

Entwicklung von α/β -Hydrolasen mit neuen biokatalytischen Fähigkeiten

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Eliane Bogo
aus Campinas, Brasilien

Jülich, Januar 2008

**Gedruckt mit Unterstützung des
Deutschen Akademischen Austauschdienstes
(DAAD)**

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

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

Referent: Prof. Dr. K.-E. Jäger

Koreferent: Prof. Dr. W. Hummel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2008

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir im Laufe der Anfertigung meiner Arbeit mit Rat und Tat geholfen haben und so zum Abschluss der Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jäger danke ich für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, das Interesse am Fortschritt meiner Arbeit, die immer freundliche Unterstützung und die sehr guten Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Werner Hummel danke ich für die große Hilfe bei allen Berichten und Gutachten für den DAAD sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn PD Dr. T. Eggert danke ich für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieser Promotionsarbeit, und für die kritische und aufmerksame Durchsicht des Manuskriptes. Ebenfalls danke ich Frau PD Dr. M. Pohl für ihre ständige Hilfsbereitschaft und wertvollen Anregungen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie danke ich für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima während meiner gesamten Promotionszeit. Besonders möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe „Gerichtete Evolution“ bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zu Seite gestanden und für eine lustige Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Mein besonderer Dank gilt hierbei Fabrizio Sibilla und Ismael Bustos-Jaimes, mit denen mir die Zusammenarbeit viel Freude bereitet hat.

Bei den fleißigen Korrektoren dieser Arbeit Jenny Andexer, Uli Krauss und Mark Bertram bedanke ich mich sehr herzlich für die schnelle Arbeit sowie kritische und hilfreiche Anmerkungen, ohne Ihre Hilfe wäre ich verloren.

Dem DAAD bin ich zum großen Dank verpflichtet für die finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglichte, diese Arbeit durchzuführen. Ich danke auch Frau Maria Salgado Martinez für die ausgezeichnete Betreuung, Hilfe und Verständnis die Überwindung von Problemen ermöglichten.

Ich bedanke mich ebenso bei allen Freunden, die meinen Aufenthalt in Jülich angenehm und unvergesslich gemacht haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die sehr wichtig für mich ist, für die Liebe, die sie mir trotz der Entfernung dauerhaft schenkt. Ohne sie wäre ich nie so weit gekommen.

Mein tiefster Dank geht an Fábio, dafür, dass er in guter und schlechter Zeit bei mir war, aber vor allem dafür, dass es ihn gibt.

Aber vor allem danke ich Gott.

Für meine Familie

Dedico esta tese com muito amor à minha adorada mãe, Lourdes, ao meu querido pai Sérgio e à minha amada irmã Cleise, mais que uma irmã, uma companheira e amiga para todas as horas. Sem eles não teria enfrentado o desafio de ir para uma terra estranha e distante, nem alçado vôo rumo ao desconhecido pelo simples desejo de saber, tornando assim reais meus mais loucos sonhos profissionais e pessoais.

Quid enim fortius desiderat anima quam veritatem?

Sancti Augustini

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XIII
Abkürzungsverzeichnis	XIV
1. Einleitung.....	1
1.1. Klassifizierung von Enzymen	2
1.2 α/β -Hydrolase Faltungsmotiv	3
1.2.1. Die katalytische Triade als Basis für verschiedene katalytische Umsetzungen	5
1.2.2 Lipasen.....	6
1.2.2.1 Katalytischer Mechanismus	8
1.2.2.2 Lipasen aus <i>Bacillus subtilis</i> als Modellenzyme	9
1.2.3 Epoxidhydrolasen.....	12
1.2.3.1 Katalytischer Mechanismus	13
1.2.3.2 Epoxidhydrolase aus <i>Aspergillus niger</i> als komplexes Modellenzym.....	15
1.3 Wie sind die vielfältigen Strukturen und Reaktionsmechanismen der Enzyme entstanden?	17
1.3.1 Konvergente und divergente Evolution als Erklärungsansätze zur Entstehung unterschiedlicher Proteinaktivitäten.....	17
1.3.2 Nebenaktivitäten können auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen sein.....	20
1.3.3 α/β -Hydrolasen als Beispiel für divergente Evolution und katalytische Promiskuität.....	22
1.4 Kann man eine Enzymaktivität im Labor in andere überführen?	23
1.4.1 Gerichtete Evolution	24
1.4.1.1 Die fehlerhafte PCR ist eine der Standardmethoden in der gerichteten Evolution	26
1.4.1.2 Screening und Selektion- „Survival of the fittest“	27
1.4.2 Rationales Proteindesign	31
1.5 Aufgabenstellung	32
2. Material und Methoden.....	35
2.1 Verwendete Chemikalien und Enzyme	35
2.2 Bakterienstamm und Plasmide	35
2.3 Oligonukleotide	37
2.4 Nährmedien	38

Inhaltsverzeichnis

2.5 Anzucht und Lagerung von Bakterien	40
2.6 Isolierung von DNA	40
2.7 Gelelektrophorese.....	41
2.8 In vitro Rekombination von DNA.....	41
2.9 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	41
2.9.1 Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	42
2.9.2 Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	42
2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
2.10.1 Standard-PCR-Reaktion.....	43
2.10.2 Fehlerhafte PCR („ <i>error prone PCR</i> “ epPCR).....	44
2.10.3 Ortsgerichtete Mutagenese	45
2.11 Sequenzierung von DNA	46
2.12 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	46
2.13 TCA-Fällung von Proteinen.....	46
2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.15 Nachweis und Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	47
2.15.1 Lipase/Esterase Assays	47
2.15.2 Protease Assays	48
2.15.3 Phospholipase Assays	48
2.15.4 Phosphatase-Assays.....	49
2.15.5 Peroxidase-Assays.....	50
2.15.6 Epoxidhydrolase Assays	50
2.15.7 Dehalogenase Assays.....	51
2.15.8 Selektivplatten testen	52
2.16 Spektrophotometrischer Nachweis von Lipase/Esterase Aktivität	53
2.17 Spektrophotometrischer Nachweis von Dehalogenase Aktivität.....	53
2.18 Spektrophotometrischer Nachweis von Epoxidhydrolase Aktivität	54
2.19 Spektrophotometrischer Nachweis von Phospholipase Aktivität	55
2.20 Hochdurchsatz-Testsystem für Lipase-katalysierte enantioselektive Esterhydrolysen	55
2.21 Epoxidhydrolase Filterpapier-assay	58
2.22 Computerprogramme und Online-Datenbanken	59
3. Ergebnisse und Diskussion	61
3.1. Hochdurchsatz-Testsysteme in der gerichteten Evolution	61
3.1.1 Überblick über die etablierten Testsysteme	61
3.1.2 Etablierte Selektions-Systeme	72

3.1.3 Ein Hochdurchsatz-Testsystem für Lipase-katalysierte enantioselektive Esterhydrolysen	78
3.1.3.1 Grundlagen der Detektions-Methodik	79
3.1.3.2 Anwendung des Enantioselektiven Lipase-Hochdurchsatz-Tests	82
3.1.4 Entwicklung eines Agarplatten-Assays für Epoxidhydrolasen	82
3.2 Gerichtete Evolution als Methode zur Veränderung von Enzymaktivitäten	85
3.2.1 Die Lipase A (BSLA) aus <i>B.subtilis</i> zeigt eine Phospholipase-Nebenaktivität	85
3.2.2 Die LipaseB (BSLB) aus <i>B.subtilis</i> besitzt keine Phospholipase-Aktivität	88
3.2.3 Screening einer Sättigungsmutagenesebank auf verschiedene Aktivitäten	89
3.2.4 „Feintuning“: epPCR zur Erzeugung zusätzlicher Diversität in der BSLA Sättigungsmutagenese-Bank	95
3.2.5. Wie lässt sich der Verlust der Phospholipase-Nebenaktivität begründen?	95
3.2.6. Ist gerichtete Evolution zur Generierung von promiskuitiven Aktivitäten geeignet?	101
3.3 Entwicklungen neuer Aktivitäten mittels rationalem Design	102
3.3.1. Die AnEH besitzt keine nachweisbaren promiskuitiven Aktivitäten.	102
3.3.2 Vergleich und Analyse der AnEH 3D-Struktur	103
3.3.3 Erzeugung der Punktmutation in der AnEH	110
3.3.4 Mittels der Kombination dreier Punktmutationen allein kann keine katalytische Promiskuität erzeugt werden.	111
3.3.5 Fehlerhafte PCR (epPCR) zur Erzeugung zusätzlicher genetischer Diversität	113
3.3.6. Ist der rationale Ansatz sinnvoller als randomisierte Methoden zur Erzeugung von neuen Aktivitäten?	114
4. Ausblick	115
5. Zusammenfassung	117
6. Summary	119
7. Literaturverzeichnis	121

