht überraschend - Ziel war vielmehr zu zeigen, dass

(1) nach der Insertion eines homologen, aber enzym-fremden Strukturelementes grundsätzlich Aktivität erhalten bleibt und sich weiterhin (2) die Substratspezifität der resultierenden Varianten im Vergleich zum Wildtypenzym deutlich verändert. Im Falle der Deckelvariante Axelip wurden diese beiden Ziele deutlich erreicht. Während die Cutilip und HPlip den größten Teil ihrer Aktivität verloren hatten, schien im Falle der Variante Axelip die Destabilisierung der Gesamtstruktur des Enzyms gering zu sein. Im Hinblick auf die Substratspezifität zeigte die Axelip-Variante dagegen ein deutlich verändertes Verhalten im Vergleich zur Wildtyp-BSLA.

Im Falle der meisten getesteten aromatischen α -substituierten Carbonsäure-*p*NP-Ester lag ihre Aktivität deutlich höher als die der Wildtyp-Lipase. Im Falle des Ketoprofen-Derivates 2-(3-Benzoylphenyl-)Propionsäure-*p*NP betrug der Aktivitätsunterschied sogar über 150 %. Geringere Aktivität als der Wildtyp zeigte Axelip dagegen gegenüber dem Ibuprofen-Derivat 2-(4-isobuty-phenyl)-Propionsäure-*p*NP mit einer Aktivität von nur 50% verglichen mit der der Wildtyp-BSLA, sowie gegenüber den getesteten nicht-aromatischen Carbonsäureestern.

Auffällig ist, dass die Deckelvariante Axelip bei all solchen Substraten eine höhere Aktivität aufwies, in deren Carbonsäureanteil auf die 2-Methylgruppe eine planare und aromatische Seitenkette folgt. Sowohl 2-Phenylpropanoat, als auch das Ketoprofen-Derivat und der Naproxen-*p*NP-Ester besitzen eine solche planare Konformation, wohingegen im Ibuprofen-*p*NP-Ester eine große und bewegliche Isobutyl-Gruppe vorliegt. Die Planarität des Substrates scheint in diesem Zusammenhang von Bedeutung zu sein.

Genauere strukturelle Ursachen für diese Beobachtungen lassen sich im Detail erst aufklären, wenn eine Kristallstruktur der Variante vorliegt, deren Aufklärung im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war. Denkbar ist jedoch, dass die Insertion des Deckelpeptides den Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms zu einem relativ schmalen Spalt verengt, den das Substrat auf dem Weg dorthin passieren muss. Substrate mit starren, unbeweglichen Seitenketten und damit einer geringeren Anzahl möglicher Konformere hätten dabei einen Vorteil im Vergleich zu solchen, die große und bewegliche aliphatische Seitenketten besitzen wie der verwendete Ibuprofen-*p*NP-Ester, dessen Isobutylgruppe durch seine Verzweigung sehr viel Raum in Anspruch nimmt. Substrate mit linearen Seitenketten hätten ebenfalls einen Vorteil gegenüber verzweigten Seitenketten. Auch dies spiegelt sich in den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen wider.

Abschließend kann also für die Axelip-Deckelvariante festgestellt werden, dass die beobachtete Substratpräferenz mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem inserierten Deckelpeptid zusammenhängt, da ansonsten keine weiteren Mutationen in der Variante

vorhanden sind, wie die Sequenzierung eindeutig belegte. Das Enzym bildet einen hochinteressanten Ausgangspunkt für mechanistische Untersuchungen, Analysen der räumlichen Anordnung des inserierten Peptides und weitere Optimierungen des Umsatzes von Substraten mit verzweigten und voluminösen Seitenketten.

4.4. Gerichtete Evolution der Deckelvarianten Cutilip und HPlip zur Adaption der Deckelinsertion

4.4.1. Die Wahl der Mutagenese-Strategie

Eine wichtige Frage bei der Feinjustierung der Deckelstrukturen am BSLA-Grundgerüst war einerseits, welche Mutagenese-Methode die geeignetste ist, vor allem aber, auf welchen Bereich der Proteine sie angewandt werden sollte. Eine Möglichkeit bestand darin, ausschließlich das inserierte Deckelpeptid einer Mutagenese zu unterziehen, um es so an seine „neue“ Basis anzupassen. Eine Anpassung von Deckelpeptid an das Proteingrundgerüst konnte jedoch unter Umständen auf beiden Seiten erfolgen: Das Deckelpeptid kann sich durch vorteilhafte Mutationen an die „fremde“ Basis anpassen, ebensogut kann sich aber auch das Proteingrundgerüst durch entsprechende Mutationen an die „fremde“ Peptidschleife anpassen. Beim Versuch, allein die Deckelpeptide zu mutagenisieren, bestanden jedoch experimentelle Schwierigkeiten, da die Deckelpeptide teils kürzer als 100 bp waren. Dies führte einerseits zu sehr geringer Zahl von Basenfehlpaarungen im PCR-Produkt bei häufig auftretender Wildtypsequenz (Daten nicht gezeigt), andererseits zu geringen Produktausbeuten der epPCR und diverser Aufreinigungsschritte. Weiterhin existierten keinerlei Restriktionsschnittstellen, so dass die mutierten Deckelpeptide nicht kloniert werden konnten, sondern mittels Megaprimer-PCR in die BSLA integriert und anschließend als Gesamtkonstrukte kloniert werden mussten, was wiederum hohe Ausbeuteverluste und sehr geringe Bankengrößen zur Folge hatte. Umfassenderer und erfolgversprechender war daher der Ansatz, die Mutagenese über das gesamte Enzym auszuführen und so vorteilhafte Veränderungen beider Teilbereiche mit einzubeziehen. Hier zeigte sich die epPCR mit geringer Fehlerrate von 2-4 Basenfehlpaarungen pro kb nach JAEGER *et al.* (2001) mit anschließender Sättigungsmutagenese der *Hotspots* als sehr erfolgreich. Die tatsächlich erreichte Mutationsrate lag mit rechnerisch 3,8 bp/kb genau im erwarteten Bereich nach JAEGER *et al.* (2001). Versuche mit höherer Fehlerrate von 5-7 Basenfehlpaarungen pro kb wurden ebenfalls durchgeführt, hatten jedoch den Verlust der Aktivität bei über 90 % der erzeugten Mutanten zur Folge, ohne dass eine verbesserte Variante gefunden wurde – ein Ergebnis, dass höchstwahrscheinlich auf die

besondere Eigenschaft der BSLA als minimale α/β -Hydrolase zurückzuführen ist, in deren minimaler Faltung zu viele Mutationen gleichzeitig leicht destabilisierend wirken können (FUNKE *et al.*, 2003; EGGERT, 2001). Besonders auffällig war in diesem Zusammenhang, dass nahezu alle Mutationen in *loops* oder Helices lokalisiert waren, dagegen aber nur eine einzige am Rande des zentralen Faltblattes. Diese Mutation K35R lag an der ersten Position des Stranges $\beta 4^*$ an der Proteinoberfläche der Cutilip-Variante. Ihre Seitenkette ist ins Lösungsmittel ausgerichtet und der Austausch Lysin zu Arginin hat aufgrund der ähnlichen Polarität beider Seitenketten vermutlich keine oder nur sehr geringe Auswirkung auf die Struktur des Enzyms. Ein Vergleich mit anderen Arbeiten zur gerichteten Evolution der BSLA (REETZ *et al.*, 2006b; FUNKE *et al.*, 2003; RAJAKUMARA *et al.*, 2003; EGGERT, 2001) ergab, dass auch dort nur sehr selten Mutationen in β -Strängen und allenfalls am Rande des zentralen β -Faltblattes an der Proteinoberfläche auftraten. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass insbesondere das β -Faltblatt äußerst kritisch für die Strukturstabilität des Enzyms ist und bereits geringe Störungen eine Inaktivierung zur Folge haben können.

Dies kann als Hinweis für zukünftige Arbeiten mit der BSLA und ihrer Varianten dienen: Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich die Qualität der Variantenbanken stark erhöht, wenn die Mutagenese auf die *loop*-Bereiche beschränkt wird, beispielsweise durch Kassettenmutagenese oder die Verwendung synthetischer Oligonukleotide mit definierter Fehlerrate (*spiked oligos*). Durch Ausschluss des zentralen β -Faltblattes könnte weiterhin mit höherer Fehlerrate gearbeitet werden. Der Umfang der Variantenbanken wäre damit stark verringert und die Anzahl inaktiver Varianten reduziert.

4.4.2. Interpretation der Mutationen aus der gerichteten Evolution der Deckelvarianten

In jedem Protein-Optimierungsansatz durch gerichtete Evolution liefert der an die Mutagenese angeschlossene Selektionsdruck die Entscheidungskriterien für die Auswahl der verbesserten Varianten. ARNOLD prägte für diesen Sachverhalt 1996 die bekannte Faustregel: „*You get what you screen for*“ (YOU & ARNOLD, 1996). In dieser Arbeit sollten durch gerichtete Evolution der Deckelvarianten einzelne Mutationen erzeugt werden, die die jeweiligen Deckelinsertionen an ihre strukturelle Basis - die *Bacillus subtilis* Lipase A - adaptieren. Als Maß für den Grad der Adaption wurde dabei die Wiederherstellung der Aktivität gegenüber dem Substrat *para*-Nitrophenylpalmitat gewählt, die zuvor durch die

* Die Bezeichnung folgt der kanonischen Faltung wie bei VAN POUDEROYEN *et al.* (2001).

Insertion des „fremden“ Peptides verringert worden war. Im Laufe der Untersuchungen konnten tatsächlich viele Varianten erhöhter Aktivität identifiziert werden. Bei der Bewertung dieser Mutationen und ihrer Auswirkungen muss jedoch sorgfältig abgewogen werden, ob es sich dabei um solche handelt, die (1) tatsächlich zur Anpassung der ‚fremden‘ Deckelstruktur an das Proteingrundgerüst beitragen oder um solche, die (2) zwar positive Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms haben, jedoch nicht in Zusammenhang mit dem inserierten Deckelpeptid stehen. Solche Mutationen können anderweitig positive Auswirkungen haben, wie z.B. die Verbesserung der physikalischen Eigenschaften des Enzyms. Steigerungen der Stabilität oder der Löslichkeit unter den im Screening verwendeten Bedingungen werden stets co-evolviert und können auch für den Wildtyp entsprechende Auswirkungen haben. Solche Effekte sind im Prinzip nicht unerwünscht, da höhere Aktivitätswerte der Deckelvarianten in der Laborpraxis die Messungen erheblich erleichtern, indem sie die Messbereiche einander angleichen und so die Vergleichbarkeit zwischen weniger aktiven Varianten und sehr aktivem Wildtyp erhöhen. Die Schwierigkeit besteht allerdings darin, solche Mutationen von denen zu unterscheiden, die tatsächlich Einfluss auf Struktur und Funktion des Deckelpeptides ausüben. In dieser Arbeit wurden daher die Mutationen mit den deutlichsten Effekten in den jeweiligen Deckelvarianten auch im Wildtyp-Enzym erzeugt, um so entsprechende Vergleiche anstellen zu können. Im Folgenden werden die Ergebnisse der gerichteten Evolution der BSLA-Varianten im Hinblick auf diese Kriterien diskutiert.

4.4.3. Die Mutationen A42V und A59T liegen innerhalb des Deckelbereiches der Cutilip-Variante

Im Falle der Deckelvariante Cutilip konnten insgesamt 19 Mutationen an 12 verschiedenen Positionen identifiziert werden, die sich positiv auf die Aktivität des Enzyms gegenüber *p*NPP auswirkten. Die Abb. 4.4 und gibt einen Überblick über die Lage dieser Positionen in dem *in silico* erstellten Modell des Enzyms. Die Mutationen A42V und A59T liegen innerhalb des inserierten Deckelbereiches und traten in der 2. Generation der gerichteten Evolution in den Dreifachmutanten F17L/A42V/N91S und A59T/N91S/Q187L auf. Ein positiver Einfluss auf die Enzymaktivität ist sehr wahrscheinlich - zwar traten beide in Kombination mit *Hotspot*-Mutationen auf, im Falle der Mutation A42V kann jedoch angeführt werden, dass während des gesamten Evolutionsprozesses die beiden *Hotspot*-Mutationen dieser Dreifachmutante nie zusammen und ausschließlich in einer Doppelmutante in Erscheinung getreten waren.

Aminosäuren sich höchstwahrscheinlich innerhalb ähnlicher Sekundärstruktur befinden. In den Arbeiten von EGGERT (2001) und FUNKE (2004) wurde die Enantioselektivität der BSLA gegenüber dem *pseudo-meso* Substrat *cis*-1,4-Diacetoxycyclopenten durch die Mutation N50S von 38 % auf 56 % *ee* bezüglich des 1*R*-4*S*-Enantiomers gesteigert. Ein Einfluss dieser Position auf die Substratbindung und auf die Konformation des aktiven Zentrums wurde daher bereits nachgewiesen und hier bestätigt. Allerdings trägt A59T in dieser Arbeit nur zur Steigerung des Substratumsatzes bei, nicht jedoch zur Steigerung der Enantioselektivität gegenüber *p*NP-2-Methyldecanoat. Da die Seitenkette der Aminosäure N50 der BSLA-Kristallstruktur nach zu urteilen vollständig oberflächenlokalisiert ist, konnte der Einfluss dieser Aminosäure bereits bei EGGERT nicht interpretiert werden. Die Parallele zu dieser Arbeit kann hier jedoch als Hinweis dafür gelten, dass A59T auch in der Cutilip-Variante höchstwahrscheinlich Einfluss auf das aktive Zentrum ausübt und es der neuen Umgebung entsprechend reorientiert, was sich in diesem Falle nicht in veränderter Enantioselektivität, sondern in der Erhöhung der Aktivität widerspiegelt.

4.4.4. Die Aminosäure V63 ist eine mögliche Kontaktstelle zwischen Deckel und Proteinbasis

Wie die zuvor beschriebenen Mutationen könnte auch V63A die Konformation der Cutilip-Deckelinsertion positiv beeinflusst haben. Sie liegt in derselben Helix α B, in der auch A59T

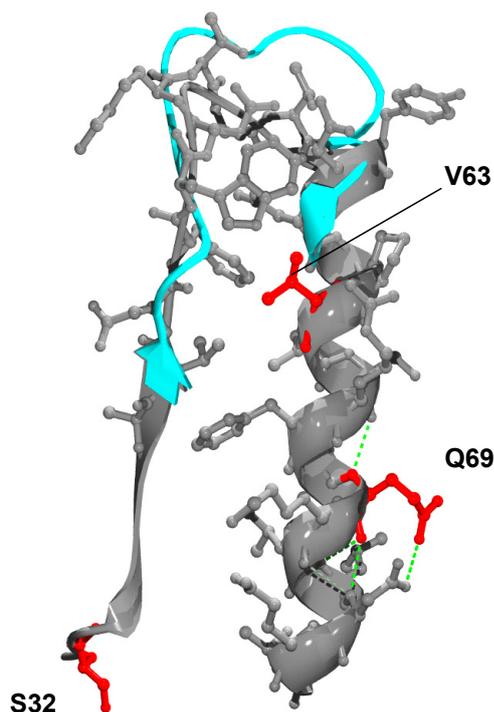


Abb.4.5: Die Lage der Positionen S32, V63 und Q69 (rot) im Wildtypenzym BSLA (grau). In hellblau ist der Cutilip-Deckelbereich überlagert dargestellt. Die Bezeichnungen der Aminosäuren erfolgte wie in der Cutilip-Deckelvariante – die Nummerierung ist im Vergleich zur WT-BSLA um neun Stellen verschoben. Q69 entspricht Q60 in der WT-BSLA, V63 entspricht V54 und S32 entspricht S23.

lokalisiert ist und trat zusammen mit S32P und N91S während der ungerichteten Mutagenese in einer Dreifachmutante auf. Bei der Einschätzung ihrer Auswirkungen kann die Kristallstruktur der Wildtyp-BSLA einige Anhaltspunkte liefern: V63 entspricht V54 in der Wildtyp-Lipase und ihre Seitenkette weist in Richtung der Peptidschleife, die in der Cutilip-Variante durch die Deckelinsertion ersetzt wurde (Abb. 4.5). In der Wildtyp-Struktur (in Abb. 4.5 in grau dargestellt) hat V54 Kontakt zu den Aminosäureseitenketten auf der anderen Seite der Peptidschleife. Es ist daher höchstwahrscheinlich, dass in der Cutilip-Variante ebenfalls Wechselwirkungen zwischen V63 und den Aminosäuren der Deckelinsertion auftreten. V63 wäre dann ein Verbindungspunkt zwischen Proteingrundgerüst und Deckelinsertion und könnte daher durch die Mutation zum kleineren Alanin diesen Kontakt für den *p*NPP-Umsatz positiv beeinflussen.