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung des α/β -Hydrolase-Faltungsmotivs	5
Abb. 1.2: A. Interphasen-Aktivierung einer Lipase im Vergleich zur Esterase	7
Abb. 1.3: Reaktionsmechanismus der Esterhydrolyse einer Serin-Hydrolase	9
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der BSLA (PDB: 116W)	10
Abb. 1.5: Sequenzvergleich der BSLA und BSLB mit Lipasen aus <i>Bacillus pumilus</i> und <i>Bacillus licheniformis</i>	11
Abb. 1.6: Katalytischer Mechanismus der AnEH.	14
Abb. 1.7: Kristallstruktur und Topologie der AnEH (PDB: 1QO7).	15
Abb. 1.8: Sequenzvergleich der <i>A. niger</i> Epoxidhydrolase (AN_EH).....	16
Abb. 1.9: Entwicklung einer neuen Aktivität aus einer Nebenaktivität	19
Abb. 1.10: Schematische Darstellung des „new view“ Modells der Proteinfaltung.	22
Abb. 1.11: Schematische Darstellung der prinzipiellen Strategien welche in der gerichteten Evolution benutzt werden.	25
Abb. 1.12: Unterschiedliche Methoden zur Identifizierung von Varianten mit den gewünschten Enzymaktivitäten.....	28
Abb. 1.13: Schematische Darstellung der prinzipiellen Vorgehensweisen beim rationalen Proteindesign.	31
Abb. 2.1: Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese mit dem „Quikchange“ Protokoll.....	45
Abb. 2.2: Prinzip des NBP-Aktivitätstest.	54
Abb. 2.3: Ablauf des Enantioselektiven Lipase-Hochdurchsatz Screenings Assay.....	57
Abb. 2.4: Prinzip des EH Filterpapiertests.	58
Abb. 3.1: Qualitativer Nachweis lipolytischer Aktivität.	62
Abb. 3.2: Qualitativer Nachweis von proteolytischer Aktivität durch Abbau von Casein.....	64
Abb. 3.3: Nachweis von Phosphataseaktivität.	65
Abb. 3.4: Nachweis von Phospholipase Aktivität.	66

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.5: Nachweis der Peroxidaseaktivität.....	67
Abb. 3.6: Dehalogenase Aktivitäts tests auf pH-Indikatorplatten.	69
Abb. 3.7: Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität auf Safranin-O Agarplatten.	71
Abb. 3.8: Biokatalytische Umsetzungen durch EH.	73
Abb. 3.9: Selektions-Agarplattentests auf Epoxidhydrolase Aktivität.....	74
Abb. 3.10: Biokatalytische Umsetzungen durch Dehalogenasen.	75
Abb. 3.11: Selektions-Agarplattentests auf Dehalogenaseaktivität.....	76
Abb. 3.12: Biokatalytische Umsetzungen durch Amidase.	77
Abb. 3.13: Selektions-Agarplattentest auf Amidaseaktivität.....	78
Abb. 3.14: Prinzip des entwickelten kolorimetrischen Hochdurchsatz-Tests für die enantioselektive Bestimmung durch Lipasen gebildeten chiralen Alkoholen.....	80
Abb. 3.15: Fotografie einer 386er Mikrotiterplatte, in der der beschriebene Assay durchgeführt wurde.	81
Abb. 3.16: Epoxidhydrolase Reaktion mit <i>para</i> -Nitrostyroxid (<i>p</i> NSO).....	83
Abb. 3.17: Filterpapier-Test auf Epoxidhydrolaseaktivität.....	84
Abb. 3.18: Andere potenzielle EH Substrate, die im neu entwickelten Fluoreszenstest untersucht wurden.....	84
Abb. 3.19: Screening von BSLA auf verschiedenen Agarplattentests.	86
Abb. 3.20: Sequenzvergleich der BSLA mit anderen bakteriellen Lipasen mit Phospholipase Nebenaktivität.....	87
Abb. 3.21: Klärhofbildung auf Tributyrin-Platten und Eigelb-Platten durch die BSLA und die BSLB.....	89
Abb. 3.22: Beispiele für die verschiedenen Agarplatten-Tests.	91
Abb. 3.23: Aminosäurepositionen, die zu einem völligen Aktivitätsverlust führen.	93
Abb. 3.24: Auswahl an Agarplatten-Tests für das Screening auf verschiedene α/β -Hydrolase Aktivitäten.	94
Abb. 3.25: Lokalisierung der Mutationen, die zum Verlust der Phospholipaseaktivität führen.....	96
Abb. 3.26: Aminosäurepositionen deren Mutation häufig zu einem vollständigen Verlust der Phospholipase-Aktivität führt (hot-spots).	97
Abb. 3.27: Screening der AnEH auf verschiedene Aktivitäten.....	103

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.28: Strukturvergleich mittels VAST zur Identifizierung AnEH strukturhomologer Proteine.	104
Abb. 3.29: Strukturvergleich der Haloalkane Dehalogenase aus <i>X.</i> <i>autotrophicus</i> mit AnEH.	107
Abb. 3.30: Strukturvergleich BSLA mit AnEH.	107
Abb. 3.31: Strukturvergleich der AnEH-Varianten mit der Wildtyp-AnEH.	109
Abb. 3.32: Mutagenese-Strategie zur Erzeugung der AnEH Punktmutanten.	110
Abb. 3.33: Spektrophotometrischer Test der EH Einzel- Doppel- und Tripelmutaten auf verschiedene Aktivitäten.	112

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: EC-Klassifikation von Enzymen entsprechend ihrer katalytischen Funktion.....	2
Tab. 1.2: Enzyme mit α/β -Hydrolase Faltungsmotiv.....	4
Tab. 1.3: Beispiele für Prozesse, aus denen Nebenaktivitäten resultieren.....	20
Tab. 1.4: α/β -Hydrolasen mit katalytischer Promiskuität.....	23
Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Enzyme und Chemikalien.....	35
Tab. 2.2: Der verwendete Bakterienstamm.....	35
Tab. 2.3: Der verwendete Wildtyp-Bakterienstämme.....	36
Tab. 2.4: Übersicht der verwendeten Vektoren für <i>E. coli</i>	36
Tab. 2.5: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide.....	36
Tab. 2.6: Übersicht der für die verwendeten Oligonukleotide.....	38
Tab. 2.7: Experimentelle Bedingungen der epPCR zum zufälligen Basenaustausch.....	44
Tab. 3.1: Sequenzierung einiger BSLA-Varianten ohne Phospholipase-Aktivität.....	99
Tab. 3.2: Zu AnEH Strukturhomologe Enzyme.....	105
Tab. 3.3: AnEH Mutanten.....	111