4.4.5. Im Deckelbereich der HPlip-Variante führen vier Mutationen zur Adaption an das Proteingrundgerüst

Anders als in der Cutilip-Variante waren die Mutationen in der HPlip-Variante fokussiert auf den Deckel selbst und auf benachbarte Bereiche. Die Mutationen K156E, N157D, I162V, V163A sowie V163E befinden sich direkt innerhalb des Deckelbereiches. K156E und N157D traten bereits in der ersten Generation als Einzelmutationen auf, während sich die Mutationen an den Positionen 162 und 163 in der zweiten Generation in Mehrfachmutanten fanden. Interessanterweise fanden sich an Position 163 gleich zwei verschiedene Mutationen, was darauf hinweist, dass es sich hierbei um eine Position mit einer bedeutenden Funktion handelt. Von einem *Hotspot* zu sprechen, wäre bei nur zweimaliger Mutation dieser Aminosäure vielleicht noch zu früh, dennoch könnte diese Aminosäure hochinteressant sein und ihre Funktion sollte in jedem Falle weiter untersucht werden. Ihr positiver Einfluss zeigt sich durch eine Verdopplung der Aktivität der Dreifachmutante F17S/N94D/V163A auf rund 12 % der Wildtypaktivität im Vergleich zur Doppelmutante F17S/N94D mit nur rund 6 % Wildtypaktivität, in der dieser Austausch fehlt. Der genaue Einfluss der Mutationen auf Struktur und Funktion des Deckels lässt sich wie schon im Falle der Cutilip-Variante nicht erschöpfend klären, solange keine reale Kristallstruktur oder sogar eine NMR-Struktur vorhanden ist. Es ist jedoch signifikant, dass gleich vier von neun Mutationen nach nur zwei Generationen epPCR innerhalb des Deckelbereiches der HPlip-Variante lokalisiert sind und dies in einem sehr begrenzten Bereich zwischen den Positionen 156 und 163. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich um einen sensiblen Abschnitt der Deckelinsertion handelt, auf den

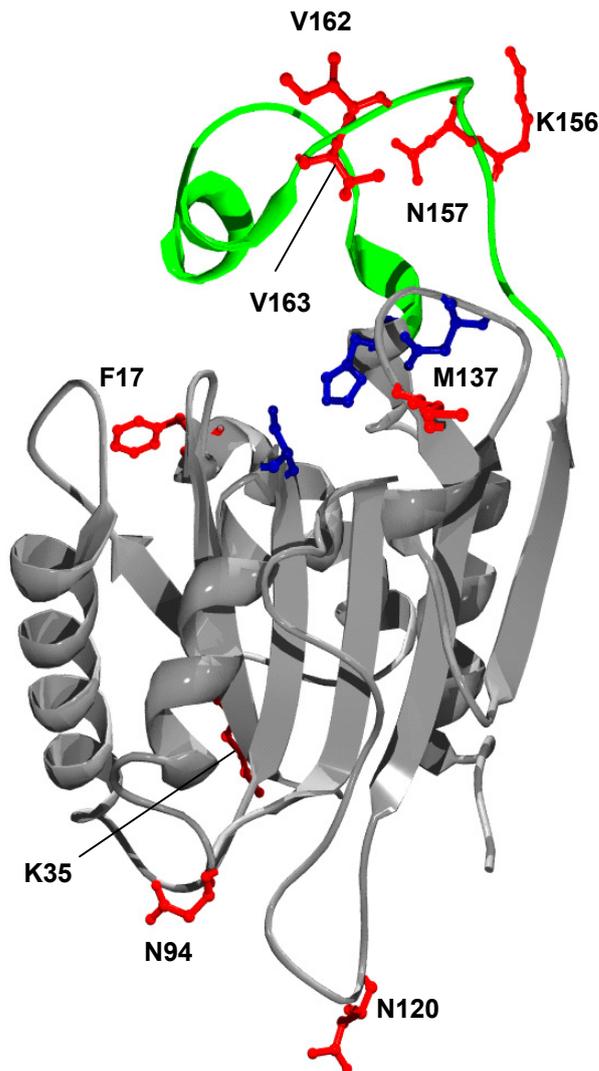


Abb. 4.6: Die Lage der Mutationen im Modell der Deckelvariante HPlip. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums (blau) sowie die Positionen der durch die gerichtete Evolution ermittelten Mutationen (rot) sind dargestellt. Vier von neun Punktmutationen traten innerhalb der Deckelinsertion (grün) auf. K35 liegt als einzige aller in dieser Arbeit identifizierten Mutation im Bereich eines β -Stranges.

weitere Mutagenesen gezielt fokussiert werden könnten. Beispielsweise wäre hier eine iterative Sättigungsmutagenese (ISM) (REETZ & CARBALLEIRA, 2007) erfolgversprechend. In den beiden Varianten Cutilip und HPlip sind sicherlich auch weitere Generationen epPCR über die gesamte Länge der Primärstruktur ein erfolgversprechender Weg um weitere sensible Sequenzabschnitte und Aminosäuren zu identifizieren.

4.4.6. Die Position 17 ist ein Hotspot in allen untersuchten Varianten

Unabhängig voneinander traten im Screening von Mutantenbanken beider Deckelvarianten Cutilip und HPlip mehrfach Mutationen an der Position F17 in Erscheinung. Im Falle von HPlip hatten Mutationen an dieser Stelle den größten Einfluss auf die Enzymaktivität und auch in der Cutilip-Variante bewirkten hier einige Aminosäureaustausche deutliche Aktivitätssteigerungen. Die Aminosäure F17 liegt innerhalb eines *loops* in direkter

Nachbarschaft zum aktiven Zentrum, in dem auch die Aminosäure I12 liegt, welche zusammen mit M78 die Oxyanionentasche bildet. Dieser *loop* wurde aufgrund seiner Nähe zur Substratbindetasche in vorangegangenen Studien als kritisch für die Enantioselektivität des Enzyms gegenüber verschiedenen Substraten bezeichnet (VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001). FUNKE konnte hier 2004 die Position 18 der BSLA als *Hotspot* bezüglich der Enantioselektivität gegenüber dem Modellsubstrat *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten identifizieren. DRÖGE *et al.* (2006) randomisierten in diesem *loop* die Aminosäuren 16-20 im Zuge einer gerichteten Evolution und wiesen ebenfalls der Position 18 großen Einfluss auf die Enantioselektivität des Enzyms gegenüber verschiedenen Fettsäureestern des 1,2-O-isopropyliden-sn-glycerols nach. Interessanterweise traten in der letztgenannten Studie auch die Mutationen F17L und F71Y mit positivem Einfluss auf die Enantioselektivität in Erscheinung, allerdings in erheblich geringerem Maß als die Position 18.

Diese Parallelbeispiele aus der Literatur, sowie die Tatsache, dass die Mutationen an Position 17 in dieser Arbeit in beiden Deckelvarianten unabhängig voneinander als *Hotspot* auftraten, legte den Schluss nahe, dass diese Aminosäure weniger zur Anpassung der Deckelinsertion an das Basisprotein beitrug, sondern vielmehr einen davon unabhängigen Einfluss auf die Enzymaktivität ausübte. Die Sättigungsmutagenesen der Position im Wildtyp-Enzym bestätigten diese Vermutung, da die Mutation F17R eine Verdopplung der Aktivität gegenüber *p*NPB zur Folge hatte. Auch gegenüber sämtlichen weiteren getesteten Substraten zeigte diese Mutante deutlich höhere Aktivität als die WT-BSLA.

Die Stabilitätsuntersuchungen mit der aufgereinigten HPlip-Variante F17S/N94D zeigten weiterhin eine deutliche Erhöhung der Temperaturstabilität gegenüber der nicht-mutierten HPlip-Varianten. Weiterhin ist die Seitenkette des Phenylalanins F17 in der Kristallstruktur des Wildtyps mit gebundenem Inhibitor (PDB-ID: 1R5O) ins Lösungsmittel ausgerichtet und hat selbst keinen Kontakt zu dem gebundenen Substratanalogon. Der Austausch des unpolaren Phenylalanins gegen das geladene Arginin könnte somit zusätzlich eine erhöhte Löslichkeit und damit eine gesteigerte Mobilität des Enzyms in wässriger Umgebung bewirken. Dies würde zumindest im Falle der F17R-Mutante der BSLA die im Vergleich zum Wildtyp konstant erhöhten Umsatzraten erklären. Dagegen spricht jedoch, dass die Austausche in den F17-Mutanten der untersuchten Deckelvarianten keine erkennbare Präferenz bezüglich Polarität oder Größe aufweisen, denn es treten A, L, S und Y, also sowohl große als auch kleine und sowohl hydrophobe als auch polare Substituenten an die Stelle des Phenylalanins. Am wahrscheinlichsten ist daher nicht ein alleiniger Einfluss auf die Löslichkeit des Enzyms, sondern eher ein Stabilitätsgewinn. Dieser führt zu einer höheren

Konzentration aktiven Enzyms in den Proben unter Screening-Bedingungen und diese treten so als positive Proben in Erscheinung. Der Stabilitätsgewinn der F17-Mutanten der HPlip-Variante steht daher in Zusammenhang mit dem Auftreten dieser Position als *Hotspot*.

4.4.7. Die Position 91 der Cutilip-Variante ist auch in der Wildtyp-BSLA aktivitätsbestimmend

Die Position 91, die in der Wildtyp-BSLA und der HPlip-Variante der Position 82 entspricht (Abb. 4.7), erwies sich als besonders kritisch für die Aktivität der Cutilip-Variante gegenüber *p*NPP. Die drei Mutanten mit der höchsten Aktivität enthielten hier Aminosäuresubstitutionen durch L, V und W (vgl. 3.3.1). Auch gegenüber den meisten weiteren Substraten bewirkten diese Mutationen deutliche Aktivitätszunahmen.

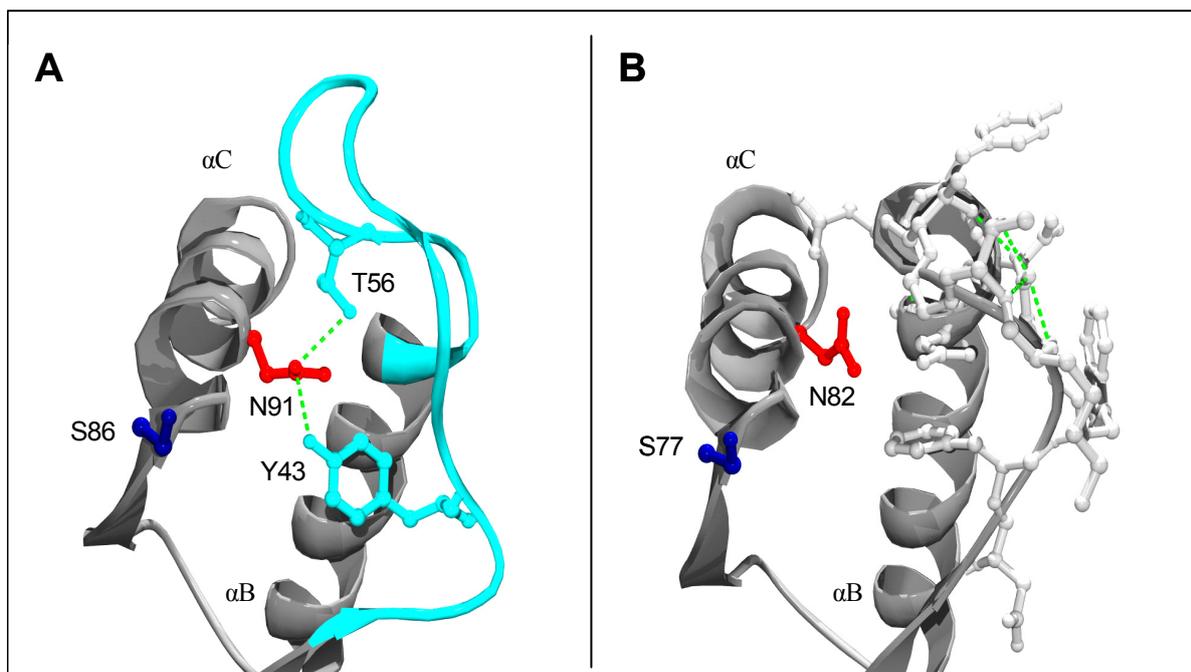


Abb. 4.7: Modell des Bereiches der Deckelinsertion der Variante Cutilip (A) und der homologe Bereich in der Wildtyp-BSLA (B). Dargestellt sind die beiden Helices α B und α C und der dazwischenliegende *loop*, der in der Deckelvariante Cutilip durch den homologen Sequenzabschnitt der Cutinase ausgetauscht wurde. Das Asparagin 91 in (A) bzw. Asparagin 82 in (B) ist in rot dargestellt. Mutationen an dieser Position könnten die in der Cutilip-Variante möglicherweise bestehenden Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Y43 und T56 des Deckelbereiches (hellblau) stören. Im Wildtyp-Enzym BSLA finden sich im Modell an dieser Stelle keine Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren des homologen *loops*. Zur Orientierung ist das aktive Serin 77 (S86 in Cutilip) am nukleophilen Ellenbogen in dunkelblau dargestellt.

Sättigungsmutagenese der homologen Position 82 in der HPlip-Deckelvariante dagegen erbrachte keine weitere Steigerung der Aktivität. Zur näheren Untersuchung dieses Hotspots wurden auch weitere Sättigungsbanken der HPlip-Punktmutante F17Y und der

Doppelmutante F17S/N94D angelegt und durchmustert, um mögliche kombinatorische Effekte zu überprüfen, jedoch ebenfalls ohne eine weitere Steigerung der Aktivität entdecken zu können. In der WT-BSLA allerdings konnte in einer Sättigungsbank der Austausch N82Y gefunden werden, der die Aktivität um 25 % erhöhte (3.3.3). Auch gegenüber allen weiteren getesteten Substraten zeigte sich diese Mutante des Wildtypenzym äußerst aktiv. Da das Ziel der gerichteten Evolution der Deckelvarianten darin bestand, durch Punktmutationen eine Anpassung der Deckelinsertion an das Grundgerüst der BSLA zu erreichen, sprach dieser aktivitätssteigernde Effekt der N82Y-Mutation im Wildtyp zunächst gegen einen Zusammenhang von Deckelinsertion und Mutation N91, ähnlich wie im Falle der Position 17. Vergleicht man jedoch die Kristallstruktur der Wildtyp-BSLA nach VAN POUDEROYEN *et al.* (2001) mit dem Modell der Deckelvariante Cutilip, so fällt auf, dass hier durchaus zwei unterschiedliche Effekte vorliegen könnten: Die Aminosäure N82 bzw. N91 liegt im Inneren des Enzyms in der Helix αC , die dem nukleophilen Ellenbogen nachfolgt (Abb. 4.7). Ihre Seitenkette weist in Richtung des ausgetauschten *loops*. In der Kristallstruktur des Wildtyps bildet das N82 keinerlei erkennbare Wasserstoffbrücken. Eine Modellierung der Deckelvariante Cutilip mit dem Programm MOLOC (GERBER MOLECULAR DESIGN) unter Verwendung des integrierten Kraftfeldes MAB (GERBER & MÜLLER, 1995), mit dem auch Teile der weiter unten beschriebenen Varianten der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase erfolgreich modelliert wurden, ergab jedoch die in Abb. 4.7 dargestellte Konformation. Die Aminosäuren Y43 und T56 der Deckelinsertion (hellblau) stellen hier gleich zwei Möglichkeiten zur Bildung von Wasserstoffbrücken mit dem Arginin an Position 91 der Cutilip-Variante bereit, d.h. es ist relativ wahrscheinlich, dass der Deckelbereich des Enzyms Kontakt zur Aminosäure an Position 91 hat. Mutationen an dieser Position könnten diese Kontakte optimieren, die in der Wildtyp-lipase nicht gegeben sind. Vielmehr besteht im Wildtyp ein Netz aus Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäuren des *loops*, der in den Deckelvarianten durch den Austausch entfiel. Hier ist ein Kontakt von N91 mit der Helix αB wahrscheinlicher. Erst die Auflösung der Kristallstruktur kann über die tatsächlichen Verhältnisse Aufschluss geben – sicherlich liefert das Modell aber bis dahin einen Hinweis als Diskussionsgrundlage: Die Mutationen N91X liegen in Reichweite des Deckelpeptides, so dass Kontakte zwischen beiden realistisch sind. In der Cutlip-Variante könnten daher andere Effekte als in der WT-BSLA für die Zunahme der Aktivität verantwortlich sein. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Sättigungsmutagenesen der BSLA und der Cutilip-Variante an der jeweiligen Position unterschiedliche Mutationen hervorbrachten, nämlich N82Y in der Wildtyp-BSLA, im Falle der Cutilip-Variante aber D, S,

V, W, und L aber niemals Y. Eine denkbare Auswirkung wäre, dass die Deckelinsertion bzw. die kürzere Peptidschleife in der WT-BSLA durch die Mutation dispositioniert wird und sich die Cavität des aktiven Zentrums damit vergrößert, was die Bindung und den Umsatz größerer Substrate erleichtert. Dies würde die gesteigerte Aktivität gegenüber den Substraten mit großem Carboxylsäureanteil erklären, die bei den entsprechenden Varianten beobachtet wurde (Abb. 3.15).

4.4.8. Die Mutationen M137L und Y148H liegen in der Nähe des aktiven Aspartates

Für eine besonders große Aktivitätssteigerung der HPlip-Variante sorgte die Mutation M137L. Sie bildet zusammen mit F17Y die aktivste der erzeugten HPlip-Varianten und hat den wohl größten Einfluss auf die Aktivität von allen Mutationen dieses Enzyms. Während F17Y allein die Aktivität der HPlip-Deckelvariante um 20 % steigert, rief die zusätzliche Mutation M137L eine 16-fache Steigerung hervor (Abb. 3.9). Sie liegt nicht innerhalb des Deckelbereiches, sondern in einer benachbarten Schleife, in welcher auch das Aspartat D133 des aktiven Zentrums lokalisiert ist. Da M137 und D133 nur drei Aminosäuren voneinander entfernt sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie sich gegenseitig beeinflussen. Der Austausch des polaren Methionins gegen das sterisch ausladende, apolare Leucin könnte die Konformation dieses *loops*, zumindest aber die Ausrichtung der Seitenketten in der direkten Nachbarschaft beeinflussen und damit auch die Orientierung des aktiven Aspartates 133, was sich in der großen Steigerung der Aktivität durch diesen Aminosäureaustausch widerspiegelt.

Eventuell wird damit die durch die Insertion des großen Deckelbereiches hervorgerufene Disposition des aktiven Histidins kompensiert. Dies wäre in der Tat eine direkte Anpassung der Proteinbasis an das neue Strukturelement der Deckelinsertion – die Aktivitätsdaten sprechen dafür.

Des Weiteren liegt in der Cutlip-Variante eine Mutation an Position 148 vor, die in derselben Schleife nur zwei Aminosäuren entfernt liegt. Sie führte ebenfalls zu einer Erhöhung der Aktivität der Variante und darüberhinaus auch der Enantioselektivität des Enzyms: Y148H verringert die *R*-Selektivität der Doppelmutante F17Y/Y148H um 15 % *ee* im Vergleich zur korrespondierenden Einzelmutante F17Y. Auch dies spricht für einen Einfluss auf die Konformation des aktiven Zentrums. Auf die dargestellten Aktivitäten hatte Y148H für sich allein nur eine geringe Auswirkung, in Kombination mit N91V jedoch führte auch sie zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität gegenüber *p*NPP - von 17 % der Wildtypaktivität der Einzelmutante N91V auf 45 % der Wildtypaktivität im Falle der Doppelmutante

N91V/Y148H. Eine Konstruktion der entsprechenden Einzelmutanten der Wildtyp-BSLA sowie reale Strukturdaten können über die Funktionen dieser Mutationen weiteren Aufschluss geben.