Abkürzungsverzeichnis

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

A.dest → destilliertes Wasser

Abb. → Abbildung

ADH → Alkoholdehydrogenase

ADHs → Alkoholdehydrogenasen

Amp → Ampicillin

ATCC → *American Type Culture Collection*

BSA → Rinderserumalbumin

BSLA → *Bacillus subtilis* Lipase A

BSLB → *Bacillus subtilis* Esterase B

bp → Basenpaare

ca. → circa

CMC → Micellarkonzentration

Da → Dalton

DSMZ → Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

DMSO → Dimethylsulfoxid

DNA → Desoxyribonukleinsäure

dNTP → Desoxyribonukleosidtriphosphat

EC-Nummer → *Enzymatic Commission Number*

EDTA → Ethylendiamintetraessigsäure

ee → Enantiomerenüberschuss

epPCR → error-prone Polymerase Chain Reaction

EH → Epoxidhydrolase

AnEH → *Aspergillus niger* Epoxidhydrolase

mEH → mikrosomale Epoxidhydrolase

sEH → löslicher Epoxidehydrolase

GC → Gaschromatografie

HPLC → Hochdruckflüssigkeitschromatografie

IPTG → Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

Abkürzungsverzeichnis

INT → 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-Phenyl--2H-tetrazolium

kb → Kilobasen(paare)

kDa → Kilodalton

MS → Massenspektrometrie

M → Molar

nm → Nanometer

MTP → Mikrotiterplatte(n)

min → Minute(n), minütig

MMDB → *Molecular Modeling DataBase*

NADH → Nicotinamidadenosindinukleotid (reduzierte Form)

NAD → Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert Form)

OD → Optische Dichte

p.A. → *per analyse*

PAGE → Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR → Polymerasekettenreaktion

RT → Raumtemperatur

SDS → Natriumdodecylsulfat

T → Temperatur

Tab. → Tabelle

TBE → Tris-Borat-EDTA

TCA → Trichloressigsäure

Tris → Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

Tween → Polyoxyethylensorbitolmonolaurat

U → Unit

ÜN → Über Nacht

UpM → Umdrehungen pro Minute

v/v → Volumen pro Volumen

W → Watt

w/v → Gewicht pro Volumen

z.B. → zum Beispiel



1. Einleitung

Enzyme sind biologische Makromoleküle, die chemische Reaktionen katalysieren. Durch ihre Beteiligung an vielen Reaktionen spielen sie eine wichtige Rolle in allen lebenden Organismen. Diese reichen von biochemischen Verdauungsprozesse (Proteasen und Lipasen) bis zur Replikation der Erbinformation, z.B. durch DNA-Polymerasen ^[1].

Dabei arbeiten Enzyme nicht nur sehr effizient, sondern auch mit einer hohen Substratspezifität und Reaktionsselektivität. Im Laufe der Evolution haben sich die Enzyme immer weiter spezialisiert, um z.B. in Biosynthesewegen spezifische Aufgaben zu exakt definierten Zeitpunkten durchführen zu können ^[2].

Neben ihren natürlichen Funktionen im Organismus, sind Enzyme auch vom Menschen, seit Jahrtausenden, schon im alten China und Japan benutzt worden. Diese ursprüngliche Form der Biotechnologie beruhte meist auf Leistungen von Mikroorganismen, wie Bakterien und Hefen, die normalerweise verschiedene Enzyme (Proteasen, Lipasen, Esterasen, usw.) sekretieren. Beispiele hierfür sind die Erzeugung von Brot, alkoholischen Getränken und Milchprodukten ^[3].

Heute nimmt die industrielle Biotechnologie innerhalb der technischen Chemie eine immer wichtigere Rolle ein, wie aktuelle Zahlen belegen. So beträgt der weltweite Umsatz an Enzymen ca. 4 Milliarden Euro ^[4], bei einer jährlichen Wachstumsrate von 5 – 10%. Die Haupteinsatzgebiete für Enzyme sind Waschmittel, technische Prozesse (z.B. Spaltung von racemische Amininen in der Enantiomere durch Lipaseaktivität ^[5]) sowie die Herstellung von Lebens- und Futtermitteln. Neben Isomerasen, Oxidoreduktasen, Lyasen und Transferasen werden in industriellen Prozessen hauptsächlich Hydrolasen eingesetzt. Zu ihnen gehören biotechnologisch relevante Enzyme wie Lipasen, Esterasen, Amylasen, Proteasen, Nitrilasen und Amidasen ^[4].

Die Vorteile von Enzymen liegen neben der oben erwähnten Regioselektivität und Reaktionsselektivität vor allem in ihrer Enantioselektivität und ihrer Einsetzbarkeit unter mildern Reaktionsbedingungen (z.B. Temperatur oder pH-Wert).

Angesichts dieser heutigen Nutzung von Enzymen stieg das Interesse an der Untersuchung ihrer Aktivitäten und der katalysierten Reaktionen.

Einleitung

1.1. Klassifizierung von Enzymen

Um die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Enzymen besser zu verstehen, ist es notwendig, geeignete Systeme zu ihrer Einteilung zu entwickeln. Als eine mögliche logische Grundlage für diese Klassifizierung bieten sich die entsprechenden Reaktionsselektivitäten und Substratspezifitäten an. Ausgehend davon wurde das sogenannte EC-System entwickelt. In diesem System erhält jedes Enzym einen eindeutigen Klassifizierungscode, die EC-Nummer (*Enzymatic Commission Number*) und eine systematische Bezeichnung. Die erste Nummer gibt die Zugehörigkeit zu einer der sechs Hauptklassen an (Tab.1.1), in denen jeweils Enzyme ähnlicher Wirkungsspezifität zusammengefasst sind ^[6].

Tab. 1.1: EC-Klassifikation von Enzymen entsprechend ihrer katalytischen Funktion.

Enzym-Klasse	Subklassen	Reaktionstyp
1 Oxidoreduktasen	Dehydrogenasen Oxidasen Kinasen	Elektronentransfer zwischen zwei Substraten
2 Transferasen	Acetyl-, Methyl-, Aminotransferasen Polymerasen	Transfer von funktionelle Gruppen von einem Substrat auf ein anderes
3 Hydrolasen	Proteasen Esterasen Nukleasen Glucosidasen ATPasen	Hydrolytische Spaltung
4 Lyasen	Decarboxylasen Aldehydlyasen Hydrolyasen Synthasen	Abspaltung von Gruppen nach einem nicht-hydrolytischen Mechanismus
5 Isomerasen	Racemasen Epimerasen Isomerasen	Intramolekularer Transfer von Gruppen, ohne das sich die Bruttoformel des Substrates ändert
6 Ligasen	Synthetasen	Bildung von C-C-, C-N-, C-O oder C-S-Bindungen durch Kondensation unter Spaltung energiereicher Phosphatbindungen

Die weiteren Nummern stehen für detaillierte Angaben zu katalysierten Reaktion und sind mehr und mehr spezifisch für jedes einzelne Enzym. Dieses System berücksichtigt nicht strukturelle und evolutionäre Beziehungen sowie die

zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen der Enzyme. Dies führt dazu, dass z.B. strukturell nicht verwandte Enzyme, welche die gleiche Reaktion mittels unterschiedlicher Mechanismen katalysieren, unter Umständen die gleiche EC-Klassifikation erhalten, während Enzyme, die ähnliche Strukturen aufweisen und vergleichbare Mechanismen zur Katalyse unterschiedlicher Reaktionen verwenden, verschiedenen EC-Klassen zugeordnet werden können ^[7].

Eine andere Herangehensweise, um Enzyme zu klassifizieren, ist der Vergleich ihrer dreidimensionalen Strukturen. Heute sind über 47.000 Proteinstrukturen bekannt (www.pdb.org) ^[8], auf deren Basis eine solche Einteilung sinnvoll vorgenommen werden kann. Bei Proteinen ist die 3D-Struktur in der Evolution stärker konserviert als die Aminosäuresequenz, daher ist diese Form der Einteilung von Enzymen häufig mit ihrer evolutionären Geschichte verknüpft.

Dies erlaubt sowohl Rückschlüsse auf Struktur-Funktionsbeziehungen als auch auf Verwandtschaften zwischen Enzymen und somit ihre Klassifizierung. Unterschieden werden Familien (klare evolutive Verwandtschaft), Superfamilien (möglicher gemeinsamer evolutionärer Ursprung) und Faltungsmotive (Strukturen die gleich sind zwischen Familien und Superfamilien) ^[9, 10].

Ein gut untersuchtes Strukturmotiv stellt die α/β -Hydrolasefaltung dar, die das Grundgerüst vieler Hydrolasen (EC 3) ist und im Folgenden detailliert beschrieben wird.