4.4.9. Q69, L123 und N175 sind aus vorangegangenen Arbeiten bekannte Positionen

Im Falle der Mutation Q69R existiert eine Analogie zu Varianten der Wildtyp-BSLA, die von EGGERT (2001) und FUNKE (2004) zur Steigerung der Enantioselektivität des Enzyms konstruiert wurden. Die Aminosäure Q69 der Cutilip-Variante (Abb. 4.5) ist identisch mit Q60 in der WT-BSLA. Sie bildet in der Kristallstruktur des Wildtyps vier Wasserstoffbrücken mit den benachbarten Aminosäuren S56, L63 und D64 aus, davon eine zwischen den Seitenketten Q60 und D64, die anderen im α -Rückgrat. Der Austausch Q69R könnte dieses Geflecht aus Wasserstoffbrücken beeinträchtigen. EGGERT fand 2001 an dieser Position exakt dieselbe Mutation R, sowie zwei weitere, N und L, die sich jeweils auf den Umsatz des Substrates *pseudo-meso-cis*-1,4-Diacetoxycyclopenten auswirkten und die Enantioselektivität des Enzyms jeweils auf 54 %, 64 % und 65 % *ee* bezüglich des 1*R*/4*S*-Enantiomers erhöhten. Auch in dieser Arbeit wirkt sich Q69R auf die Enantioselektivität des Enzyms aus, allerdings im Hinblick auf ein anderes Substrat – den *p*NP-Ester des 2-Methyldekanoates und in weniger ausgeprägter Form. In jedem Fall kann damit aber ein Einfluss der Mutation auf die Feinstruktur der BSLA als belegt betrachtet werden. Ob diese Mutation in den hier vorliegenden Varianten in direktem oder indirektem Zusammenhang mit der Deckelinsertion steht, könnte durch einen Vergleich mit den jeweiligen Einzelmutanten der WT-BSLA durch Aktivitätsmessung mit *p*NPP und *p*NP-2-Methyldekanoat überprüft werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Vergleiche dieser Art nur für die *Hotspot*-Positionen 17 und 91 durchgeführt werden.

Auch zu den Mutationen L123P und N175H (Abb. 4.4) sind in der Literatur Parallelen beschrieben. RAJAKUMARA *et al.* fanden 2003 die Dreifachmutante L114P/A132D/N166Y der BSLA, die die Temperaturstabilität des Enzyms um das 300fache erhöht. Die Positionen 114 und 166 dieser Dreifachvariante entsprechen exakt den Positionen 123 und 175 der Cutilip-Deckelvariante. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit auch dieselbe Mutation Lysin zu Prolin an Position 123 beschrieben. N175, die bei RAJAKUMARA *et al.* N166 entspricht, lag in der Cutilip-Variante als N175D vor, in der entsprechenden BSLA-Mutante N166Y. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen im Gegensatz zur Arbeit von RAJAKUMARA *et al.* jedoch eindeutig eine verminderte Temperaturstabilität der L123P-Mutante im Vergleich zur

nicht-mutierten Cutilip-Variante (Abb. 3.16), jedoch eine erhöhte Aktivität gegenüber *p*NPP. Demnach gelten hier im Hinblick auf Temperaturstabilität für die Deckelvarianten andere Regeln als für die WT-BSLA wie von RAJAKUMARA *et al.* beschrieben, was dem Einfluss der Deckelinsertionen zuzuschreiben ist.

4.4.10. Biochemische Charakterisierung der Deckelvarianten

Im Anschluss an die gerichtete Evolution zur Erhöhung der Aktivität der Deckelvarianten wurden zur weiteren Charakterisierung die Aktivitäten der Enzyme gegenüber einer Reihe weiterer Substrate gemessen (3.4) und mit denen der Wildtyp-BSLA verglichen. Während die Cutilip-Variante gegenüber allen getesteten Substraten deutliche Aktivität zeigte, erwies sich HPlip zwar aktiv gegenüber den linearen Fettsäureestern, zeigte jedoch kaum messbare Aktivität gegenüber Substraten mit Verzweigungen im Fettsäureanteil. Enantioselektivitäten gegenüber *p*NP-*R/S*-2-Methyldecanoat konnten daher für die HPlip-Varianten nicht bestimmt werden.

4.4.11. Die HPlip-Deckelvarianten zeigen eine Präferenz von Fettsäure-Estern mittlerer Länge

Zunächst wurde ein Aktivitätsspektrum der einzelnen Varianten gegenüber Fettsäureestern unterschiedlicher Kettenlänge erstellt. Bei insgesamt konstant geringerer Aktivität zeigten die Cutilip-Varianten dabei im Prinzip die gleichen Präferenzen wie der Wildtyp bezüglich der Länge der Fettsäuren. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass das zusätzlich am aktiven Zentrum vorhandene Deckelpeptid keinen Einfluss auf die Bindung dieser Substrate ausübt, sondern nur auf die Stabilität des Enzyms. Eine Ausnahme bildete die Doppelmutante N91W/L123P, die anders als die WT-BSLA und die anderen Cutilip-Mutanten, mittellange Ester mit acht und zehn Kohlenstoffatomen im Fettsäurerest schneller umsetzt als *p*NP-Butyrat. Dieser Effekt ist jedoch eher den nachträglich eingeführten Punktmutationen N91W und L123P zuzuschreiben als der Deckelinsertion, da dieses Muster ausschließlich bei dieser Doppelmutante zu finden ist.

Die HPlip-Varianten zeigten gegenüber diesen Substraten ein verändertes Präferenzmuster. Hier war deutlich zu erkennen, dass die Aktivität sämtlicher getesteter Varianten zunächst mit zunehmender Kettenlänge abnahm, jedoch bei Estern mit 12 und 14 Kohlenstoffatomen in der Fettsäure wieder anstieg, um dann bei längererkettigen Estern wieder abzufallen. Dieser Effekt war bei sämtlichen Varianten deutlich erkennbar und steht in Gegensatz zur WT-BSLA, deren

Aktivität unter den gegebenen Bedingungen mit steigender Substratkettenlänge zunächst stark abnahm und ab C12 dann bis zum C18-Fettsäureester nur leicht sank. Da die veränderten Präferenzen bei sämtlichen getesteten HPLip-Varianten auftraten, liegt somit ein Zusammenhang zwischen Substratspezifität und Deckelinsertion auf der Hand.

Einzelne Punktmutationen hatten auch hier deutliche Auswirkungen auf die Substratspezifität. So zeigten Varianten mit der speziellen Mutation F17S deutlich höhere Aktivität gegenüber *para*-Nitrophenylbutyrat als alle anderen getesteten Varianten. Für andere F17-Mutationen war dies nicht der Fall. Auf einen Zusammenhang mit der Deckelinsertion kann dabei zunächst nicht geschlossen werden, da keine F17S-Mutante der WT-BSLA erzeugt wurde, mit der ein Vergleich erfolgen könnte. In der F17S-Mutante der Cutilip-Variante war ein solches Verhalten nicht zu beobachten. Es könnte argumentiert werden, dass es von der Beschaffenheit dieser Peptidschleife abhängt, zu welcher Aminosäure sich eine Mutation am vorteilhaftesten auswirkt. Auch die Tatsache, dass in den Sättigungsbanken der Wildtyp-BSLA an den *Hotspot*-Positionen 17 und 82 andere Mutationen gefunden wurden als in den Sättigungsbanken der Deckelvarianten, lässt diesen Schluss zu.

Um diese Frage abschließend zu klären, sind jedoch weitere umfangreiche Untersuchungen und Vergleiche per gerichteter Mutagenese der Wildtyp-Lipase und ihrer Varianten erforderlich. Auch ein CD-Spektrum könnte im Falle der HPLip-Variante weiteren Aufschluss geben. Einstweilen konnte hier belegt werden, dass der zusätzliche Deckelbereich in der HPLip-Variante eine deutliche Veränderung des Substratspektrums im Hinblick auf gesättigte Fettsäureester im Vergleich zur Wildtyp-Lipase bewirkte (Abb. 3.11).

4.4.12. Cutilip-Punktmutanten zeigen gesteigerte Aktivität gegenüber Substraten mit Verzweigungen in α -Position

Für die weitere Charakterisierung der Lipase-Varianten wurden vom Arbeitskreis von Prof. Dr. M. T. Reetz am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung freundlicherweise eine Reihe weiterer Substrate zur Verfügung gestellt, die größtenteils nicht kommerziell erhältlich sind. Es handelte dabei um *p*NP-Derivate von handelsüblichen Pharmazeutika aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (Schmerzmittel) wie Ibuprofen, Ketoprofen oder Naproxen sowie einige weitere *p*NP-Ester mit Verzweigungen in α -Position.

Die absoluten Aktivitäten der nicht-mutierten Cutilip-Deckelvarianten waren auch diesen Substraten gegenüber zunächst deutlich geringer als die des Wildtyps. Durch die eingefügten Punktmutationen konnte die Aktivität gegenüber einigen Substraten jedoch teils über das

Niveau der Wildtyp-Lipase gesteigert werden. Dies belegt, dass die Methodik, homologe Strukturelemente durch gerichtete Evolution an das „fremde“ Proteingrundgerüst anzupassen, grundsätzlich funktioniert. Die Kombination der Mutationen N91W und L123P sowie F17S und Y148H scheinen unter diesen Bedingungen besonders vorteilhaft zu sein. Allem Anschein nach haben die *Hotspot*-Positionen 17 und 91 daran den größeren Anteil. Ähnlich wie gegenüber dem Standardsubstrat *p*NPP wirken sich die homologen Mutationen in der Wildtyp-BSLA auch bei diesen Substraten in gleicher Form aus: Gegenüber dem Substrat 2-Phenylpropanoat beispielsweise liegen die Aktivitäten der entsprechenden Mutanten mehr als doppelt so hoch wie die der WT-BSLA. Die Positionen haben daher, wie schon in Kapitel 4.4.6. und 4.4.7. angedeutet, vermutlich weniger Einfluss auf die Konformation des aktiven Zentrums als auf die Stabilität oder Löslichkeit des Enzyms.

Die HPLip-Deckelvarianten waren gegenüber diesen verzweigten Substraten inaktiv oder zeigten nur äußerst schwache, von der Autohydrolyse kaum unterscheidbare Aktivitäten. Diese Substrate können daher als für die HPLip-Variante unzugänglich angesehen werden.

Der Einfluss der einzelnen Punktmutationen der Deckelvarianten ist je nach Substrat durchaus unterschiedlich ausgeprägt und jede für sich gesehen könnte daher für weitere Arbeiten zur gerichteten Evolution der Wildtyp-Lipase von Bedeutung sein. Weitere Generationen Mutagenese und Sättigung unter Fokussierung auf sensible *loop*-Bereiche nahe des aktiven Zentrums, sowie Ausschluss des zentralen β -Faltblattes von der Mutagenese, könnte die Suche nach struktur-beeinflussende Mutationen hier enorm vereinfachen.

4.4.13. Die Deckelinsertionen verringern die Enantioselektivität der Lipase

Die Deckelvarianten Cutilip und Axelip zeigten wie die WT-BASLA Aktivität gegenüber dem *p*NP-Ester der 2-Methyldekansäure sowie Enantioselektivität bezüglich des *R*-Enantiomers. Diese war bei den Deckelvarianten mit ca. 50 % *ee* jedoch 30 % geringer als bei der WT-BSLA. Die Verringerung der Enantioselektivität zeigt eindeutig, dass der Austausch einer Peptidschleife der minimalen α/β -Hydrolasefaltung nicht nur unter Beibehaltung der Aktivität möglich ist, sondern dass damit auch tatsächlich die Geometrie des aktiven Zentrums und damit auch die Enantioselektivität unmittelbar beeinflusst werden kann. Ziel dieser Arbeit war dabei nicht ausdrücklich eine Steigerung der Enantioselektivität der BSLA, sondern die strukturelle Flexibilität der α/β -Hydrolasefaltung zu demonstrieren und damit eine Methode zur Beeinflussung dieser Enzymeigenschaften zu etablieren. Im Falle der Variante Axelip war dies äußerst erfolgreich. Zur Erhöhung und Feinabstimmung so sensibler

Eigenschaften wie der Enantioselektivität, bei der eine Positionsänderung bereits einzelner Aminosäureseitenketten um nur wenige Ångström fundamentalen Einfluss auf die räumliche Orientierung des Substrates haben kann, sind tatsächlich sequentielle Methoden der gerichteten Evolution erfolgversprechender, wie ebenfalls am Beispiel der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A demonstriert werden konnte (LIEBETON *et al.*, 2000; REETZ *et al.*, 1997). Es konnte hier jedoch gezeigt werden, dass sich durch größere Insertionen strukturhomologer Peptide größere strukturelle Veränderungen hervorrufen lassen, die das Substratspektrum einer α/β -Hydrolase verschieben. Dies zielgerichtet ausführen zu können, d.h. durch geschickte Wahl des richtigen Strukturelementes die Spezifität eines Enzyms in Richtung eines gewünschten Substrates zu verschieben und eine Art Baukastensystem zu etablieren, ist eine Herausforderung für deren Annahme weitere Erfahrungen mit diesem Ansatz gesammelt werden müssen. Dass dieser Ansatz Erfolg haben kann, konnte in dieser Arbeit demonstriert werden.

4.4.14. Die Deckelinsertionen verringern die Temperaturstabilität der Varianten

Ein Vergleich der Temperaturstabilitäten einiger der konstruierten Deckelvarianten in aufgereinigter Form mit der Wildtyp-Lipase legt nahe, dass das Enzym durch Insertion der vergleichsweise großen zusätzlichen Deckelpeptide stark destabilisiert wurde (vgl. 3.4.4.). Die Destabilisierung war offensichtlich ausgeprägter, je größer die jeweilige Insertion war. Dies wurde insbesondere durch die rasche Inaktivierung der HPlip-Deckelvariante deutlich, die bereits nach 10 min bei 37 °C über 80 % ihrer Aktivität verloren hatte. Es ist vor allem deshalb ein besonders interessanter Aspekt, weil die Anzucht des Expressionsstammes *E. coli*-BL21(DE3) standardmäßig bei dieser Temperatur erfolgte. Es stellt sich daher nun die Frage, ob die beobachteten geringen Aktivitäten etwa auf eine Blockierung des aktiven Zentrums des Enzyms durch die Deckelinsertion zurückzuführen ist, die durch einige der übrigen Ergebnisse nahegelegt wird, oder aber durch den raschen Aktivitätsverlust im Vorfeld der durchgeführten Messungen. Auch die Aufreinigung der Lipase-Varianten durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie hatte sich als äußerst schwierig erwiesen und in den meisten Fällen war kaum Aktivität in den Eluaten der Chromatographiesäulen gemessen worden (Ergebnisse nicht dargestellt). Auch dies kann mit der raschen Inaktivierung der Enzymvariante zusammenhängen. In diesem Fall sind weitere Generationen von Mutagenese und Screening gefordert, um die Varianten zunächst zu stabilisieren, bevor die Struktur der Deckelvarianten und die Auswirkungen strukturbeeinflussender Mutationen weiter charakterisiert werden.

Insofern sind stabilisierende Mutationen wie F17Y und N94D sogar wünschenswert und für eine weitere Charakterisierung der Deckelvarianten von großem Nutzen. Durch Vergleiche mit einer durch dieselben Punktmutationen modifizierten WT-BSLA können im Anschluss die Funktionen der Deckelstrukturen und weiterer strukturbeeinflussender Punktmutationen im Einzelnen bestimmt werden, ähnlich wie für F17 und N82 durchgeführt wurde.

Die in Kapitel 4.3.4 diskutierte Hypothese, dass die Aktivitätssteigerungen durch die diversen Mutationen an Position F17 weniger zur Optimierung der Wechselwirkungen zwischen Deckelinsertion und Proteingrundgerüst beitragen, als vielmehr durch Veränderung physikalischer Eigenschaften verursacht wurden, wird durch die Stabilitätsmessungen mit den aufgereinigten Enzymen bestätigt. N94D ist an diesen Effekten zwar sicherlich beteiligt, die Häufigkeit der Mutationen an Position F17 während der gerichteten Evolution spricht jedoch dafür, dass diese Mutationen die wesentliche Triebkraft darstellen.

Die Mutation L123P in der Cutilip-Mutante scheint interessanterweise zu einer leichten Destabilisierung des Enzyms zu führen, obwohl sie Bestandteil der von ACHARYA *et al.* (2004) 300fach stabileren Dreifachmutante der BSLA war. Das hier erhaltene Ergebnis bestätigt jedoch eher die Arbeit von FUNKE (2004), nach der die Einzelmutationen dieser Dreifachmutante keinen Effekt auf die Stabilität der BSLA ausüben.

Es kann davon ausgegangen werden, dass auch weitere, in der gerichteten Evolution zutage getretene Punktmutationen die Stabilität der Deckelvarianten betreffen. Diese Mutationen entsprechen jedoch dem Ziel der Versuche, sofern sie zur Aufhebung der durch die Deckelinsertionen hervorgerufenen Destabilisierungen beitragen. Dies könnte beispielsweise durch Verstärkung der Wechselwirkungen zwischen Proteinrückgrat und Deckelpeptid oder seiner Basis geschehen wie für die Mutationen an Position 91 (4.4.7) und auch für V63A (4.4.4) diskutiert wurde. Ein Fazit aus den erhaltenen Ergebnissen wird in Kapitel 4.6. diskutiert.

4.5. Die Deletion des Deckels der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A

Ein Ansatz, der sich zur Konstruktion von BSLA-Varianten mit künstlichen Deckelstrukturen komplementär verhält, war die Deletion des Deckels der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A (PAL). Dieser Ansatz resultierte trotz intensiver Bemühungen weder nach Expression im heterologen Wirt *E. coli* noch im homologen Wirt *P. aeruginosa* in aktiven Varianten. Die Struktur der PAL ist erheblich komplexer als die der BSLA. Während letztere sehr klein ist und sich nach der Expression spontan selbst in seine aktive Konformation faltet, benötigt die

PAL dazu den Faltungshelfer LipH (WOHLFARTH *et al.*, 1992). Eine Expression im heterologen Wirt *E. coli* führt zur Bildung von *inclusion bodies*, die unter einigem Aufwand rückgefaltet werden müssen, um aktives Enzym zu erhalten (SCHNEIDINGER, 1997; OSHIMA-HIRAYAMA *et al.*, 1993). Es ist nicht unwahrscheinlich, dass durch den fehlenden Deckelbereich die Interaktion mit dem Faltungshelfer beeinträchtigt wurde und das ungefaltete Protein von der Zelle degradiert wurde. Da per SDS-PAGE-Analyse weder im Kulturüberstand noch intrazellulär eine verkleinerte LipA-Bande detektiert werden konnte, ist zu vermuten, dass entweder die Deletion das Expressionsniveau der Proteine bis unterhalb der Detektionsgrenze der SDS-PAGE verringerte, oder aber dazu führte, dass das Protein nach Fehlfaltung von der Zelle degradiert wurde. Näheren Aufschluss darüber kann ein Western-

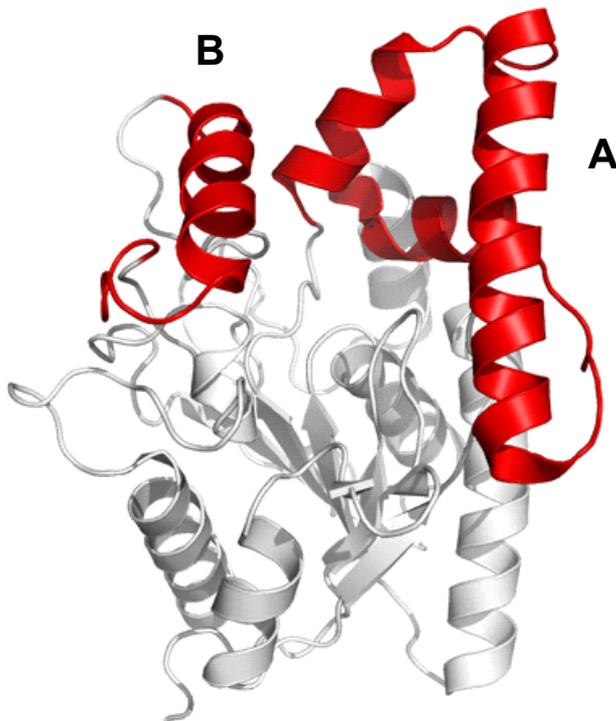


Abb. 4.8: Die flexiblen Deckelbereiche der PAL nach CHERUKUVADA *et al.*, 2005. Zusätzlich zu dem von NARDINI *et al.* 2000 postulierten Deckelbereich (A) tritt in der molekulardynamischen Simulation von CHERUKUVADA *et al.* ein zweiter flexibler Bereich (B) in Erscheinung, der zusammen mit dem ersten wie eine Art Doppeltür zusammenwirkt.

Blot liefern, der jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt wurde. In Anbetracht des hohen G/C-Gehaltes der *Pseudomonas aeruginosa*-DNA ist auch die Bildung von Sekundärstrukturen auf RNA-Ebene denkbar und eine dadurch bedingte Beeinträchtigung der Translation.

Vermutlich ist eine Deletion in der PAL grundsätzlich problematischer, nicht nur, weil sie aus einem komplex regulierten Operon heraus exprimiert wird, in dem zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Faltungshelfer eine entscheidende Rolle spielen können, sondern auch weil die Lipase selbst sehr viel komplexer strukturiert ist als die minimale α/β -Hydrolase BSLA. Im Laufe der natürlichen Evolution der PAL hat sich u. U. ein Netzwerk von Wechselwirkungen mehrerer Tertiärstrukturelemente entwickelt, das durch die Deletion

gestört wird. So führten CHERUKUVADA *et al.* 2005 molekulardynamische Simulationen durch und postulierten, dass in der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase höchstwahrscheinlich ein zweiter Deckel existiert (Abb. 4.8), zusätzlich zu dem von NARDINI *et al.* postulierten Deckel um die Helix $\alpha 5$. Dieser zweite Deckel werde von den Aminosäuren 203-228 konstituiert und funktioniere zusammen mit dem ersten wie eine Art Doppeltür. Ob man diesen *loop* als Deckel bezeichnet oder nicht - beide könnten zusammen mit weiteren flexiblen Peptidschleifen in der Umgebung des Aktiven Zentrums ein solches Netzwerk von Tertiärstrukturelementen bilden, das einerseits für die Substratbindung entscheidend sein kann und andererseits für die molekulare Erkennung durch Faltungs- und Sekretions-Helferproteine. In einfacher strukturierten Enzymen dagegen sind solche Wechselwirkungen weniger zahlreich und können durch eine gerichtete Evolution in der Folge erzeugt oder optimiert werden.

Da auch nach umfangreicher Mutagenese der jeweiligen Gene mittels epPCR und Hochdurchsatzscreening von ca. 30.000 Klonen keine Aktivität gegenüber Tributyrin sichtbar wurde, wird geschlussfolgert, dass die Deckelstruktur in dieser Form essentiell für die Aktivität bzw. für die native Expression und Faltung des Enzyms ist und diese sich durch einzelne Punktmutationen im Rahmen einer gerichteten Evolution nicht wiederherstellen lassen.

Trotz oder gerade wegen dieser alles andere als trivialen Zusammenhänge bleibt es jedoch ein äußerst interessantes Ziel, durch Verringerung der Komplexität der *Pseudomonas aeruginosa*-Lipase nicht nur ihre Substratspezifität zu verändern, sondern unter Umständen sogar einen Verzicht auf den Faltungshelfer LipH zu ermöglichen und so die native Expression im heterologen Wirt *E. coli* zu ermöglichen. Die Flexibilität der α/β -Hydrolase-Faltung bietet dafür ausreichend Spielraum, wie die Existenz zahlreicher ebenso oder sogar komplexerer Lipasen beweist, die keine Faltungshelfer benötigen (FISCHER *et al.*, 2006; KANG, 2006). Eine umfassendere *in silico*-Analyse könnte über eine Reihe möglicher alternativer Deletionen und Substitutionen Aufschluss geben. Diese könnten kombinatorisch variiert werden und mit Hilfe des Tributyrin-Agarplattentests könnten solche Banken in hohem Durchsatz auf Aktivität untersucht werden.

4.6. Ein Fazit: Bewertung der Methodik als Protein Engineering-Ansatz

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Grundfaltung der α/β -Hydrolasen einen großen Spielraum für strukturelle Veränderungen in den *loop*-Regionen bereitstellt und auch

Insertionen großer Strukturelemente toleriert werden. Es kann so die Substratspezifität eines bestehenden Enzyms bedeutend verändert werden. Dass die Axelip-Variante der BSLA gegenüber einigen Substraten sogar deutlich höhere Aktivität als die Wildtyp-Lipase aufwies, ist ein deutlicher Beleg für das große Potential dieses strukturbasierten *Protein Engineering*-Ansatzes. Sicherlich ist dies aber nur ein erster Schritt als *proof of principle*, denn die Methode hat vielfältige Entwicklungsmöglichkeiten. Erste Versuche zur Einführung mehrerer homologer Insertionen gleichzeitig beispielsweise führten bereits zum Erfolg – in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. W. Quax an der Universität Groningen konnte auch hier Aktivität gegenüber einigen Isopropylidenglyceryl-Estern nachgewiesen werden - die Arbeiten dauern an. Auch könnten in weiteren Schritten Art und Größe der Insertionen kombinatorisch variiert werden. Denkbar wäre der Austausch größerer Teilbereiche von Proteinen oder sogar eine Art Neukombination von mehreren bereits existenten Strukturelementen von α/β -Hydrolasen – ein Ansatz ähnlich dem „Block-Shuffling“ von TSUI *et al.* (2006), allerdings mit dem entscheidenden Unterschied, dass ausschließlich bereits existente Sekundär- und Tertiärstrukturelemente neu kombiniert werden. Die Arbeit mit solchen, bereits auf natürlichem Wege evolvierten Strukturelementen hat gegenüber anderen *Protein Engineering*-Ansätzen, wie z.B. dem *de novo*-Design oder der *de novo*-Evolution von Enzymen den großen Vorteil, dass mit einer Art von „Bausteinen“ gearbeitet wird, deren Funktionalität sich unter natürlichen Bedingungen bereits bewährt hat und die nun schlicht neu kombiniert werden. In *de novo*-Ansätzen müssen solche funktionalen Bausteine erst aus der enormen Zahl von Möglichkeiten ausselektiert werden (WOYCECHOWSKY *et al.*, 2007; WOYCECHOWSKY & HILVERT, 2004; TAYLOR *et al.*, 2001). In Form großer und vielseitiger Strukturfamilien wie den α/β -Hydrolasen, den α/β -barrel-Proteinen, den $\alpha/\beta/\alpha$ -Hydrolasen sowie vielen anderen bestehen in der Natur jedoch große „Pools“ solcher funktioneller und prinzipiell zueinander passender Strukturelemente. Diese könnten durch Neukombination genutzt werden, um neue katalytische Aktivitäten zu erzeugen (FISCHER *et al.*, 2006; KANG, 2006; STERNER & SCHMID, 2004; WIERENGA, 2001). Die praktische Umsetzung solcher Überlegungen ist sicherlich nicht trivial und erfordert umfangreiche Vorarbeiten *in silico* zur Zusammenstellung entsprechender kombinierbarer, homologer Elemente als eine Art „Bausteine“. Die *Bacillus subtilis* Lipase A stellt in ihrer Eigenschaft als minimale α/β -Hydrolase jedoch ein solides Fundament für ein solches „Baukastensystem“ dar und ist damit eine für α/β -Hydrolasen optimale Basis. Die vorliegende Arbeit ist ein erster Schritt für die Entwicklung eines solchen Systems. Das Beispiel der Deckelvariante Axelip sowie einige vor kurzem erschienene, hervorragende Publikationen

(PARK *et al.*, 2006; DWYER *et al.*, 2004; LEOPOLDSEDER *et al.*, 2004) zeigen, dass das Vorgehen sehr erfolgreich sein kann.

In einer Fortsetzung der vorliegenden Arbeit sollten weitere Generationen gerichteter Evolution auf den Erkenntnissen aus den ersten beiden aufbauen. So sollten die nächsten Mutageneseschritte auf die sensiblen Bereiche der Varianten beschränkt werden, in denen in den ersten beiden Generationen gehäuft Mutationen auftraten und für die Stabilität kritische Bereiche, wie das zentrale β -Faltblatt, sollten von der Mutagenese ausgeschlossen werden. Dies verringert den Umfang der Mutantenbanken und damit die Erfolgswahrscheinlichkeit, sterisch relevante Mutationen zu entdecken. In einem systematischen Verfahren könnte dabei auch die ISM-Methode verwendet werden (REETZ *et al.*, 2006b), die bereits zur Erhöhung der Temperaturstabilität der BSLA erfolgreich angewandt wurde. Es wurden auch in dieser Arbeit bereits Versuche unternommen, die Deckelinsertionen isoliert per epPCR zu mutieren, dies wurde jedoch aufgrund experimenteller Schwierigkeiten bei der Insertion der epPCR-Produkte in das Lipase-Gen nicht weiter verfolgt. Diese Schwierigkeiten würden umgangen werden durch die Verwendung sogenannter *spiked oligos*, synthetischer Oligonukleotide mit einem festgelegten Prozentsatz von zufälligen Mutationen. Diese sind in der letzten Zeit durch die rasante Entwicklung der DNA-Synthese-Technologien erheblich kostengünstiger zu erhalten als noch zu Anfang dieser Promotion.

Weiterhin sollten Mutationen mit ungeklärter Funktion an ihren homologen Positionen - soweit vorhanden - in der Wildtyp-BSLA erzeugt werden um ihre Auswirkungen im Detail zu untersuchen, so wie es bereits mit den *Hotspot*-Positionen F17 und N91 durchgeführt wurde. Dadurch können Mutationen, die durch Co-Evolution von Löslichkeit und Stabilität unter den Assaybedingungen zustandekommen, von solchen mit Auswirkungen auf die Struktur der Enzymvarianten unterschieden werden. Eine solche Co-Evolution wird sich ebenso wie das Auftreten neutraler Mutationen, kaum vermeiden.

Die Weiterentwicklung aufgetretender Substratspezifitäten könnte ebenfalls durch gerichtete Evolution erfolgen, sofern ein Hochdurchsatz-Enzymtest besteht. So z.B. könnte die Aktivität der bislang noch nicht weiterevolvierten Deckelvariante Axelip gegenüber einem der verzweigten Ester optimiert werden.

Die Aufreinigung von Deckelvarianten und ihrer Punktmutanten zur Aufklärung ihrer Kristall- bzw. NMR-Strukturen sollte ein weiteres Ziel für die Zukunft sein, um vergleichende Rückschlüsse über die Konformation dieser neuen Enzymvarianten abzuleiten.

4.7. Die Evolution der Enantioselektivität der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A

Die gerichtete Evolution der Enantioselektivität der Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* war in der Vergangenheit bereits Gegenstand einer Reihe wissenschaftlicher Publikationen (REETZ, 2004, 2001; LIEBETON *et al.*, 2000; REETZ *et al.*, 1997). Besondere Schwierigkeiten bereitete dabei zunächst das hochdurchsatztaugliche Nachweisverfahren für enantioselektiven Substratumsatz, das jedoch am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim an der Ruhr erfolgreich etabliert werden konnte (REETZ *et al.*, 1999). Von ebenso wesentlicher Bedeutung für die Optimierung dieser sehr speziellen Enzymeigenschaft ist jedoch die Wahl der Mutagenese-Methode. Im Gegensatz zur Evolution neuer Substratspezifitäten, wie sie im ersten Teil dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist es bei der Evolution der Enantioselektivität weniger entscheidend, große strukturelle Diversität zu erzeugen, als vielmehr in einer Art Feinabstimmung relativ geringfügige Veränderungen zu erreichen, diese aber zielgerichteter zu platzieren. Nicht zuletzt mit diesem Ziel hat sich in den letzten Jahren ein Trend zu sogenannten *focussed libraries* entwickelt, nach dem Genbibliotheken von vornherein (1) mit minimierter Mutations-Redundanz und (2) auf sensible Enzymregionen beschränkt konzipiert werden (LEISOLA & TURUNEN, 2007; LUTZ & PATRICK, 2004). Dafür wurden in jüngster Zeit sehr effiziente, systematische Evolutionsverfahren entwickelt, die den Screeningaufwand weitgehend minimieren, wie z.B. die CAST-Methode (WANG *et al.*, 2006; REETZ *et al.*, 2005).

Für die Grundlagenforschung ist nach wie vor das übergeordnete Ziel, ein grundlegendes mechanistisches Verständnis der Enzymkatalyse zu erarbeiten, um durch möglichst zielgerichtete Mutagenesen den Entwicklungsaufwand für neue, technisch nutzbare Enzyme minimieren zu können.

Methoden der molekularen Modellierung wie Molekülmechanik (MM), quantenmechanische Rechnungen (QM) und molekulardynamische Simulation (MD) sind dabei wesentliche Werkzeuge sowohl bei der Verarbeitung und Interpretation der experimentell gewonnen Erkenntnisse, als auch für deren Anwendung auf konkrete Fragestellungen der Enzymoptimierung. Die Verfeinerung der Modelle und Algorithmen kann jedoch nur erfolgreich verlaufen, wenn sie kontinuierlich mit experimentellen Daten abgeglichen werden. An dieser Schnittstelle zwischen Theorie und Experiment setzten die hier beschriebenen Arbeiten an.

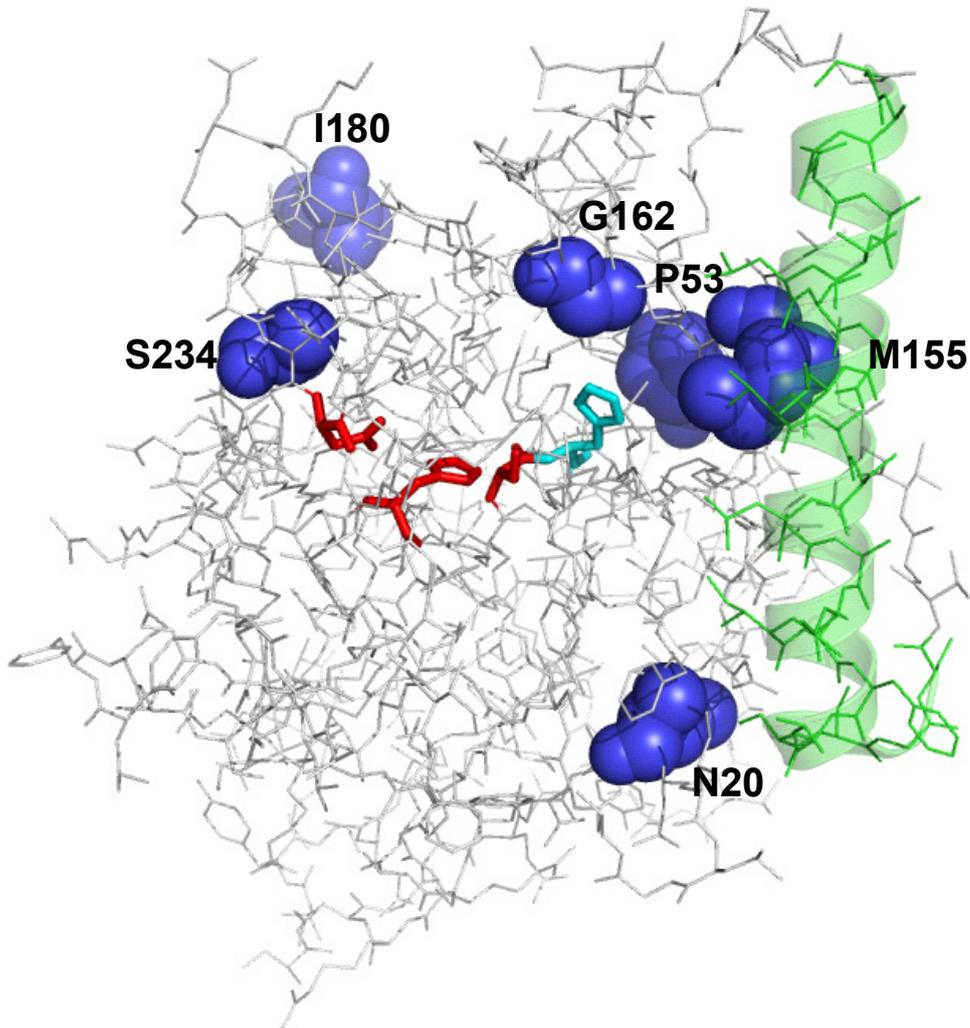


Abb. 4.9: : Modell der 1H8-Mutante der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A (PAL). Von den sechs Mutationen (dargestellt als blaue Kugel-Modelle) befindet sich nur G162 in direkter Nähe des aktiven Zentrums (rote Stabmodelle). Das Histidin 83 ist als cyan-farbenes Stabmodell ebenfalls gekennzeichnet. Die Struktur befindet sich in derselben Orientierung wie in Abb. 3.18 - zur besseren räumlichen Orientierung ist die Deckelhelix in grün angedeutet.