1.2 α/β -Hydrolase Faltungsmotiv

Nach der Untersuchung der Proteinstrukturen von fünf verschiedenen Enzymen, die die Hydrolyse von unterschiedlichsten Substraten katalysieren ^[11]; einer Dienlacton Hydrolase ^[12], einer Haloalkan Dehalogenase ^[13], einer Serincarboxypeptidase II ^[14], einer Acetylcholinesterase ^[15] und einer Lipase ^[16] wurde erstmals das α/β -Hydrolase Faltungsmotiv beschrieben. Bis auf die Acetylcholinesterase und die Lipase (aus *Geotrichum candidum*) weisen die Enzyme keine Sequenzähnlichkeiten auf, die als Basis für die Vorhersage von ähnlichen Strukturen ausreichend wären ^[17]. Trotz des hohen Grades an struktureller Ähnlichkeit haben Enzyme innerhalb der α/β -Hydrolase-Superfamilie weniger als 10% Sequenzidentität ^[18]. Die Zahl der zu den α/β -Hydrolasen gehörenden Enzyme ist seit der ersten Beschreibung der

Einleitung

grundlegenden Struktur stetig gestiegen. Tab. 1.2 fasst die wichtigsten Vertreter und ihre Einordnung in das bereits beschriebene EC-System zusammen.

Tab. 1.2: Enzyme mit α/β -Hydrolase Faltungsmotiv.

EC-Nummer	Enzym	Reaktion
A. 3.1.1.1	Esterasen	Spaltung von kurzkettigen Estern
B. 3.1.1.3	Lipasen	Spaltung von langkettigen Estern
C. 3.1.1.x	Phospholipasen (A1, A2 und B)	Spaltung von Phospholipiden
D. 3.1.4.x	Phospholipasen (C und D)	
E. 3.1.3.x	Phosphatasen	Spaltung von Phosphorsäureestern
F. 3.3.x.x	Epoxidhydrasen	Hydrolyse von Epoxiden
G. 3.4.x.x	Proteasen	Hydrolyse von Peptidbindung
H. 3.8.x.x	Dehalogenasen	Spaltung von Kohlen-Halogenbindungen
I. 1.11.1.x	Peroxidasen	Substrat Oxidation mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Akzeptor
J. 4.2.1.x	Hydroxynitril-Lyasen	Spaltung von Cyanhydrinen

Ausgehend von Überlagerungen dieser fünf Strukturen wurden die konservierten Elemente dieses Faltungsmotivs beschrieben ^[11], die eines der ubiquitär vorkommenden, flexibelsten und vielseitigsten Strukturelemente der bekannten Enzymfaltungen ist ^[19]. Das Motiv lässt sich als Anordnung von acht, meist parallelen β -Faltblättern beschreiben. Eine Ausnahme bildet der zweite β -Strang, der antiparallel ausgerichtet ist. Diese β -Strukturen sind von α -Helices umgeben und bilden somit ein stabiles strukturelles Gerüst (Abb. 1.1).

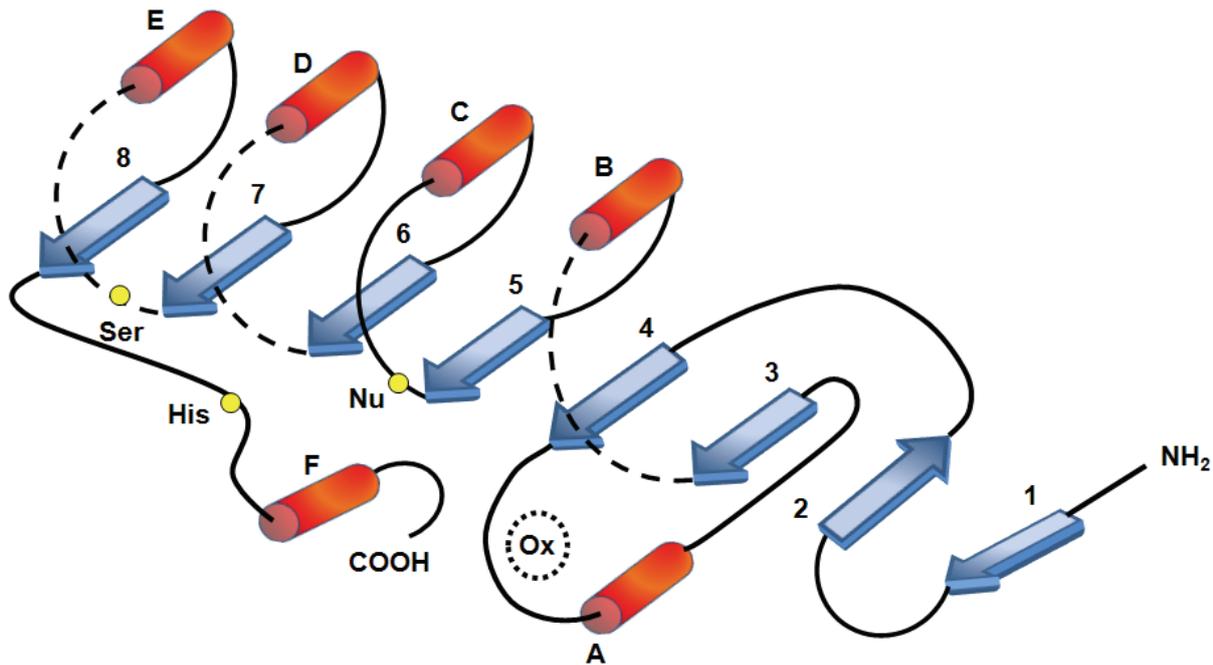


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des α/β -Hydrolase-Faltungsmotivs. α -Helices sind als rote Zylinder, β -Stränge als blaue Pfeile dargestellt und die Loops durch Linien gekennzeichnet. Die Aminosäurereste der katalytischen Triade sind als gelbe Punkte dargestellt. Ein weiteres Charakteristikum der α/β -Hydrolasefaltung stellt die Oxyanionentasche (Ox) dar, die eine Rolle bei der Substratstabilisierung und -umsetzung spielt und im Text anhand eines Beispiels (s. 1.2.2.2 und 1.2.3.2) näher erläutert wird.

Das oben beschriebene grundlegende Strukturmotiv kann bei den verschiedenen Enzymfamilien (z.B. Lipasen oder Epoxidhydrolasen) noch um für die jeweilige Enzymaktivität typische Strukturelemente erweitert werden. Ein besonders charakteristisches Strukturelement sind so genannte Deckelstrukturen (engl.: „lid“), die das aktive Zentrum von der Umgebung abtrennen.

1.2.1. Die katalytische Triade als Basis für verschiedene katalytische Umsetzungen

Kernstück eines jeden Enzyms ist das aktive Zentrum, an dem die eigentliche Umsetzung der Substrate stattfindet. Im Fall der α/β -Hydrolasen besteht es aus der sogenannten katalytischen Triade, die in das oben beschriebene Grundgerüst eingebettet ist. Generell setzt sich die katalytische Triade aus einer nukleophilen Aminosäure, einem Säurerest und einem konservierten Histidin zusammen. (Abb.1.1) Obwohl die grundsätzliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente eine gewisse Variabilität in der Anzahl der α -Helices und β -Faltblätter erlaubt, bleibt die zentrale Topologie des aktiven Zentrums erhalten. Das Vorhandensein von

Einleitung

katalytischen Triaden wurde ebenfalls für Serinproteasen (Trypsin, Papain und Subtilisin) beschrieben ^[20], die jedoch von den α/β -Hydrolasen anhand der Anordnung der katalytisch aktiven Aminosäuren unterschieden werden können ^[11].

Bei den α/β -Hydrolasen sind die Aminosäuren der katalytischen Triade variabler als bei den Proteasen, so wurde z.B ein Serin als nukleophile Aminosäure als essenziell für Serinproteasen und Cystein für Papain Familie beschrieben.