Die Anfänge der gerichteten Evolution der Enantioselektivität der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A fanden dabei auf klassischem Wege statt: Einigen Zyklen fehlerhafter PCR folgten Sättigungsmutagenesen an Hotspot-Positionen wie z.B. S155 oder L162. Die gefundenen Varianten wurden dann in einer kombinatorischen Kassettenmutagenese miteinander rekombiniert. Die beste gefundene Variante schließlich wurde in einem theoretischen Ansatz von MARCO BOCOLA am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim a. d. Ruhr modelliert und mechanistisch analysiert. Die daraus abgeleiteten Hypothesen wurden in dieser Arbeit experimentell überprüft und ihre Ergebnisse werden im Folgenden anhand des bestehenden Modells interpretiert.

4.7.1. Die Mutationen S53P und L162G wirken sich kooperativ auf H83 aus.

Die Analysen der Punktmutationen der 1H8-Mutante ergaben, dass nur eine davon, L162G, in direkter Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert war (Abb. 4.9). Mit Ausnahme von L162G hatten die Einzelmutationen der 1H8-Mutante auch nur sehr geringe Auswirkungen auf die Enantioselektivität der *Pseudomonas aeruginosa*-Lipase. Erst das gleichzeitige Auftreten der beiden Mutationen S53P und L162G und ihr synergistisches Zusammenwirken mit einer dritten, nicht mutierten Aminosäure - dem Histidin an Position 83 - führte dagegen zu einer drastischen Steigerung der Enantioselektivität. Dem Modell und den Simulationen zufolge hält im Wildtyp einerseits eine Wasserstoffbrücke zwischen H83 und S53 das Histidin in Position, andererseits übt das L162 eine sterische Beschränkung gegenüber der Seitenkette des H83 aus und hält diese vom aktiven Zentrum fern (Abb. 4.10). Die Mutation S53P beseitigt diese Wasserstoffbrücke und die Mutation L162G schafft einen relativ großen Freiraum für (1) die Bewegung des H83 ins aktive Zentrum hinein und (2) die Aufnahme der

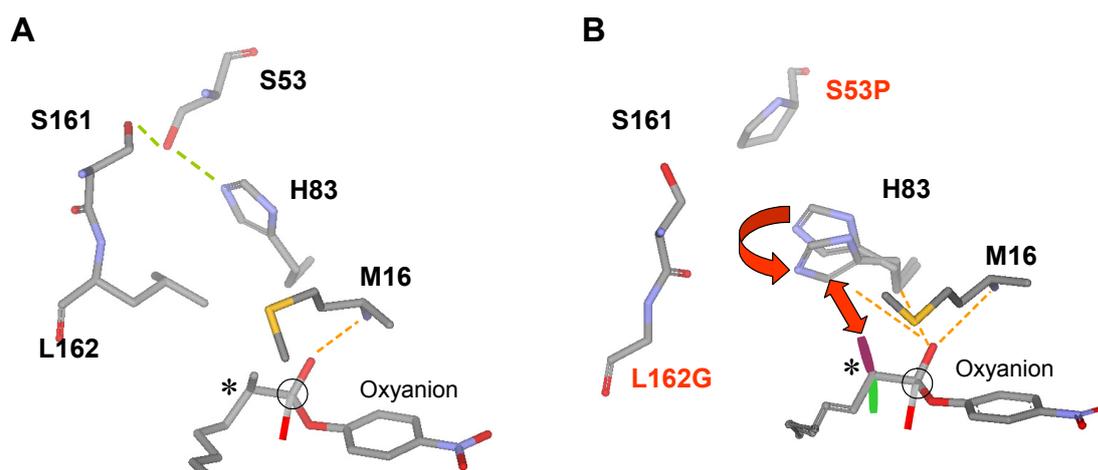


Abb. 4.10: Die Funktion des Histidin 83 (A) im Wildtyp und (B) in der Doppelmutante S53P/L162G. Durch den von L162G geschaffenen Freiraum und die Beseitigung der H-Brücke (H-Brücken sind durch gestrichelte Linien symbolisiert) zum S53 durch Mutation zu Prolin kann sich das H83 ins aktive Zentrum hineinbewegen und durch eine neue H-Brücke zum Oxyanion das tetraedrische Zwischenprodukt des *S*-Enantiomers stabilisieren. Für das *R*-Enantiomer ist dies nicht der Fall (die Orientierung der Methylgruppen am chiralen C-Atom des Substrates sind violett im Falle des *R*-Enantiomers und grün für das *S*-Enantiomer dargestellt (Reetz *et al.*, 2007).

Seitenkette des chiralen Zentrums des Substrates. Ist diese Bewegung des H83 möglich, wird es damit zu einem Teil des aktiven Zentrums und übt dann einerseits sterischen Einfluss auf die Substratbindung zu Ungunsten des *R*-Enantiomers aus, zum anderen kann sich zwischen dem N δ -Atom des Histidins und dem Oxyanion des *S*-Enantiomers eine Wasserstoffbrücke ausbilden (Abb. 4.10 B), wodurch dessen tetraedrisches Zwischenprodukt stabilisiert und so sein Umsatz beschleunigt wird. Die in dieser Arbeit

ermittelten Ergebnisse unterstützen diese Hypothese und zeigen eindeutig für die Doppelmutante S53P/L162 die höchste Enantioselektivität mit einem E-Wert von 63,8.

Die Mutation S53P allein dagegen hat keine Auswirkungen auf die Enantioselektivität, da die sterische Beschränkung des L162 in dieser Einfachmutante nach wie vor besteht. Die gesteigerte Enantioselektivität der Einzelmutante L162G dagegen kann auf eine Bewegung des H83 zurückgeführt werden, da die H-Brücke zum S53 dynamischen Charakter hat. Die Bewegung des H83 ins aktive Zentrum tritt zwar in der von BOCOLA *et al.* durchgeführten molekulardynamischen Simulation in diesem Falle nicht auf, dies kann jedoch mit der Kürze des Zeitraumes von 1 ns begründet werden. Dass die entsprechende manuelle Positionierung

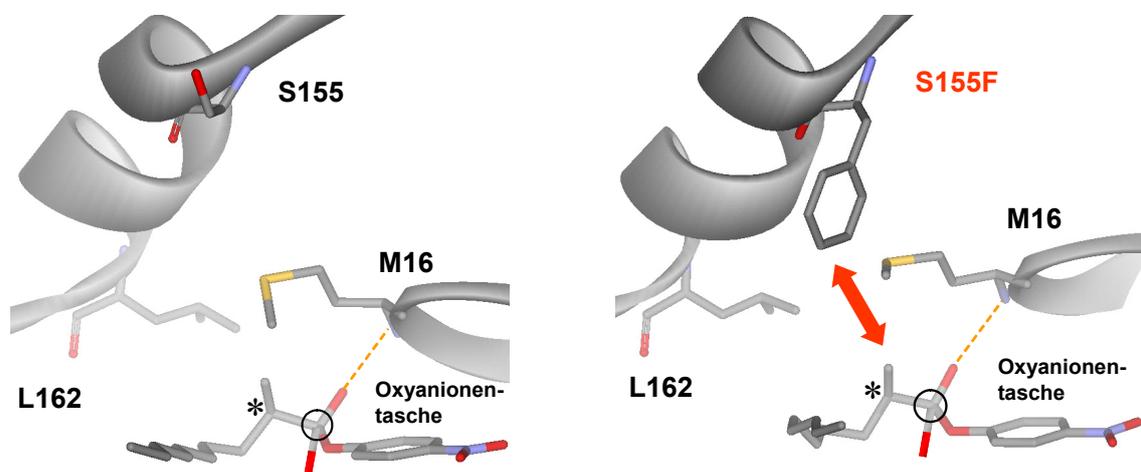


Abb. 4.11: Die Funktion der Aminosäure S155 im Wildtyp (links) im Vergleich zur Mutante S155F. In der Mutante übt das Phenylalanin über L162 sterischen Druck auf die Methylgruppe am chiralen C-Atom des *R*-Enantiomers aus, wodurch dessen Umsatz beeinträchtigt wird. Die H-Brücke des Oxyanions innerhalb der Oxyanionentasche sind als gestrichelte Linien dargestellt (aus: BOCOLA *et al.*, 2004).

des H83 im Modell unter Beibehaltung natürlicher Geometrien möglich ist, legt diesen Mechanismus jedoch nahe. H83 übt einen ähnlichen sterischen Einfluss auf die Substratenantiomere aus wie in der Doppelmutante. Auch eine H-Brücke zum Oxyanion des *S*-Enantiomers des Substrates ist geometrisch möglich, allerdings tritt sie quasi mit der energetisch favorisierten H-Brücke zum S53 in Konkurrenz, was den im Vergleich zur Doppelmutante S53P/L162G verringerten E-Wert von 33 erklären würde. Die Annahme des kontraproduktiven Einflusses der Mutation S155M bzw. S155F in den jeweiligen Dreifachmutanten M9 und M10 konnte durch die Experimente ebenfalls weitgehend bestätigt werden, mit leichten Einschränkungen im Falle der Mutante M10 (S53P/S155F/L162G). Die Position S155 war in den vorangegangenen Arbeiten zur gerichteten Evolution als *Hotspot* in

Erscheinung getreten (REETZ, 2001). Im Modell der Einzelmutante S155F wurde dies zurückgeführt auf den sterischen Druck, den das Phenylalanin auf L162 ausüben könnte und der sich zu Ungunsten des *R*-Enantiomers auswirken würde. Ist L162 wie in der Dreifachmutante durch Glycin ersetzt, ist diese Wechselwirkung nicht gegeben und die Selektivität ist nicht beeinflusst. Die Modellierungen deuteten sogar im Gegenteil an, dass S155F die neue, durch L162G geschaffene Cavität wieder teilweise verschließen könnte, was die Verringerung der Enantioselektivität bewirken würde. Dies wird von den vorliegenden Ergebnissen bestätigt.

Weiterhin wird durch die Mutation an Position 155 die einzige Wasserstoffbrücke zwischen der Deckelhelix der PAL und dem Proteincorpus beseitigt, was zu größeren strukturellen Verschiebungen führen könnte, die in der molekulardynamischen Simulation über 1 ns nicht berücksichtigt werden konnten. Die experimentellen Daten zeigen, dass die E-Werte der Dreifachmutanten M9 (L162G/ S53P/ S155M) mit einem E-Wert von 42 zwar tatsächlich signifikant unter dem der Doppelmutante M8 (L162G/ S53P) mit einem E-Wert von 63,8 liegen, jedoch liegt im Fall der Mutante M10 (L162G/ S53P/ S155F) der E-Wert mit 58 relativ dicht an dem der Doppelmutante. S155F hat in diesem Fall also nur relativ geringen Einfluss auf die Enantioselektivität.

Die Aminosäuren D20N, T180I und T234S sind an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert und ihre Seitenketten weisen ins Lösungsmittel. Ein Einfluss auf die Geometrie des aktiven Zentrums ist aufgrund der relativ großen Entfernung unwahrscheinlich. Die experimentellen Daten dieser Arbeit ordnen die Enantioselektivität der 1H8-Mutante zwischen denen der beiden Dreifachmutanten M9 und M10 ein. Da diese Oberflächenmutationen bereits in früheren Stadien des Evolutionverlaufes akkumuliert wurden und dort die Selektivität nicht auffällig beeinflusst hatten (LIEBETON *et al.*, 2000), kann angenommen werden, dass sie zur Stabilität der enantioselektiven Varianten unter Assaybedingungen beitragen, oder schlicht keine Auswirkungen haben. Da diese Parameter in den theoretischen Studien nicht modelliert wurden, wäre bei dem geringen Einfluss der Mutationen ein Interpretationsversuch spekulativ.

4.7.2. Nähere Untersuchung der Funktion des Histidins an Position 83 und die besondere Bedeutung zweier Wassermoleküle für die Enantioselektivität

Um die Hypothese der Schlüsselrolle des H83 zu überprüfen, wurden an dieser Position verschiedene Mutationen eingeführt. H83 wurde in der Doppelmutante M5 und in den Mutanten M8-10 sowie im Wildtyp jeweils durch Alanin, Leucin und Phenylalanin ersetzt. Wie erwartet, hatte im Wildtyp keine der Mutationen eine Auswirkung auf die

Enantioselektivität des Enzyms, da das Histidin hier durch die oben beschriebenen Wechselwirkungen weitgehend fixiert vorliegt und damit ohnehin keine Funktion bei der Substratbindung ausüben kann. Im Falle der stereoselektiven Varianten, insbesondere der Mutante L162G und der Doppelmutante S53P/L162G, wurde jedoch eine signifikante Abnahme der *S*-Enantioselektivität bei Austausch des H83 gegen Alanin erwartet, da hier sowohl der sterische Einfluss im aktiven Zentrum fehlen würde, als auch die Wasserstoffbrücke zum Oxyanion des *S*-Enantiomers. Leucin und Phenylalanin wurden aufgrund ihrer sterischen Ähnlichkeiten zum Histidin als Austauschgruppen gewählt. Für

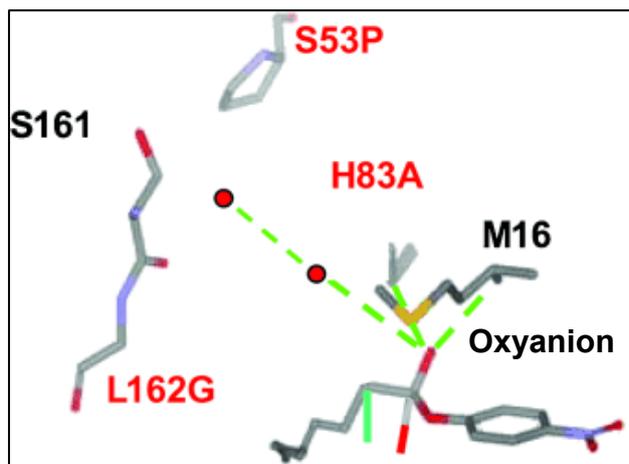


Abb. 4.12: Mögliche Auswirkung der Mutation des Histidin 83 zu Alanin. Fehlt die große Histidin-Seitenkette, können in die so entstehende Cavität zwei H_2O -Moleküle (rote Punkte) eindiffundieren und über ein H-Brücken-Netzwerk zum Oxyanion des *S*-Enantiomers dessen tetraedrisches Zwischenprodukt stabilisieren. Die dafür erforderliche Geometrie findet sich beim *R*-Enantiomer nicht (REETZ *et al.*, 2007).

diese Mutationen H83L und H83F wurde daher eine zumindest teilweise Beibehaltung der Stereoselektivität erwartet. Die experimentellen Daten zeigten jedoch überraschenderweise ein anderes Ergebnis, nämlich die signifikante Erhöhung der Enantioselektivität im Falle der Variante H83A/L162G und eine weitgehende Beibehaltung im Falle der Dreifachmutante S53P/H83A/L162G. Die *E*-Werte der analogen H83L-Varianten nahmen im Vergleich dazu stark ab und sanken für die H83F-Varianten auf Wildtyp-Niveau. Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür liefern zwei

Wassermoleküle, die die durch H83A entstehende Cavität ausfüllen könnten und Wasserstoffbrücken zum Oxyanion des *S*-Enantiomers ausbilden könnten (Abb. 4.12). Diese Annahmen werden von neuen Berechnungen anhand derselben Versuchsanordnung des *in silico*-Modells bestätigt. H83A/L162G wurde *in silico* konstruiert und die lokalen Geometrien per CHARMM22/27-Kraftfeld (FOLOPPE & MACKERELL, 2000; MACKERELL *et al.*, 1998; PAVELITES *et al.*, 1997) optimiert. Zwei H_2O -Moleküle wurden manuell in die Cavität eingefügt und verschiedene Zustände der Substratkonformationen berechnet. Ein lokales Energieminimum ergab sich für das *S*-Enantiomer mit Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den H_2O -Molekülen und dem Oxyanion, nicht jedoch im Falle des *R*-Enantiomers. In einer ebenfalls mit diesem System durchgeführten MD-Simulation über 1 ns wurde deutlich, dass die beiden H_2O -Moleküle zwar äußerst beweglich sind, jedoch mindestens

eines von ihnen jeweils hinreichend lange in einer Wasserstoffbrücken-konformen Geometrie am Oxyanion verbleibt. Im Falle des *R*-Enantiomers dagegen wurde dies in keinem Fall beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Fall der Alanin-Varianten die Funktion des Histidins von den H₂O-Molekülen ersetzt werden kann. Weiterhin wird deutlich, dass der Einfluss der H-Brücke auf das Oxyanion einen stärkeren Effekt im Hinblick auf die Enantioselektivität darstellt, als die sterische Beeinträchtigung des *R*-Enantiomers. Dies würde auch die drastische Abnahme der Selektivität im Falle des Phenylalanin-Austausches erklären: Die aromatische Phenylalaninseitenkette bildet keine H-Brücke aus und kann somit lediglich sterische Effekte ausüben. Sie ist obendrein so groß, dass sie in der Cavität keinen Platz für H₂O-Moleküle lässt. Dasselbe gilt im Falle des Leucins an dieser Position. Die Enantioselektivität nimmt in den H83-Varianten in der Reihenfolge Ala>Leu>Phe ab. Zu den beiden letztgenannten Fällen existieren jedoch keine modellunterstützten Daten.