Für die Serinproteasen sind die Aminosäuren der katalytischen Triade in der Sequenz immer gleich angeordnet Ser-Asp/Glu-His. Das aktive Serin liegt in einem konservierten Pentapeptid Gly/Ala-X-Ser-X-Gly (x steht für eine beliebige Aminosäure; Ser ist das aktive Serin), welches stets eine exponierte Schleife zwischen β -Strang 5 und α -Helix C, den so genannten „*nucleophilie elbow*“ bildet.

In α/β -Hydrolasen wurden sowohl Serin und Cystein als auch Aspartat als Nukleophil identifiziert. Des Weiteren wurde für einzelne Vertreter der α/β -Hydrolasen erstmals ein Glutamat anstelle eines Aspartats als katalytische Säure beobachtet ^[15, 16].

Diese kleinen Unterschiede zwischen den aktiven Aminosäuren im aktiven Zentrum in einem sehr konservierten Gerüst sind die Basis für die verschiedenen katalytischen Mechanismen. Als Beispiele dieser Variabilität werden im Folgenden zwei verschiedene Enzymaktivitäten (Lipasen und Epoxidhydrolasen) näher beschrieben.

1.2.2 Lipasen

Zu den bekanntesten Enzymen aus der Familie der α/β -Hydrolasen gehören die Lipasen. Dies sind Enzyme, die Karbonsäureesterbindungen spalten. Mit den Esterasen und Phospholipasen werden sie zu den Triacylglycerolacylhydrolasen zusammengefasst (EC 3.1.1.3.), die in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen als zelluläre und extrazelluläre Proteine vorkommen. Lipasen heben sich von den Esterasen durch Unterschiede im Substratspektrum ab. Lipasen bevorzugen wasserunlösliche Substrate, sind aber nicht in der Lage, Triglyceride aus kurzkettigen Fettsäuren umzusetzen. Im Gegensatz dazu hydrolysieren Esterasen nur kurzkettige, wasserlösliche Substrate.

Die ursprüngliche Definition der Lipasen erfolgte über ihre Grenzflächenaktivität, die sie von den Esterasen unterscheidet. (Abb. 1.2A) In der Regel zeigen Lipasen in Abwesenheit einer Grenzfläche nur geringe Aktivität, die aber sprunghaft ansteigt,

sobald es durch erhöhte Substratkonzentration zur Ausbildung von Mizellen kommt („Interphasen-Aktivierung“), Esterasen dagegen zeigen ein klassisches Michaelis-Menten-Kinetik ^[21].

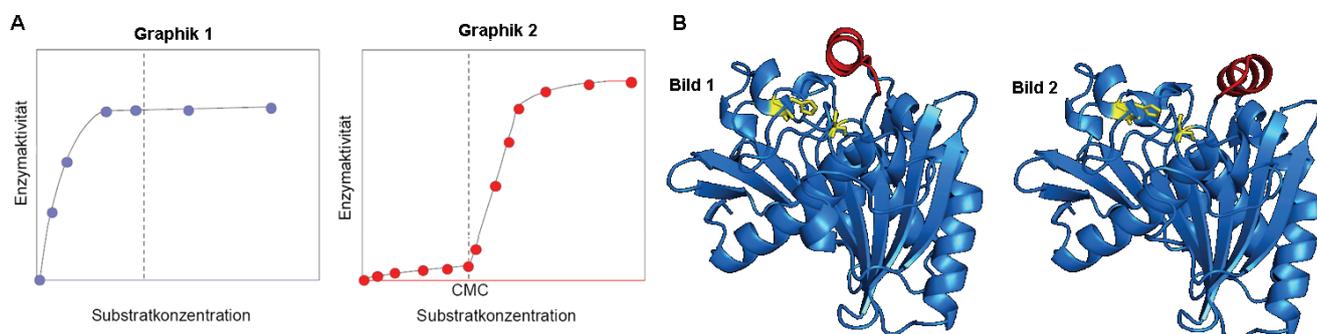


Abb. 1.2: A. Interphasen-Aktivierung einer Lipase im Vergleich zur Esterase. Graphik 1 zeigt die Hydrolyse einer Triacylglycerids durch eine Esterase, Graphik 2 die Hydrolyse mittels Schweinepankreas-Lipase. Die gestrichelte Linie schneidet die x-Achse bei der kritischen Micellarkonzentration (CMC) des Substrats. B. Grenzflächenaktivierung von Lipasen aus *Rhizomucor miehei*. Bild 1 (PDB: 3TGL) Struktur der Lipase in der geschlossenen Form; Bild 2 (PDB: 4TGL) Struktur der Lipase in der offenen Form. Seitenansicht. Die katalytische Triade (gelb) und sekundäre Strukturelemente zeigen das α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv, das typisch für alle Lipasen ist. Wenn sich der Deckel öffnet, wird das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade (gelb) zugänglich ^[22, 23].

Die Interphasen-Aktivierung wurde durch eine notwendige Konformationsänderung strukturell erklärt. Die Aufklärung der Strukturen von *Rhizomucor miehei* Lipase sowie Humanpankreas-Lipase ^[22, 23] zeigte ein weiteres typisches Merkmal von Lipasen, den so genannten Lipase-Deckel. Er besteht aus einer amphiphilen Peptidkette, welche an der Oberfläche des Enzyms das katalytisch aktive Zentrum von den Lösemittelmolekülen abschirmt. Bei der schon erwähnten Interphasenaktivierung an der Phasengrenze wird der Deckel geöffnet und das Substrat kann an das aktive Zentrum anlagern (Abb. 1.2B) ^[22, 24].

Diese klassische Definition von Lipasen wurde in den letzten Jahren durch eine Vielzahl von Untersuchungen in Frage gestellt. Vielen Lipasen wurden charakterisiert, die keine Interphasenaktivierung zeigen oder den typischen Lipase Deckel nicht aufweisen. Zu dieser Art von untypischen Lipasen gehört auch die im Rahmen dieser Arbeit behandelte *Bacillus subtilis* Lipase A ^[25, 26].

Lipasen gehören zu den wichtigsten industriell genutzten Enzymen, mehr als 30 verschiedene Lipasen (meist mikrobiellen Ursprungs) sind kommerziell erhältlich ^[27]. Sie werden beispielsweise bei der Synthese von Pharmazeutika, Pestiziden, Hautölen oder Vitaminen, aber auch in großtechnisch hergestellten Produkten, etwa als Waschmittelzusatz eingesetzt ^[28]. Von besonderem Interesse ist dabei ihre hohe

Einleitung

Enzymstabilität in organischen Lösungsmitteln in Verbindung mit ihrer häufig geringen Substratspezifität. Außerdem zeigen sie gegenüber einem breiten Substratspektrum hohe Stereo- und Regioselektivität und werden deshalb als Katalysatoren bei der Herstellung enantiomerenreiner Wirkstoffe ^[28], synthetischer Intermediate ^[29] und der Modifikation natürlicher Lipide ^[30] eingesetzt.

1.2.2.1 Katalytischer Mechanismus

Die katalytische Triade aller Lipasen besteht aus einem Serin als nukleophilem Rest, dem konservierten Histidin und einem als Protonenakzeptor dienenden Carboxylatrest eines Aspartats oder eines Glutamats ^[31].

Der über verschiedene Zwischenstufen verlaufende Reaktionsmechanismus ist in Abb. 1.3 skizziert und entspricht dem der Serin-Proteasen ^[31-35]. Wie alle anderen Hydrolasen sind Lipasen Cofaktor unabhängig.

Im ersten Reaktionsschritt (i) erfolgt ein nukleophiler Angriff des aktiven Serins an dem Carbonyl-Kohlenstoff des Substrats, wodurch ein tetraedrisches Intermediat entsteht. Im zweiten Reaktionsschritt (ii) wird der Alkohol abgespalten und es entsteht ein Acyl-Enzym-Komplex, in dem der Imidazolring des Histidins aus dem aktiven Zentrum das freiwerdende Proton des aktiven Serins übernimmt. Die Nukleophilie des Serins wird durch die Abstraktion des Wasserstoffs der Hydroxylgruppe durch das Histidin erhöht. Die bei diesem Vorgang entstehende positive Partial-Ladung am Histidin wird teilweise durch das Aspartat der katalytischen Triade neutralisiert.

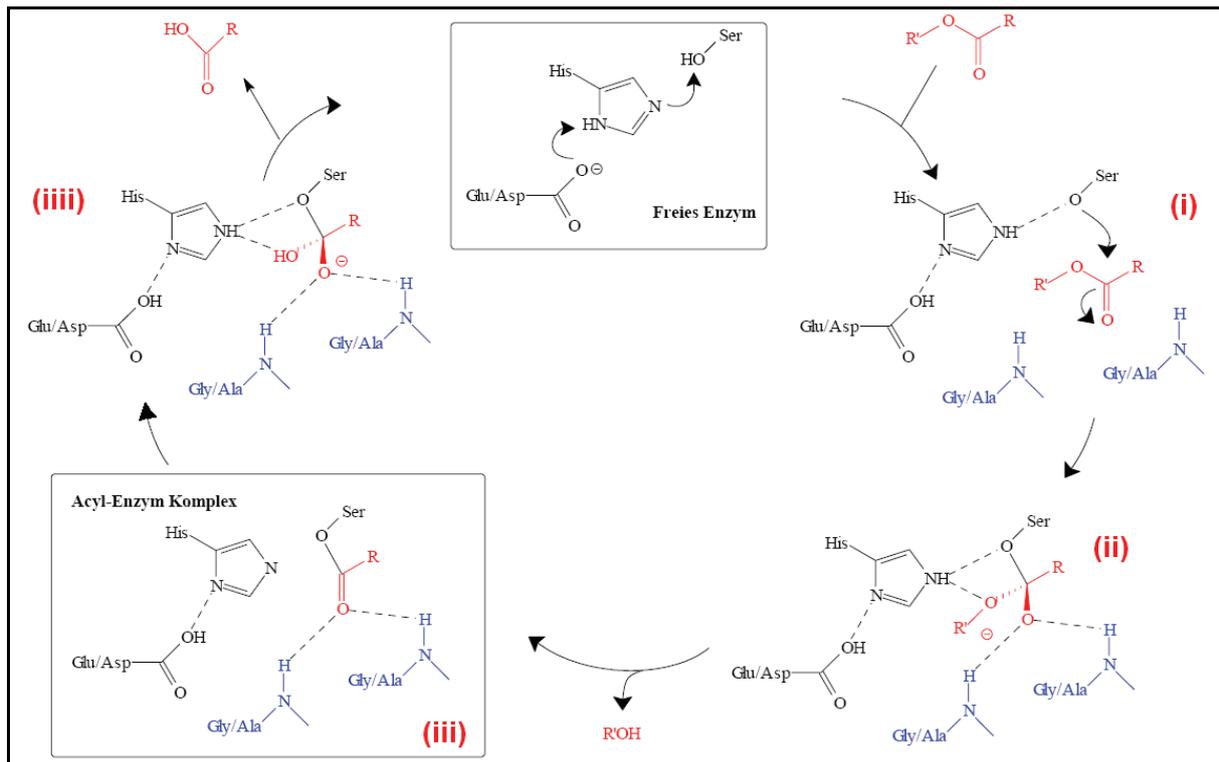


Abb. 1.3: Reaktionsmechanismus der Esterhydrolyse einer Serin-Hydrolase. Aminosäurereste der katalytischen Triade sind schwarz dargestellt, am „oxyanion hole“ beteiligte Reste sind blau hervorgehoben. Das Substrat ist rot dargestellt ^[36]. (i), (ii), (iii) und (iiii) siehe Text.

Das negativ geladene Intermediat wird im so genannten „Oxyanion hole“, einem Strukturelement, das aus den zwei Amidgruppen zweier Aminosäuren gebildet wird, durch Ausbildung zweier Wasserstoffbrücken stabilisiert ^[37, 38]. Bei einigen Lipasen wird das „Oxyanion hole“ erst durch die Reorientierung des Deckels, einer flexiblen Struktur, die bei vielen Lipasen das aktive Zentrum abschließt, gebildet, wie beschrieben wurde (s. 1.2.2) ^[39]. Im dritten Reaktionsschritt wird ein Wassermolekül an den Acyl-Enzym-Komplex gebunden (iii), wodurch ein zweites tetraedrisches Intermediat entsteht. Dieses zerfällt im vierten Reaktionsschritt in Enzym und Produkt (iiii), womit der Katalyseprozess abgeschlossen und ein Molekül freie Fettsäure entstanden ist.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Lipase-katalysierten Hydrolyse ist die Bildung des ersten tetraedrischen Intermediats ^[40].

1.2.2.2 Lipasen aus *Bacillus subtilis* als Modellenzyme

Bacillus subtilis ist ein weit verbreitetes Gram positives Bakterium welches vor allem im Boden und in Gewässern in Assoziation mit Pflanzen vorkommt ^[41]. In den Jahren

Einleitung

1990 bis 1997 wurde sein Genom erforscht und komplett durchsequenziert ^[42]. Um sich unterschiedliche Nährstoffquellen nutzbar machen zu können, exprimiert und sekretiert *B. subtilis* zahlreiche extrazelluläre Hydrolasen ins Kulturmedium ^[43]. Dazu gehören verschiedene Proteasen, wie z.B. Subtilisin ^[44], eine Levansucrase, mehrere β -Glucanasen, eine Phospholipase und zwei lipolytische Enzyme ^[45], die Lipase LipA (BSLA) ^[46, 47] und die Esterase LipB (BSLB) ^[47, 48]. Die physiologischen Rollen beider Enzyme für *B. subtilis* sind zurzeit noch nicht abschließend erforscht ^[49, 50].

Die BSLA wurde Anfang der 90er Jahre von Dartois *et al.* entdeckt, kloniert, sequenziert und in *E. coli* überexprimiert. Bei dem Enzym handelt es sich um ein 19.348 kDa Protein, das sich aus 181 Aminosäureresten zusammensetzt. Damit gehört die BSLA zu den kleinsten bekannten Lipasen und die Struktur wird als minimale α/β -Hydrolase-Faltung bezeichnet ^[26, 51, 52].

Die BSLB wurde 1996 im Rahmen des *Bacillus subtilis* Genom-Projekts ^[42, 53] entdeckt, aber erst im Jahre 2000 kloniert, überexprimiert und das resultierende Protein gereinigt ^[48]. Diese Lipase besteht aus 182 Aminosäuren und besitzt mit einem Molekulargewicht von 19,5 kDa eine annähernd gleiche Größe wie BSLA ^[50].

Die Auflösung der Kristallstruktur der BSLA mit Röntgenstrukturanalyse im Jahre 2001 zeigte, dass es sich um ein globuläres Protein handelt ^[26] (Abb. 1.4).

In der Primärstruktur sind keine Cystein-Reste vorhanden, folglich kann bei der Ausbildung der Tertiärstruktur des Enzyms nicht mit Disulfidbrücken stabilisiert werden.

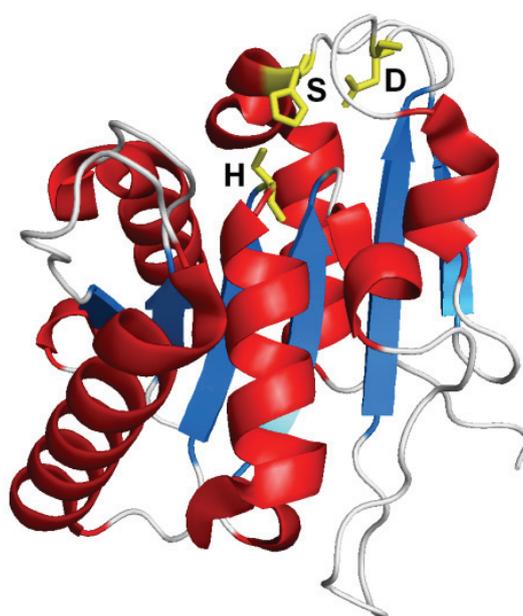


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der BSLA (PDB: 1I6W). Die katalytische Triade Ser77 (S), Asp133 (D) und His156 (H) ist in gelb dargestellt ^[26].