Im Falle der Histidinvarianten der Mutanten M20-25 fällt eine Interpretation deutlich schwerer, da bei vier gleichzeitigen Mutationen nicht mehr alle Wechselwirkungen erschöpfend einschätzbar sind. So bleiben die Enantioselektivitäten im Falle der H83-Mutanten M23 und M24 unabhängig von der Aminosäuresubstitution ähnlich. Nicht berücksichtigt wurde hier weiterhin die fehlende Wasserstoffbrücke zwischen der Position 155 und der Deckelhelix des Enzyms. Die daraus möglicherweise resultierenden größeren strukturellen Veränderung unter Beteiligung des Deckels finden in einem Zeitraum statt, der über den der MD-Simulation von 1 ns hinausgeht und können daher anhand der erfolgten Simulation nicht erschöpfend interpretiert werden.

4.7.3. Fazit aus den Arbeiten zur Optimierung der Enantioselektivität der PAL

Die vorliegenden Ergebnisse liefern einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der Enantioselektivität der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A gegenüber dem Substrat *R/S*-2-Methyldekansäure-*p*NP-Ester und liefern darüberhinaus detaillierte Beschreibungen über den katalytischen Mechanismus des Enzyms. Besonders hervorzuheben ist dabei die unerwartete Rolle der beiden Wassermoleküle, die in H83A an der Enantioselektivität der Lipase direkt beteiligt sind. Die gewonnenen Erkenntnisse und Erfahrungen aus Evolution und Modellierung sind publiziert (REETZ *et al.*, 2007) und dienen hoffentlich weiteren Arbeiten zur Optimierung der Enantioselektivität als Orientierung. Es wird indes ein weiteres Mal deutlich, dass enzymkatalysierte Reaktionen und ihre Optimierung durch gerichtete Evolution äußerst komplexe Vorgänge sind, für die ein grundlegendes Verständnis vermutlich stets im Einzelfall neu erarbeitet werden muss. Umso

wichtiger ist daher die konsequente Weiterentwicklung von *in silico*-Modellen, die bei der Aufklärung dieser Vorgänge von großem Nutzen sind, wie in dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden konnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Lipase A aus *Bacillus subtilis* (BSLA) in ihrer Eigenschaft als minimale α/β -Hydrolase als Grundgerüst für die Insertion homologer Strukturelemente aus anderen α/β -Hydrolasen verwendet. Durch diese Insertionen wurden drei unterschiedliche Varianten mit verlängerten Peptidschleifen (*loops*) in der Umgebung des aktiven Zentrums erzeugt. Diese Peptidschleifen sollten die Substratbindetasche des Enzyms und damit seine katalytischen Eigenschaften signifikant beeinflussen. Die lipolytische Aktivität der Varianten war geringer als die der Wildtyplipase, konnte jedoch in einigen Fällen durch gerichtete Evolution wiederhergestellt werden. Ferner zeigten die Varianten ein deutlich verändertes Substratspektrum.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte damit die Grundlage zur Konstruktion eines Baukastensystems gelegt werden, mit dem Strukturelemente in die minimale α/β -Hydrolase BSLA integriert werden können, um so neue Substratspezifitäten oder Enantioselektivität für die Entwicklung maßgeschneiderter Biokatalysatoren zu erzeugen.

In einem komplementären Ansatz wurde die Deckelstruktur der komplexer strukturierten Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* (PAL) deletiert. Dies resultierte jedoch im Verlust der lipolytischen Aktivität, was darauf hindeutet, dass die Funktion der eliminierten Peptidschleife über die eines Deckels hinausgeht. Denkbar wäre eine Funktion bei der Proteinfaltung.

Weiterhin wurden verschiedene Einzelmutanten der PAL konstruiert, basierend auf vorangegangenen Arbeiten zur gerichteten Evolution der Enantioselektivität des Enzyms. Die Auswirkungen dieser Mutationen sowie einiger ihrer Kombinationen waren zuvor *in silico* modelliert worden und konnten in dieser Arbeit experimentell aufgeklärt werden.

Die Versuche konnten zeigen, dass die Kombination aus rationalem Design und gerichteter Evolution vielversprechende Strategien bereitstellt, um so sensible Eigenschaften wie Substratspezifität oder Stereoselektivität von Enzymen erfolgreich zu optimieren.

6. ABSTRACT

The *Bacillus subtilis* lipase A (BSLA), being regarded as a minimal α/β -hydrolase, was applied as a basic scaffold for the insertion of structural elements of other α/β -hydrolases into its protein backbone. Three different variants were created with elongated *loops* close to the active site to reshape the substrate binding pocket of the enzyme and thus alter its catalytic activities towards different substrate specificities. The specific activities of the variants were somewhat lower than that of the wildtype but could be increased by directed evolution. The variants indeed showed altered substrate preferences, thus laying the groundwork for the construction of tailor-made α/β -hydrolases and a toolbox-like collection of structural building blocks for α/β -hydrolase enzymes, which could be combined rationally or by combinatorial methods.

In a complementary approach, the lid of the more complexly shaped lipase A of *Pseudomonas aeruginosa* (PAL) was deleted from the enzyme. However, this did not yield any active variants, most likely due to the disruption of structural interactions within the enzyme, pivotal to its proper folding and secretion.

Furthermore various point mutants of the PAL were constructed, based on previous experimental and theoretical studies regarding the enantioselectivity of the enzyme. The impacts of these single mutations as well as of specific combinations on the enantioselectivity of the enzyme were experimentally elucidated in this study.

It could be demonstrated that the combination of rational design and directed evolution provide most successful strategies for the evolution and optimization of such delicate enzyme properties such as substrate specificity and enantioselectivity.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Acharya, P., Rajakumara, E., Sankaranarayanan, R., Rao, N. M. (2004):** Structural Basis of Selection and Thermostability of Laboratory Evolved *Bacillus subtilis* Lipase. *J. Mol. Biol.* **341**: 1271-1281.
- Adamczak, M., Krishna, S. H. (2004):** Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol.* **42**: 251-264.
- Aharoni, A., Griffiths, A. D., Tawfik, D. S. (2005):** High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 210-216.
- Airaksinen, A., Hovi, T. (1989):** Modified base compositions at degenerate positions of a mutagenic oligonucleotide enhance randomness in site-saturation mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **26**: 576-581.
- Arnold, F. H., Chen, K. (1994)** Subtilisin variants suitable for hydrolysis and synthesis in organic media. *US-Patent 5316935*.
- Arnold, F. H., Georgiou, G. (2003):** Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods. 1. Auflage, *Humana Press*, New Jersey.
- Arpigny, J. L., Jaeger, K.-E. (1999):** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* **343**: 177-183.
- Bachmann, R., Budde, F., Riese, J. (2004):** Die dritte Welle - Die Biotechnologie erobert die Chemieindustrie. *Chem. Ing. Tech.* **76**: 1155-1158.
- Bäckvall, J. E. (2006):** Asymmetric Catalysis via Dynamic Kinetic Resolution. In: Christmann, M. and Bräse, S. (Hrsg.): *Asymmetric Synthesis - The Essentials*. 1. Auflage, *Wiley-VCH*, Weinheim.
- Bai, Y., Feng, H. (2004):** Selection of stably folded proteins by phage-display with proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **271**: 1609-1614.
- Baker, K., Bleczinski, C., Lin, H., Salazar-Jimenez, G., Sengupta, D., Krane, S., Cornish, V. W. (2002):** Chemical complementation: a reaction-independent genetic assay for enzyme catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16547-16542.
- Becker, S., Schmoldt, H. U., Adams, T. M., Wilhelm, S., Kolmar, H. (2004):** Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 323-329.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Geng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000):** The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**: 235-242.
- Bernath, K., Hai, M., Mastrobattista, E., Griffiths, A. D., Magdassi, S., Tawfik, D. S. (2004):** *In vitro* compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting. *Anal. Biochem.* **325**: 151-157.
- Bertschinger, J., Heinis, C., Neri, D. (2005):** Selections for enzymatic catalysts. In: Sidhu, S. S. (Hrsg.): *Phage display in biotechnology and drug discovery* Auflage, *Taylor & Francis Group*, Boca Raton, FL.
- Berzelius, J. J. (1836):** Quelques Idées sur une nouvelle force agissant dans les combinaisons des corps organiques. *Ann. Chim. Phys.* **61**: 146-151.
- Besenmatter, W., Kast, P., Hilvert, D. (2004):** New enzymes from combinatorial library modules. *Methods Enzymol.* **388**: 91-102.
- Bichet, A., Bureik, M., Lenz, N., Bernhardt, R. (2004):** The "Bringer" Strategy: A Very Fast and Highly Efficient Method for Construction of Mutant Libraries by Error-Prone Polymerase Chain Reaction of Ring-Closed Plasmids *Appl. Biochem. Biotechnol.* **117**: 115-122.
- 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.
- Bocola, M., Stubbs, M. T., Sotriffer, C., Hauer, B., Friedrich, T., Dittrich, K., Klebe, G. (2003):** Structural and energetic determinants for enantiopreferences in kinetic resolution of lipases. *Protein Eng.* **16**: 319-322.
- Boersma, Y. L., Dröge, M. J., Quax, W. J. (2007):** Selection strategies for improved biocatalysis. *FEBS J.* **274**: 2181-2195.
- Bohlmann, G. M. (2007):** Bioplastics and biofuels: pricing and production trends. *Ind. Biotechnol.* **3**: 25-28.

- Bolon, D. N., Voigt, C. A., Mayo, S. L. (2002):** De novo design of biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6:** 125-129.
- Bommarius, A. S., Riebel, B. R. (2004):** Biocatalysis. 1. Auflage, *Wiley-VCH*, Weinheim.
- Borgström, B., Brockmann, H. L. (1994):** Lipases. 1. Auflage, *Elsevier*, New York.
- Bornscheuer, U. T. (2002a):** Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13:** 543-547.
- Bornscheuer, U. T. (2002b):** Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol.* **20:** 433-437.
- Bornscheuer, U. T. (2004):** High-throughput-screening systems for hydrolases. *Eng. Life Sci.* **4:** 539-542.
- Bornscheuer, U. T. (2005):** Trends and challenges in enzyme technology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **100:** 181-203.
- Bornscheuer, U. T., Pohl, M. (2001):** Improved biocatalysts by directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5:** 137-143.
- Borrego, B., Wienecke, A., Schwienhorst, A. (1995):** Combinatorial libraries by cassette mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **23:** 1834-1835.
- Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Keßler, M., Stürmer, R., Zelinski, T. (2004):** Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43:** 788-824.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M. (1991):** A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351:** 491-494.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., Short, J. M. (1987):** XII-Blue - a high-efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5:** 376-379.
- Cadwell, R. C., Joyce, G. F. (1992):** Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* **2:** 28-33.
- Cadwell, R. C., Joyce, G. F. (1994):** Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl.* **3:** 136-140.
- Carrière, F., Thirstrup, K., Hjorth, S., Ferrato, F., Nielsen, P. F., Withers-Martinez, C., Cambillau, C., Esper, B., Thim, L., Verger, R. (1997):** Pancreatic lipase structure-function relationships by domain exchange. *Biochemistry* **36:** 239-248.
- Carrière, F., Withers-Martinez, C., van Tilbeurgh, H., Roussel, A., Cambillau, C., Verger, R. (1998):** Structure-function relationships of pancreatic lipases. *Fett-Lipid* **100:** 96-102.
- Chahinian, H., Bezzine, S., Ferrato, F., Ivanova, M. G., Perez, B., Lowe, M., Carrière, F. (2002):** The β 5'-loop of the pancreatic lipase C2-like domain plays a critical role in the lipase-lipid interactions. *Biochemistry* **41:** 13725-13735.
- Charbonneau, V., Ogilvie, W. W. (2005):** High throughput screening methods for asymmetric synthesis. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2:** 313-332.
- Chen, K., Arnold, F. H. (1993):** Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90:** 5618-5622.
- Chen, S. C., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C. J. (1982):** Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolutions of Enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **104:** 7294-7299.
- Cherukuvada, S. L., Seshasayee, A. S., Raghunathan, K., Anishetty, S., Pennathur, G. (2005):** Evidence of a double-lid movement in *Pseudomonas aeruginosa* lipase: Insights from molecular dynamics simulations. *PLoS Comput. Biol.* **1:** e28 (online).
- Chica, R. A., Doucet, N., Pelletier, J. N. (2005):** Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16:** 178-384.
- Chopra, S., Ranganathan, A. (2003):** Protein evolution by "codon shuffling": a novel method for generating highly variant mutant libraries by assembly of hexamer DNA duplexes. *Chem. Biol.* **10:** 917-926.
- Christmann, M., Bräse, S., (Hrsg.):** Asymmetric Synthesis - The Essentials. 1. Auflage (2006), *Wiley-VCH*, Weinheim.
- Cirino, P. C., Mayer, K. M., Umeno, D. (2003):** Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods Mol. Biol.* **231:** 3-9.
- Coco, W. M., Levinson, W. E., Christ, M. J., Hektor, H. J., Darzins, A., Pienkos, P. T., Squires, C., Monticello, D. J. (2001):** DNA shuffling method for generating highly recombined

genes and evolved enzymes. *Nat. Biotechnol.* **19**: 354-359.

Cohen, H. M., Griffiths, A. D., Tawfik, D. S., Loakes, D. (2004): Determinants of cofactor binding to DNA methyltransferases: insights from a systematic series of structural variants of *S*-adenosylhomocysteine. *Org. Biomol. Chem.* **3**: 152-161.

Cohen, N., Abamov, S., Dror, Y., Freeman, A. (2001): *In vitro* enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million. *Trends Biotechnol.* **19**: 507-510.

Collins, A. L., Sheldrake, G., Crosby, J. (1998): Chirality in Industry II. Auflage, *John Wiley & Sons*, Chichester.

Coward-Kelly, G., Chen, R. R. (2007): A Window into Biocatalysis and Biotransformations. *Biotechnol. Prog.* **23**: 52-54.

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.

Cramer, A., Stemmer, W. P. C. (1995): Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wild-type sequences. *BioTechniques* **18**: 194-196.

Dalby, P. A. (2007): Engineering Enzymes for Biocatalysis. *Recent Patents on Biotechnology* **1**: 1-9.

Dartois, V., Baulard, A., Scanck, K., Colson, C. (1992): Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochim. Biophys. Acta* **1131**: 253-260.

Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Dodson, G. G., Yamaguchi, S., Haas, M. J., Derewenda, Z. S. (1994a): Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *J. Lipid. Res.* **35**: 524-534.

Derewenda, U., Swenson, L., Wei, Y., Dodson, G. G., Yamaguchi, S., Haas, M. J., Derewenda, Z. S. (1994b): An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. *Nat. Struct. Biol.* **1**: 36-47.

DeSantis, G., Liu, J., Clark, D. P., Heine, A., Wilson, I. A., Wong, C. H. (2003): Structure-based mutagenesis approaches toward expanding the substrate specificity of 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase. *Bioorg. Med. Chem.* **11**: 43-52.

Detry, J., Rosenbaum, T., Luetz, S., Hahn, D., Jaeger, K.-E., Mueller, M., Eggert, T. (2006): Biocatalytic production of enantiopure cyclohexane-trans-1,2-diol using extracellular lipases from *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 1107-1116.

Drepper, T., Eggert, T., Hummel, W., Leggewie, C., Pohl, M., Rosenau, F., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. (2006): Novel biocatalysts for white biotechnology. *Biotechnol. J.* **1**: 777-786.

Dröge, M. J., Boersma, Y. L., van Pouderooyen, G., Vrenken, T. E., Rüggeberg, C. J., Reetz, M. T., Dijkstra, B. W., Quax, W. J. (2006): Directed evolution of *Bacillus subtilis* lipase A by use of enantiomeric phosphonate inhibitors: crystal structures and phage display selection. *Chembiochem* **7**: 149-157.

Dwyer, M. A., Looger, L. L., Hellinga, H. W. (2004): Computational design of a biologically active enzyme. *Science* **304**: 1967-1971.

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

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

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.

Eggert, T., Leggewie, C., Puls, M., Streit, W., van Pouderooyen, G., Dijkstra, B. W., Jaeger, K.-E. (2004): Novel biocatalysts by identification and design. *Biocatal. Biotrans.* **22**: 139-144.

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

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

Eigen, M. (1971): Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**: 465-523.