Die Klassifizierung des Enzyms BSLA als Lipase erfolgte auf Grund seiner Substratspezifität, da sie in der Lage ist, langkettige Fettsäureglyceride zu spalten. Allerdings zeigt sie nicht die für diese Gruppe typische Grenzflächenaktivierung. Im Gegensatz zeigt die BSLB Präferenzen für Substrate mit Acyl-Kettenlängen von C4-C8 und keine hydrolytische Aktivität gegenüber dem typischen Lipase-Substrat Triolein (C18:1). Deswegen wurde das Enzym zunächst als Esterase klassifiziert [47, 48].

Die katalytische Triade der BSLA wurde durch ortsgerichtete Mutagenese (Substitution der entsprechenden Aminosäuren durch Alanin) nachgewiesen [54].

Das bei Lipasen typischerweise strikt konservierte Konsensusmotiv Gly-X-Ser-X-Gly ist leicht verändert, an erster Position des Pentapeptids ist Glycin durch Alanin substituiert [54]. Eine weitere Besonderheit der BSLA ist die fehlende Interphaseaktivierung.

Vergleichbare Hydrolasen mit ebenfalls minimalem Faltungsmotiv und fehlender Interphasenaktivierung sind z.B. die Cutinase aus *Fusarium solani*, die Acetyl-xylanesterase aus *Penicillium purpurogenum* sowie die Lipase aus *Burkholderia cepacia* [55, 56].

Eine Recherche in der MMDB Strukturdatenbank [57] („*Entrez Structure Database*“) durch VAST („*Vector Alignment Search Tool*“) [58-60], betreffend ähnliche bekannte Lipasen zeigt starke Sequenzähnlichkeit der *Bacillus subtilis* Lipasen A und B mit den beiden minimalen Lipasen aus *Bacillus pumilus* und *Bacillus licheniformis*. Die konservierten Bereiche sind blau markiert (Abb.1.5).

<i>B. pumillus</i>	AEHNPVVMVHGI GGASYNFES IKSYL VGQWDRNQL Y AIDFIDKTGNRRNNGPRLSRFVK	61
<i>B. licheniformis</i>	AEHNPVVMVHGI GGASYNFES IKSYL VGQWDRNQL F AIDFIDKTGNRRNNGPRLSRFVK	61
<i>B. subtilis</i> LipA	AEHNPVVMVHGI GGASFNFA GIKSYLV SQWDRDKLYAVDFWDKTGNNRNGPVL SRFVQ	61
<i>B. subtilis</i> LipB	ESVHNPVVLVHGISGASYNFFA IKNYLISQGWQSNKLYAIDFYDKTGNNLNNGPQLASVVD	62
	: *****:****.***:** .**.*:***. :*:*** * * * * * * * * * * * * *	
<i>B. pumillus</i>	DVLDKTGAKKVDI VAHSMGGANTLYYIKNLDGGDKIENVVTIGGANGLVSSRALPGTDPNQ	122
<i>B. licheniformis</i>	DVLDKTGAKKVDI VAHSMGGANTLYYIKNLDGGDKIENVIPIGGANGLVSSRALPGTDPNQ	122
<i>B. subtilis</i> LipA	KVLDETGAKKVDI VAHSMGGANTLYYIKNLDGKNKVANVVTLGGANRLITGKALPGTDPNQ	122
<i>B. subtilis</i> LipB	RVLKETGAKKVDI VAHSMGGANTLYYIKYLGGNKIQNVVTLGGANGLVSSRALPGTDPNQ	123
	.:*** *	
<i>B. pumillus</i>	KILYTSVYSSADLIVVNSLSRLIGARNVLHGVGHIGLLTSSQVKGYIKEGLNGGQNTN	181
<i>B. licheniformis</i>	KILYTSVYSSADLIVVNSLSRLIGARNVLHGVGHIGLLTSSQVKGYIKEGLNGGQNTN	181
<i>B. subtilis</i> LipA	KILYTSIYSSADMIVMNYLSRLDGARNVQIHGVGHIGLLYSSQVNSLIKEGLNGGQNTN	181
<i>B. subtilis</i> LipB	KILYTSIYSLNDQIVINSLSRLQARNIQLYGIGHIGLLSNSQVNGYIKEGLNGGGLNTN	182
	*****:** * **:* **** *	

Abb. 1.5: Sequenzvergleich der BSLA und BSLB mit Lipasen aus *Bacillus pumilus* und *Bacillus licheniformis*. Gleiche Aminosäuren in den Sequenzen sind mit blauem Hintergrund gekennzeichnet. Die katalytische Triade in den Enzymen ist mit rotem Hintergrund und gelbe Buchstaben dargestellt.

Einleitung

Eine weitere Analyse der Struktur der BSLA zeigt, dass die Peptid-NH-Atome der Aminosäurereste Met78 und Ile12 das *oxyanion hole* bilden. Im Gegensatz zu einigen anderen Lipasen, bei denen sich das *oxyanion hole* erst durch konformative Änderungen bei der Öffnung des Deckels bildet, liegt es in der BSLA auch ohne Substratkontakt vor. Das aktive Zentrum liegt oberflächenexponiert in einer kleinen Spalte zwischen zwei Loops.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegt keine Röntgenkristallstruktur von BSLB vor, trotzdem konnte ihre Struktur aufgrund der Sequenzhomologie mit BSLA annähernd modelliert werden. Dabei wurde die postulierte katalytische Triade (Ser78, Asp134 und His157) durch ortgerichtete Mutagenese und anschließenden Aktivitätstest bestätigt ^[26, 48].

In unserer Arbeitsgruppe (Directed Evolution, Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurde ein Expressionssystem für die BSLA in *E. coli* entwickelt. Das Enzym wird ins Kulturmedium sekretiert, d.h. für Reaktionen wird nicht die gesamte Zellkultur, sondern lediglich der Kulturüberstand nach Zentrifugation verwendet.

Zur Regulation enthält das verwendete Plasmid das so genannte Lactose-Operon. Die Enzymexpression wird durch Zugabe von Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert, allerdings findet auch ohne Induktion eine gewisse Restexpression statt, die ausreichend zum Nachweis von Lipaseaktivität innerhalb des Tributyrin-Aktivitätstest ist.

Zusammenfassend bietet sich die BSLA aufgrund ihrer einfachen Struktur und der guten Verfügbarkeit als Modellenzym für die Untersuchungen zu Struktur-Funktionsbeziehung von α/β -Hydrolasen an.

1.2.3 Epoxidhydrolasen

Ein zweites Beispiel industriell relevanter Enzyme aus der α/β -Hydrolase Familie sind die Epoxidhydrolasen (EH). Der Großteil der bisher beschriebenen EH bildet eine einheitliche Gruppe [EC 3.3.2.x] innerhalb der Superfamilie der α/β -Hydrolasen. EH sind in der Natur weit verbreitet, und kommen u.a. in Bakterien, Pilzen, Insekten, Pflanzen und Säugetiere vor ^[61]. Abgesehen von ihrer Funktion in verschiedenen biosynthetischen Kaskaden stellt der enzymatische Abbau von Epoxiden die wichtigste Funktion dar. Epoxide sind häufige Zwischenprodukte im Stoffwechsel von Xenobiotika und die Oxiranfunktion ist so reaktiv, dass sie mit den verschiedensten

biologischen Nucleophilen reagiert ^[62]. Der Abbau solcher potentiell schädlicher Zwischenprodukte ist daher sehr wichtig für lebende Zellen ^[63]. Es scheint, dass Epoxidhydrolasen das Hauptwerkzeug in der Detoxifizierung von Epoxiden zu den wasserlöslicheren und somit leichter auszuscheidenden, Metaboliten angesehen werden können ^[61].

EH als Cofaktor-unabhängig arbeitende Enzyme finden wie Lipasen aufgrund ihrer meist hohen Enantio- und Regioselektivität Einsatz als Katalysatoren in der organischen Chemie ^[64]. Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung von Epoxiden zu vicinalen Diolen. Die Hydrolyse erfolgt im Allgemeinen als *trans*-Addition von Wasser unter Inversion der Konfiguration am angegriffenen Kohlenstoffzentrum ^[61, 62] (siehe Tab. 1.2F).