- Eigen, M. (1984):** The origin and evolution of life at molecular level. *Adv. Chem. Phys.* **55**: 119-137.
- Eigen, M. (1986):** The physics of molecular evolution. *Chem. Scr.* **26B**: 13-26.
- Eigen, M., McCaskill, J., Schuster, P. (1989):** The molecular quasispecies. *Adv. Chem. Phys.* **75**: 149-263.
- Ernst&Young (2007):** Beyond Borders: Global Biotechnology Report 2007. Ernst&Young, Boston, Massachusetts.
- EuropaBio (2003):** White Biotechnology: Gateway to a more sustainable future. *EuropaBio*.
- Farinas, E. T. (2006):** Fluorescence activated cell sorting for enzymatic activity. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **9**: 321-328.
- Festel, G., Knöll, J., Götz, H. (2004):** Weiße Biotechnologie - Chemikalien aus dem Fermenter. *Nachr. Chem.* **52**: 166-167.
- Fischer, M., Thai, Q. K., Grieb, M., Pleiss, J. (2006):** DWARF - a data warehouse system for analyzing protein families. *BMC Bioinformatics* **7**: 495 (online).
- Foloppe, N., MacKerell, A. D. (2000):** All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J. Comput. Chem.* **21**: 86-104.
- Fujii, R., Kitaoka, M., Hayashi, K. (2004):** One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res.* **32**: e145.
- Funke, S. A. (2004):** Optimierung einer Lipase aus *Bacillus subtilis* mit neuen Methoden der gerichteten Evolution. *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Duesseldorf.
- Funke, S. A., Eipper, A., Reetz, M. T., Otte, N., Thiel, W., Van Pouderoyen, G., Dijkstra, B. W., Jaeger, K.-E., Eggert, T. (2003):** Directed evolution of an enantioselective *Bacillus subtilis* lipase. *Biocatal. Biotrans.* **21**: 67-73.
- Funke, S. A., Otte, N., Eggert, T., Bocola, M., Jaeger, K.-E., Thiel, W. (2005):** Combination of computational prescreening and experimental library construction can accelerate enzyme optimization by directed evolution. *Protein Eng. Des. Sel.* **18**: 509-514.
- Gadler, P., Glueck, S. M., Kroutil, W., Nestl, B. M., Larissegger-Schnell, B., Ueberbacher, B. T., Wallner, S. R., Faber, K. (2006):** Biocatalytic approaches for the quantitative production of single stereoisomers from racemates. *Biochem. Soc. Trans.* **34**: 296-300.
- Garcia-Urdiales, E., Alfonso, I., Gotor, V. (2005):** Enantioselective enzymatic desymmetrizations in organic synthesis. *Chem. Rev.* **105**: 313-354.
- Georgescu, R., Bandara, G., Sun, L. (2003):** Saturation mutagenesis. In: Arnold, F. H. and Georgiou, G. (Hrsg.): Directed evolution library creation. Methods and protocols. Auflage, *Humana Press*, New Jersey.
- Gerber, P. R., Müller, K. (1995):** MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **9**: 251-268.
- Ghanem, A. (2007):** Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **63**: 1721-1754.
- Gibrat, J.-F., Madej, T., Bryant, S. H. (1996):** Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**.
- Goddard, J. P., Reymond, J. L. (2004):** Enzyme assays for high-throughput screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 314-322.
- Gotor-Fernandez, V., Brieva, R., Gotor, V. (2006):** Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **40**: 111-120.
- Greener, A., Callahan, M., Jerpseth, B. (1996):** An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. In: Trower, M. K. (Hrsg.): In vitro mutagenesis protocols. Auflage, *Humana Press*, New Jersey.
- Gribbs, M. D., Nevalainen, K. M., Bergquist, P. L. (2001):** Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene* **271**: 13-21.
- Griffith, J. S., Cherian, M., Corbell, J. B., Pocivavsek, L., Fierke, C. A., Toone, E. J. (2004):** A bacterial selection for the directed evolution of pyruvate aldolases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**: 4067-4074.
- Grochulski, P., Bouthillier, F., Kazlauskas, R. J., Serreqi, A. N., Schrag, J. D., Ziomek, E., Cygler, M. (1994a):** Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry* **33**: 3494-3500.

- Grochulski, P., Li, H., Schrag, J. D., Cygler, M. (1994b):** Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **268**: 12843-12847.
- Gubler, R. (2007):** Subsidies and regulations keep biodiesel markets growing. *Ind. Biotechnol.* **3**: 22-24.
- Gupta, N., Roy, I. (2004):** Enzymes in organic media. Forms, functions and applications. *Eur. J. Biochem.* **271**: 2575-2583.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004):** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 763-781.
- Halimi, H., De Caro, J., Carriere, F., De Caro, A. (2005):** Closed and open conformations of the lid domain induce different patterns of human pancreatic lipase antigenicity and immunogenicity. *Biochim. Biophys. Acta* **1753**: 247-256.
- Hecht, M. H., Aditi, D., Go, A., Bradley, L. H., Wei, Y. (2004):** *De novo* proteins from designed combinatorial libraries. *Protein Sci.* **13**: 1711-1723.
- Hecht, M. H., Richardson, J. S., Richardson, D. C., Ogden, R. C. (1990):** *De novo* design, expression and characterization of Felix: a four-helix bundle protein of native-like sequence. *Science* **249**: 884-891.
- Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C., Ollis, D. (1999):** A barn of owls and bankers: a lush variety of α/β -hydrolases. *Structure* **7**: 141-146.
- Hermann, R., Lehmann, M., Büchs, J. (2003):** Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates. *Biotechnol. Bioeng.* **81**: 178-186.
- Herrera, S. (2004):** Industrial biotechnology - a chance at redemption. *Nat. Biotechnol.* **22**: 671-675.
- Hibbert, E. G., Baganz, F., Hailes, H. C., Ward, J. M., Lye, G. J., Woodley, J. M., Dalby, P. A. (2005):** Directed evolution of biocatalytic processes. *Biomol. Eng.* **22**: 11-19.
- Hibbert, E. G., Dalby, P. A. (2005):** Directed evolution strategies for improved enzymatic performance. *Microb. Cell Fact.* **4**: e29 (online).
- Hilvert, D. (2000):** Critical analysis of antibody catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 751-793.
- Hiraga, K., Arnold, F. H. (2003):** General method for sequence independent site-directed chimeragenesis. *J. Mol. Biol.* **330**: 287-296.
- Hjorth, A., Carriere, F., Cudrey, C., Wöldike, H., Boel, E., Lawson, D. M., Ferrato, F., Cambillau, C., Dodson, G. G., Thim, L., Verger, R. (1993):** A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase. *Biochemistry* **32**: 4702-4707.
- Holm, L., Sander, C. (1993):** Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **233**: 123-138.
- Holwerda, K., Verkade, P. E., de Willigen, A. H. A. (1936):** Vergleichende Untersuchungen über die Verseifungsgeschwindigkeit einiger einsäuriger Triglyceride unter Einfluß von Pankreasextrakt. *Rec. Trav. Chim. Pays Bas* **55**: 43-57.
- Hotelier, R., Ludovic, R., Cousin, X., Negre, V., Marchot, P., Chatonnet, A. (2004):** ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Res.* **32**: 145-147.
- Hughes, M. D., Nagel, D. A., Santos, A. F., Sutherland, A. J., Hine, A. V. (2003):** Removing the redundancy from randomised gene libraries. *J. Mol. Biol.* **331**: 973-979.
- IUBMB (1992):** Enzyme Nomenclature. Auflage, Academic Press, San Diego, California.
- Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. (1999):** Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional 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., Eipper, A., Reetz, M. T. (2001):** Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 519-530.
- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Koch, H. B., Ferrato, F., Dijkstra, B. W. (1993):** Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J.* **332**: 143-149.
- Jaeger, K.-E., Reetz, M. T. (2000):** Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**: 68-73.
- Johannes, T. J., Zhao, H. (2006):** Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 261-267.

- Kadereit, D., Waldmann, H. (2001):** Enzymatic protection group techniques. *Chem. Rev.* **101**: 3367-3396.
- Kaftzik, N., Eckstein, M., Krockel, J., Kragl, U. (2002):** Ionic liquids as novel solvents for enzyme catalysis. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* **224**: 627-627.
- Kamtekar, S., Schiffer, J. M., Xiong, H., Babik, J. M., Hecht, M. H. (1993):** Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science* **262**: 1680-1685.
- Kang, H. (2006):** MELDB: A database for microbial esterases and lipases. *FEBS Lett.* **580**: 2736-2740.
- Kashiwagi, K., Isogai, Y., Nishiguchi, K., Shiba, K. (2006):** Frame shuffling: a novel method for in vitro protein evolution. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**: 145-150.
- Kaur, J., Sharma, R. (2006):** Directed evolution: an approach to engineer enzymes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **26**: 165-199.
- Kazlauskas, R. J., Bornscheuer, U. T. (1998):** Biotransformations with lipases. Auflage, Wiley, Weinheim-New York.
- Kensy, F., Zimmermann, H. F., Knabben, I., Anderlei, T., Trauthwein, H., Dingerdissen, U., Büchs, J. (2005):** Oxygen transfer phenomena in 48-well microtiter plates: determination by optical monitoring of sulfite oxidation and verification by real-time measurement during microbial growth. *Biotechnol. Bioeng.* **89**: 698-708.
- Kikuchi, M., Ohnishi, K., Harayama, S. (1999):** Novel family shuffling methods for the in vitro evolution of enzymes. *Gene* **236**: 156-167.
- Kirchoff, G. S. C. (1811):** *Mem. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg* **4**: 27.
- Kitamura, K., Kinoshita, Y., Narasaki, S., Nemoto, N., Husimi, Y., Nishigaki, K. (2002):** Construction of block-shuffled libraries of DNA for evolutionary protein engineering: Y-ligation-based block shuffling. *Protein Eng.* **15**: 843-853.
- Klibanov, A. M. (2001):** Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**: 241-246.
- Knarzycka-Bessler, M., Jaeger, K.-E. (2006):** Select the best: novel biocatalysts for industrial applications. *Trends Biotechnol.* **6**: 248-250.
- Koder, R. L., Dutton, P. L. (2006):** Intelligent design: the *de novo* engineering of proteins with specified functions. *Dalton Trans.* **25**: 3045-3051.
- Kouker, G., Jaeger, K.-E. (1987):** Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 211-213.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., Peterson, K. M. (1994):** pBBR1MCS - a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques* **16**: 800-802.
- Kragl, U., Eckstein, M., Kaftzik, N. (2002):** Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 565-571.
- Kumar, S., Wittmann, C., Heinzle, E. (2004):** Minibioreactors. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1-10.
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lang, D. A., Manesse, M. L. M., de Haas, G. H., Verheij, H. M., Dijkstra, B. W. (1998):** Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur. J. Biochem.* **254**: 333-340.
- Lawson, D. M., Brzozowski, A. M., Rety, S., Verma, C., Dodson, G. G. (1994):** Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through x-ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Eng.* **7**: 543-550.
- Lee, S. H., Choi, J. H., Xu, Z. (2003a):** Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol.* **21**: 45-52.
- Lee, S. H., Ryu, E. J., Kang, M. J., Wang, E.-S., Piao, Z., Choi, Y. J., Jung, K. H., Jeon, J. Y. J., Shin, Y. C. (2003b):** A new approach to directed gene evolution by recombined extension on truncated templates (RETT). *J. Mol. Catal. B Enzym.* **26**: 119-129.
- Lee, Y. F., Tawfik, D. S., Griffiths, A. D. (2002):** Investigation the target recognition of DNA cytosin-5 methyltransferase *HhaI* library selection using *in vitro* compartmentalization. *Nucleic Acids Res.* **30**: 4937-4944.
- Leisola, M., Turunen, O. (2007):** Protein engineering: opportunities and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press).
- Leopoldseeder, S., Claren, J., Jürgens, C., Sterner, R. (2004):** Interconverting the Catalytic Activities of ($\beta\alpha$)₈-barrel Enzymes from Different Metabolic Pathways: Sequence Requirements and Molecular Analysis. *J. Mol. Biol.* **337**: 871-879.
- Lesuisse, E., Schanck, K., Colson, C. (1993):** Purification and preliminary characterization of an extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an

- extreme basic pH tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **216**: 155-160.
- Liebeton, K. (1999)**: Struktur/ Funktions-Beziehungen der Lipase von *Pseudomonas aeruginosa*. *Dissertation*, Ruhr-Universität Bochum.
- Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T., Jaeger, K.-E. (2000)**: Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem. Biol.* **7**: 709-718.
- Lindhorst, T. K. (2006)**: Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. 3. Auflage, *Wiley-VCH*, Weinheim.
- Longhi, S., Cambillau, C. (1999)**: Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**: 185-196.
- Longhi, S., Mannesse, M. L. M., Verheij, H. M., De Haas, G. H., Egmond, M. R., Knoops-Mouthuy, E., Cambillau, C. (1997)**: Crystal structure of cutinase inhibited by a triglyceride analogue. *Protein Sci.* **6**: 275-286.
- Louwrier, A., Drtina, G. J., Klibanov, A. M. (1996)**: On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 1-5.
- Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G. L., Maranas, C. D., Benkovic, S. C. (2001)**: Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 11248-11253.
- Lutz, S., Patrick, W. M. (2004)**: Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 291-297.
- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellot, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Mchinnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M. (1998)**: All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**: 3586-3616.
- Madej, T., Gibrat, J.-F., Bryant, S. H. (1995)**: Threading a database of protein cores. *Protein Struct. Funct. Genet.* **23**: 356-369.
- Mills, D. R., Peterson, R. L., Spiegelmann, S. (1967)**: An extracellular darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**: 217-224.
- Miyazaki, K. (2002)**: Random DNA fragmentation with endonuclease V: application to DNA shuffling. *Nucleic Acids Res.* **30**: e139 (online).
- Miyazaki, K. (2003)**: Creating random mutagenesis libraries by megaprimer PCR of whole plasmid (MEGAWHOP). *Methods Mol. Biol.* **231**: 23-28.
- Miyazaki, K., Arnold, F. H. (1999)**: Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function. *J. Mol. Evol.* **49**: 716-720.
- Moffat, B. A., Studier, F. W. (1986)**: Use of bacteriophage T7 RNA-polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Müller, K. M., Stebel, S. C., Knall, S., Zipf, G., Bernauer, A. S., Arndt, K. M. (2005)**: Nucleotide exchange and excision technology (NExT) DNA shuffling: a robust method for DNA fragmentation and directed evolution. *Nucleic Acids Res.* **33**: 117.
- Murakami, H., Hohsaka, T., Sisido, M. (2002)**: Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nat. Biotechnol.* **20**: 76-81.
- Murakami, H., Hohsaka, T., Sisido, M. (2003)**: Random insertion and deletion mutagenesis. *Methods Mol. Biol.* **231**: 64.
- Murphy, P. V., Rutledge, P. J. (2007)**: Symbiosis in chemistry and biology. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 59-62.
- Nardini, M., Dijkstra, B. W. (1999)**: Alpha/beta-hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**: 732-737.
- Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W. (2000)**: Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation - the prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* **275**: 31219-31225.
- 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.
- Nguyen, A. W., Daugherty, P. S. (2003)**: Directed evolution library creation: Methods and protocols. *Methods Mol. Biol.* **231**: 39-44.

- O'Maille, P. E., Bakhtina, M., Tsai, M. D. (2002):** Structure-based combinatorial protein engineering (SCOPE). *J. Mol. Biol.* **321**: 677-691.
- Ollis, D. L., Goldman, A. (1992):** The alpha/beta-Hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**: 197-211.
- 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 combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat. Biotechnol.* **17**: 1205-1209
- Otten, L. G., Quax, W. J. (2005):** Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol. Eng.* **22**: 1-9.
- Parikh, M., Greene, D. N., Woods, K. K., Matsumura, I. (2006):** Directed evolution of RuBisCO hypermorphs through genetic selection in engineered *E. coli*. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**: 113-119.
- Park, H.-S., Nam, S. H., Lee, J. K., Yoon, C. N., Mannervik, B., Benkovic, S. J., Kim, H.-S. (2006):** Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold. *Science* **311**: 535-538.
- Patel, R. N. (2001):** Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. *Adv. Synth. Catal.* **343**: 527-546.
- Patel, R. N. (2006):** Biocatalysis: Synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Curr. Org. Chem.* **10**: 1289-1321.
- Pathak, T., Waldmann, H. (1998):** Enzymes in protecting group chemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**: 112-120.
- Patrick, W. M., Firth, A. E., Blackburn, J. M. (2003):** User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein Eng.* **16**: 451-457.
- Pavelites, J. J., Gao, J., Bash, A. D., MacKerell, A. D. (1997):** Molecular mechanics force field for NAD⁺, NADH and the pyrophosphate groups of nucleotides. *J. Comput. Chem.* **1997**: 221-239.
- Payen, A., Persoz, J. F. (1833):** Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses reactions et leurs applications aux artes industriels. *Ann. Chim. Phys.* **53**: 73-92.
- Perlitz, U. (2007):** Weiße Biotechnologie. *Deutsche Bank Research*, Frankfurt am Main.
- Peterson, G. L. (1977):** A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346-356.
- Petrounia, I. P., Arnold, F. H. (2000):** Designed evolution of enzymatic properties. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 325-330.
- Pikkemaat, M. G., Janssen, D. B. (2002):** Generating segmental mutations in haloalkane dehalogenase: a novel part in the directed evolution toolbox. *Nucleic Acids Res.* **30**: e35 (online).
- Polizzi, K. M., Parikh, M., Spencer, C. U., Matsumura, I., Lee, J. H., Realf, M. J., Bommarius, A. S. (2006):** Pooling for improved screening of combinatorial libraries for directed evolution. *Biotechnol. Prog.* **22**: 961-967.
- Polizzi, K. M., Spencer, C. U., Dubey, A., Matsumura, I., Lee, J. H., Realf, M. J., Bommarius, A. S. (2005):** Simulation modeling of pooling for combinatorial protein engineering. *Journal of Biomolecular Screening* 856-864.
- Pollard, D. J., Woodley, J. M. (2007):** Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol.* **25**: 66-73.
- Qian, Z., Fields, C. J., Yu, Y., Lutz, S. (2007):** Recent progress in engineering alpha/beta hydrolase-fold family members. *Biotechnol. J.* **2**: 192-200.
- Qiang, W., Qiuyn, L., Gang, L., Baojian, L. (2004):** A novel method of DNA shuffling without PCR process. *Chin. Sci. Bull.* **49**: 7689-7691.
- Rajakumara, E., Acharya, P., Ahmad, S., Shanmugam, V. M., Rao, N. M., Sankaranarayanan, R. (2003):** Crystallization and preliminary x-ray-crystallographic investigations on several thermostable forms of a *Bacillus subtilis* lipase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**: 160-162.
- Reetz, M. T. (2001):** Directed evolution of an enantioselective enzyme through combinatorial multiple-cassette mutagenesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 3589-3591.
- Reetz, M. T. (2002):** Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**: 145-150.
- 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. (2006):** Directed evolution of enzymes for asymmetric syntheses. In: Christmann, M. and Bräse, S. (Hrsg.): *Asymmetric Synthesis - The Essentials*. 1. Auflage, *Wiley-VCH*, Weinheim.
- Reetz, M. T., Becker, M. H., Klein, H.-W., Stöckigt, D. (1999):** A method for high-throughput screening of enantioselective catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**: 1758-1761.
- Reetz, M. T., Bocola, M., Carballeira, J. D., Zha, D., Vogel, A. (2005):** Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: Combinatorial active-site saturation test. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**: 4192-4196.
- Reetz, M. T., Carballeira, J. D. (2007):** Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature Protocols* **2**: 891-903.
- Reetz, M. T., Carballeira, J. D., Peyralans, J., Maichele, A., Vogel, A. (2006a):** Expanding the substrate scope of enzymes: combining mutations obtained by CASTing. *Angew. Chem. Int. Ed.* **12**: 6031-6038.
- Reetz, M. T., Carballeira, J. D., Vogel, A. (2006b):** Iterative saturation mutagenesis on the basis of B-factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**: 7745-7751.
- 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**: 106-112.
- Reetz, M. T., Wang, L. W., Bocola, M. (2006c):** Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**: 1236-1241.
- Reetz, M. T., Zonta, A., Schimossek, K., Liebeton, K., Jaeger, K.-E. (1997):** Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by *in vitro* evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **36**: 2830-2832.
- Renault, L., Negre, V., Hotelier, R., Cousin, X., Marchot, P., Chatonnet, A. (2005):** New friendly tools for users of ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins. *Chem. Biol. Interact.* **157-158**: 339-343.
- Reymond, J. L., Babiak, P. (2007):** Screening systems. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **105**: 31-58.
- Riese, J. (2003):** Surfing the third wave: new value chain creation opportunities in industrial biotechnology. Auflage, *McKinsey & Company*, Frankfurt (Deutschland).
- 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.
- Rosenau, F., Tommassen, J., Jaeger, K.-E. (2004):** Lipase-specific foldases. *Chembiochem* **5**: 152-161.
- Rouhi, A. M. (2003):** Chiral business. *Chem. Eng. News* **81**: 45-55.
- Routenberg Love, K., Swoboda, J. G., Noren, C. J., Walker, S. (2006):** Enabling glycosyltransferase evolution: a facile substrate-attachment strategy for phage-display enzyme evolution. *Chembiochem* **7**: 753-756.
- Rowe, L. A., L. e. M., alexander, O. B., Matsumura, I. (2003):** A comparison of directed evolution approaches using the beta-glucuronidase model system. *J. Mol. Biol.* **332**: 851-860.
- Sakai, T., Liu, Y., Ohta, H., Korenaga, T., Ema, T. (2005):** Lipase-catalyzed resolution of (*2R**,*3S**)- and (*2R**,*3R**)-3-methyl-3-phenyl-2-aziridinemethanol at low temperatures and determination of the absolute configurations of the four stereoisomers. *J. Org. Chem.* **70**: 1369-1375.
- Samuelson, P., Gunneriusson, E., Nygren, P. A., Stahl, S. (2002):** Display of proteins on bacteria. *J. Biotechnol.* **96**: 129-154.
- Sarda, L., Desnuelle, P. (1958):** Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta* **30**: 513-521.
- Sarkar, G., Sommer, S. S. (1990):** The "Megaprimer" method of site directed mutagenesis. *BioTechniques* **8**: 404-407.
- Schmeisser, C., Steele, H., Streit, W. (2007):** Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 955-962.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001):** Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**: 258-268.
- Schmid, R. D. (2006):** Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. 2. Auflage, *Wiley VCH*, Weinheim.

- Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., McNeill, G. P., Schmid, R. D. (1999):** Highly selective synthesis of 1,3-oleoyl-2-palmitoylglycerol by lipase catalysis. *Biotechnol. Bioeng.* **64**: 678-684.
- Schmitt, J., Brocca, S., Schmid, R. D., Pleiss, J. (2002):** Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity. *Protein Eng. Des. Sel.* **15**: 595-601.
- Schneidinger, B. (1997):** Überexpression und transkriptionelle Regulation des Lipaseoperons von *Pseudomonas aeruginosa* und funktionelle Charakterisierung der Lipase-spezifischen Foldase LipH. *Dissertation*, Ruhr-Universität Bochum.
- Schönheyder, F., Volqvartz, K. (1945):** On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. *Acta Physiologica Scandinavica* **9**: 57-67.
- Sengupta, D., Lin, H., Goldberg, S. D., Mahal, J. J., Cornish, V. W. (2004):** Correlation between catalytic efficiency and the transcription read-out in chemical complementation: a general assay for enzyme catalysis. *Biochemistry* **43**: 3570-3581.
- Shao, Z., Zhao, H., Giver, L., Arnold, F. H. (1998):** Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* **26**: 681-683.
- Sieber, V., Martinez, C. A., Arnold, F. H. (2001):** Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat. Biotechnol.* **19**: 456-460.
- Song, J. K., Chung, B., Oh, Y. K., Rhee, J. S. (2002):** Construction of DNA-shuffled and incrementally truncated libraries by a mutagenic and unidirectional reassembly method: changing from a substrate specificity of phospholipase to that of a lipase. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 6146-6151.
- Stebel, S. C., Arndt, K. M., Müller, K. M. (2007):** Versatile DNA fragmentation and directed evolution with nucleotide exchange and excision technology. *Methods Mol. Biol.* **352**: 167-190.
- Stemmer, W. P. C. (1994a):** DNA-shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10747-10751.
- Stemmer, W. P. C. (1994b):** Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391.
- Sterner, R., Schmid, F. X. (2004):** *De novo* design of an enzyme. *Science* **304**: 1916-1917.
- Straathof, A. J. J., Panke, S., Schmid, A. (2002):** The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 548-556.
- Strobel, H., Ladant, D., Jestin, J. L. (2003):** *In vitro* selection for enzymatic activity: a model study using adenylate-cyclase. *J. Mol. Biol.* **332**: 1-7.
- Strong, M. (1999):** FDA policy and regulation of stereoisomers: Paradigm shift and the future of safer, more effective drugs. *Food Drug Law J.* **54**: 463-487.
- Stuer, W., Jaeger, K.-E., Winkler, U. K. (1986):** Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **168**: 1070-1074.
- Tawfik, D. S., Griffiths, A. D. (1998):** Man-made cell like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.* **16**: 652-656.
- Taylor, S. V., Walter, K. U., Kast, P., Hilvert, D. (2001):** Searching sequence space for protein catalysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 10596-10601.
- Thirstrup, K., Verger, R., Carrière, F. (1994):** Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. *Biochemistry* **33**: 2748-2756.
- Tindall, K. R., Kunkel, T. A. (1988):** Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-6013.
- Tsuji, T., Onimaru, M., Yanagawa, H. (2006):** Towards the creation of novel proteins by block shuffling. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **9**: 259-269.
- Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S., Jones, T. A. (1994):** The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2**: 293-308.
- van Oort, M. G., Debeer, A. M. T. J., Dikman, R., Leuveling Tjeenk, M., Verheij, H. M., de Haas, G. H., Wenzig, E., Götz, F. (1989):** Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* **28**: 9278-9285.
- van Pouderooyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W. (2001):** The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* **309**: 215-226.

- van Sint Fiet, S., van Beilen, J. B., Witholt, B. (2006): Selection of biocatalysts for chemical synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 1693-1698.
- van Tilbeurgh, H., Egloff, M.-P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. (1993): Interfacial activation of the lipase-pro-colipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* **362**: 814-820.
- Verger, R., De Haas, G. H., Sarda, L., Desnuelle, P. (1969): Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **188**: 272-282.
- Verscheuren, K. H. G., Seljée, F., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., W., D. B. (1993): Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature* **363**: 693-698.
- Wang, T. W., Zhu, H., Ma, X. Y., Zhang, T., Ma, Y. S., Wei, D. Z. (2006): Mutant library construction in directed molecular evolution: casting a wider net. *Mol. Biotechnol.* **34**: 55-68.
- Watson, A. A., Alm, R. A., Mattick, J. S. (1996): Construction of improved vectors for protein production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **172**: 163-164.
- West, M. W., Hecht, M. H. (1995): Binary patterning of polar and nonpolar amino-acids in the sequences and structures of native proteins. *Protein Sci.* **4**: 2032-2039.
- West, M. W., Wang, W. X., Patterson, J., Mancias, J. D., Beasley, J. R., Hecht, M. H. (1999): *De novo* amyloid proteins from designed combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 11211-11216.
- Wierenga, R. K. (2001): The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.* **492**: 193-198.
- Wilhelm, S., Rosenau, F., Becker, S., Buest, S., Hausmann, S., Kolmar, H., Jaeger, K.-E. (2007): Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chembiochem* **8**: 55-60.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A., Hunziker, W. (1990): Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**: 771-774.
- 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.
- Wohlfarth, 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.
- Wolfson, H. J., Shatsky, M., Schneidman-Duhovny, D., Dror, O., Shulman-Peleg, A., Ma, B. Y., Nussinov, R. (2005): From structure to function: methods and applications. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **6**: 171-183.
- Wong, J., Tee, K. L., Hauer, B., Schwaneberg, U. (2004): Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* **32**: e26 (online).
- Wong, T. S., Zhurina, D., Schwaneberg, U. (2006): The diversity challenge in directed protein evolution. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **9**: 271-288.
- Woolley, P., Petersen, S. B. (1994): Lipases. 1. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge.
- Woycechowsky, K. J., Hilvert, D. (2004): Deciphering enzymes - genetic selection as a probe of structure and mechanism. *Eur. J. Biochem.* **271**: 1630-1637.
- Woycechowsky, K. J., Vamvaca, K., Hilvert, D. (2007): Novel enzymes through evolution and design. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **75**: 241-294.
- Wright, S. (1932): The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. *Proc. sixth int. Congr. genet.*, **1**: 356-366.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yooseph, S., Sutton, G., Rusch, D. B., Halpern, A. L., Williamson, S. J. (2007): The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Expanding the Universe of Protein Families. *PLoS Biol.* **5**: 16.
- You, L., Arnold, F. H. (1996): Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng. Des. Sel.* **9**: 77-83.
- Zaccolo, M., Williams, D. M., Brown, D. M., Gheradi, E. (1996): An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. *J. Mol. Biol.* **255**: 589-603.
- Zha, D., Wilensek, S., Hermes, M., Jaeger, K.-E., Reetz, M. T. (2001): Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Chem. Commun.* **24**: 2664-2665.

Zhao, H., Arnold, F. H. (1997): Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res.* **25:** 1307-1208.

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

Zheng, L., Baumann, U., Reymond, J. L. (2004): An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32:** e115.

Zhou, Y. H., Zhang, X. P., Ebright, R. H. (1991): Random mutagenesis of gene-sized DNA-molecules by use of PCR with *Taq* DNA-polymerase. *Nucleic Acids Res.* **19:** 6052-6052.

8. Anhang:

8.1 Abb. 3.14: Teil 1 (vergrößert)

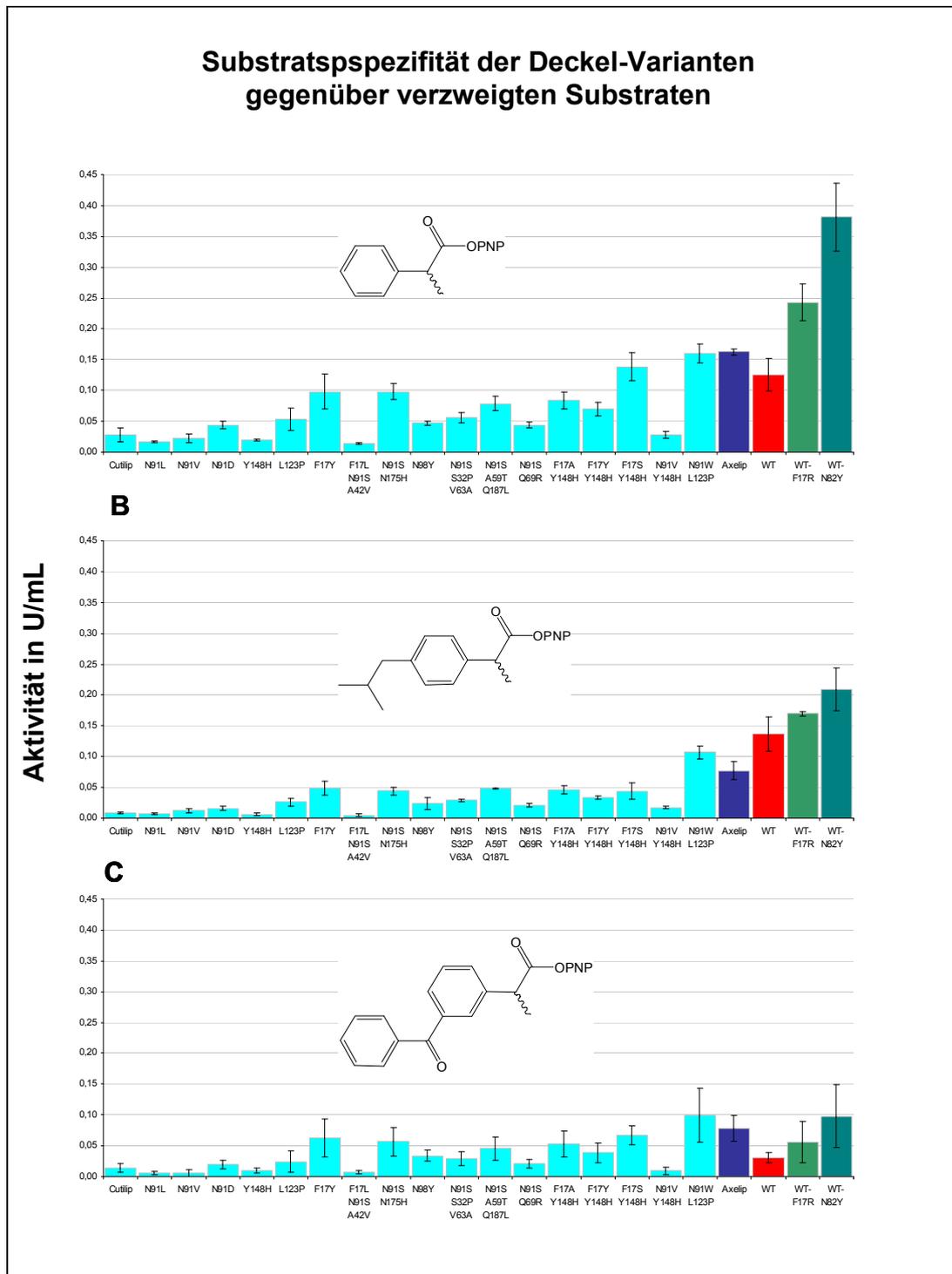
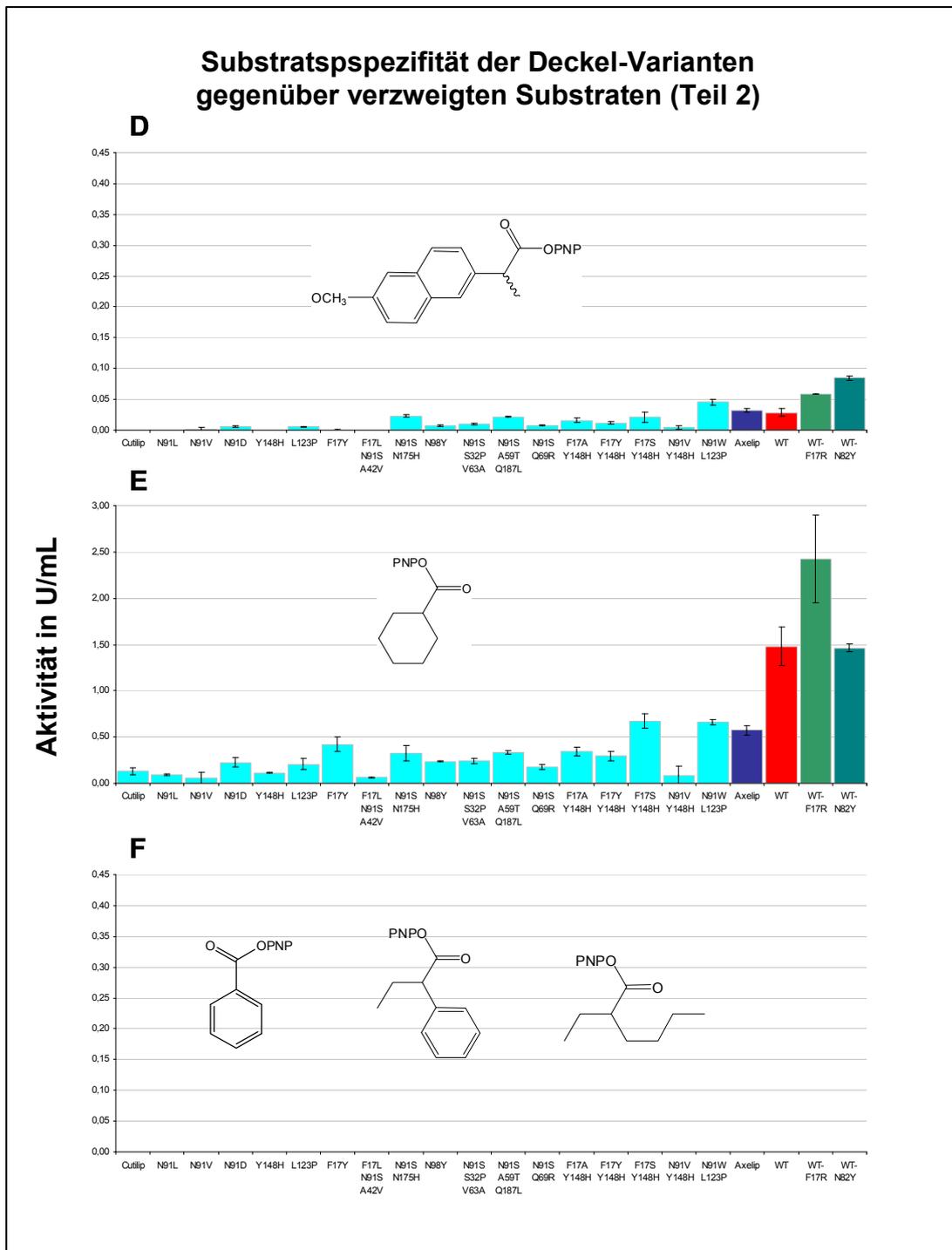


Abb. 3.14: Teil 2 (vergrößert)



8.2. Mathematische Formeln:

Formel zur Berechnung der lipolytischen Aktivität nach spektrophotometrischer Bestimmung mit dem Substrat *para*-Nitrophenylpalmitat:

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

Eine Lipaseeinheit U ist definiert als die Enzymmenge, die ein μmol *para*-Nitrophenylpalmitat in 1 min freisetzt. Daher gilt:

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

Formel zur Berechnung des *ee*-Wertes:

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

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

Formel zur Berechnung des *E*-Wertes:

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

wobei: c = Umsatz
 ee = *ee*-Wert

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.
Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen
Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 20. 8. 2007

Michael Puls

Stell Dir vor, es geht, und keiner kriegt's hin...

Wolfgang Neuss