1.2.3.1 Katalytischer Mechanismus

Die katalytische Triade einer EH besteht normalerweise aus zwei Aspartaten als nukleophilem Rest und einem Histidin, homologe Struktur es gibt bei Haloalkane Dehalogenasen auch ^[65]. Ein Merkmal bei der EH ist die Deckeldomäne, das aktive Zentrum ist an dem Interface zwischen der α/β -Hydrolase Hauptdomäne und der Deckeldomäne lokalisiert. Interessant sind auch zwei Tyrosine der Deckeldomänen, sie werden nahe am katalytischen Nucleophil in Position gebracht und aktivieren den Oxiranring, um den nukleophilen Angriff des Aspartatüberrests zu erleichtern, indem Wasserstoffbindungen gebildet werden die wahrscheinlich als Protonspender dienen ^[66].

Der Mechanismus der Epoxidringöffnung durch eine Epoxidhydrolase verläuft über den nukleophilen Angriff des Carboxylatrestes am katalytischen Aspartat. Dieser Angriff durch das Aspartat wird als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Hydrolyse angenommen und führt zur Bildung eines α -Hydroxyesterintermediats ^[67], welches kovalent am aktiven Zentrum des Enzyms gebunden ist. Im nächsten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff eines Wassermoleküls, welches durch ein benachbartes Histidin aktiviert wurde. Dabei kommt es zur Freisetzung des Diols und zur Regeneration des Enzyms ^[68].

Der Hinweis zum Mechanismus wurde von Armstrong durch „*Single-Turn-Over-Reaktion*“ ^[69] und Arand durch Untersuchung von mikrosomaler (mEH) ^[70] und löslicher (sEH) ^[71] EH katalytischer Triade in Vergleich mit Haloalkane

Einleitung

Dehalogenasen liefert. Da Haloalkane Dehalogenasen besonders hohe Homologien in den Bereichen des aktiven Zentrums zu EH aufweisen ^[72], konnte man das Ester-Intermediat auch für den EH-Mechanismus postulieren (Der Dehalogenase Mechanismus über die Bildung eines Ester-Intermediats ist belegt ^[73]). Der katalytische Mechanismus der EH ist in Abb. 1.6 dargestellt.

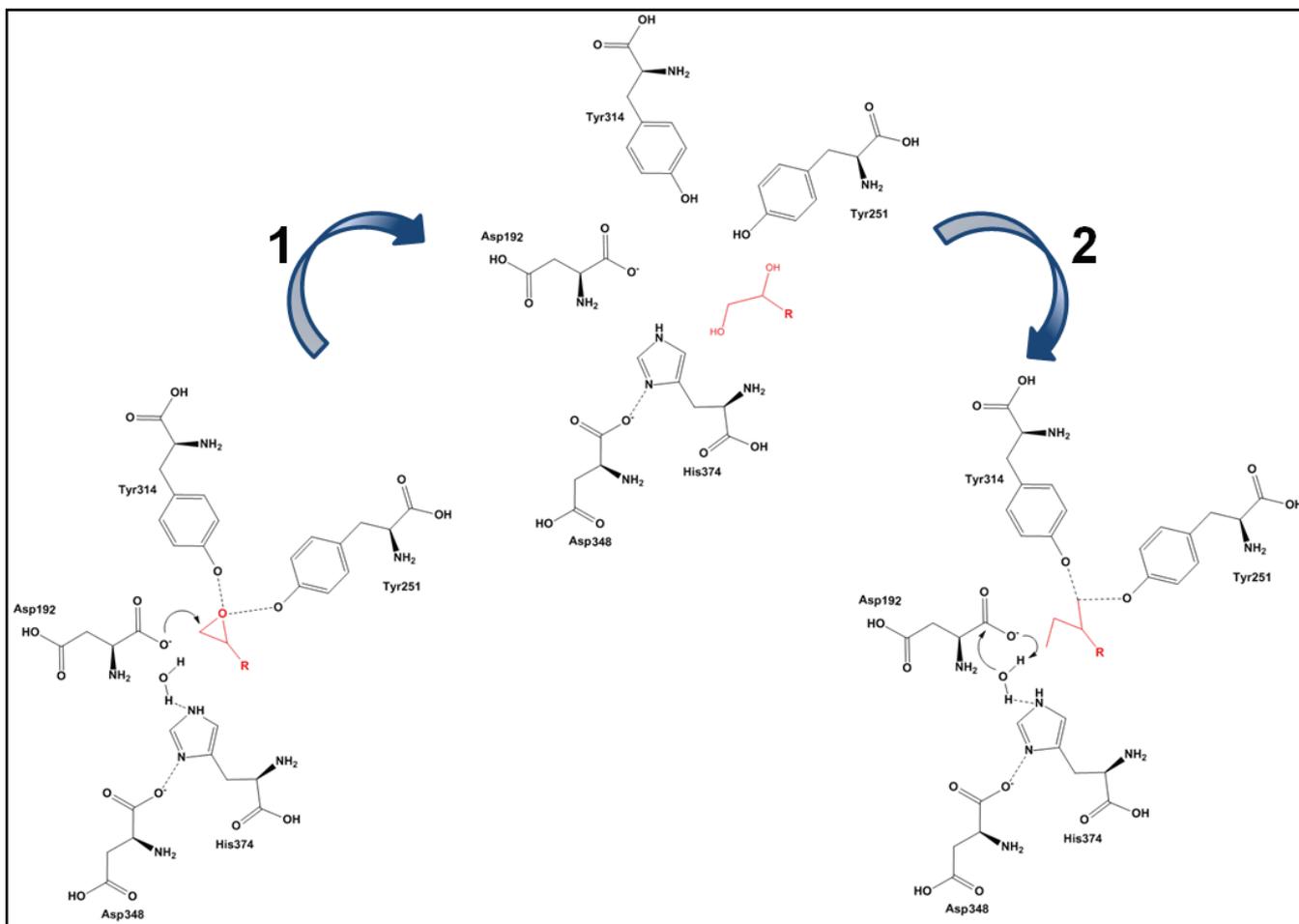


Abb. 1.6: Katalytischer Mechanismus der AnEH. Ringöffnung durch nukleophilen Rückseitenangriff des Aspartats (1), Hydrolyse durch aktiviertes Wasser unter Freisetzung des Diols (2) ^[74].

Die AnEH ist vor allem gegenüber terminalen einfachsubstituierten Epoxiden aktiv. Insbesondere aliphatische, aber auch aromatische Seitenketten werden akzeptiert ^[75, 76]. Außerdem können disubstituierte Epoxide hydrolysiert werden ^[77]. Der Angriff erfolgt hochselektiv unter Beibehaltung der Konfiguration am nicht substituierten Kohlenstoffatom. Insbesondere bei aromatischen Substituenten werden dabei bevorzugt die (*R*)-Enantiomere umgesetzt. Die Selektivität gegenüber unverzweigten aliphatischen 1,2-Epoxiden ist gering ^[74, 78, 79].

1.2.3.2 Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* als komplexes Modellenzym

Das Interesse an der Verwendung von diesen Enzyme als enantioselektive Katalysatoren in der organischen Synthese hat durch die Isolierung mehrerer mikrobieller Enzyme stark zugenommen [64, 80]. Furstoss *et al.* konnten in 1993 das Potenzial eines *A. niger*-Stammes in der selektiven Hydrolyse von Epoxiden nachweisen [81]. Die Ergebnisse ließen auf eine hochaktive EH schließen, welche die gleiche Stereospezifität wie mikrosomale EH (mEH) aus Säugern zeigte [82]. Erst mit der rekombinanten Expression in *E. coli* im Jahr 1999, war eine detaillierte Charakterisierung des Enzymes möglich [61]. Ebenfalls 1999 wurde von der Arbeitsgruppe Zou [74] die Röntgenstruktur der EH aus *A. niger* (AnEH) aufgeklärt (Abb. 1.7).

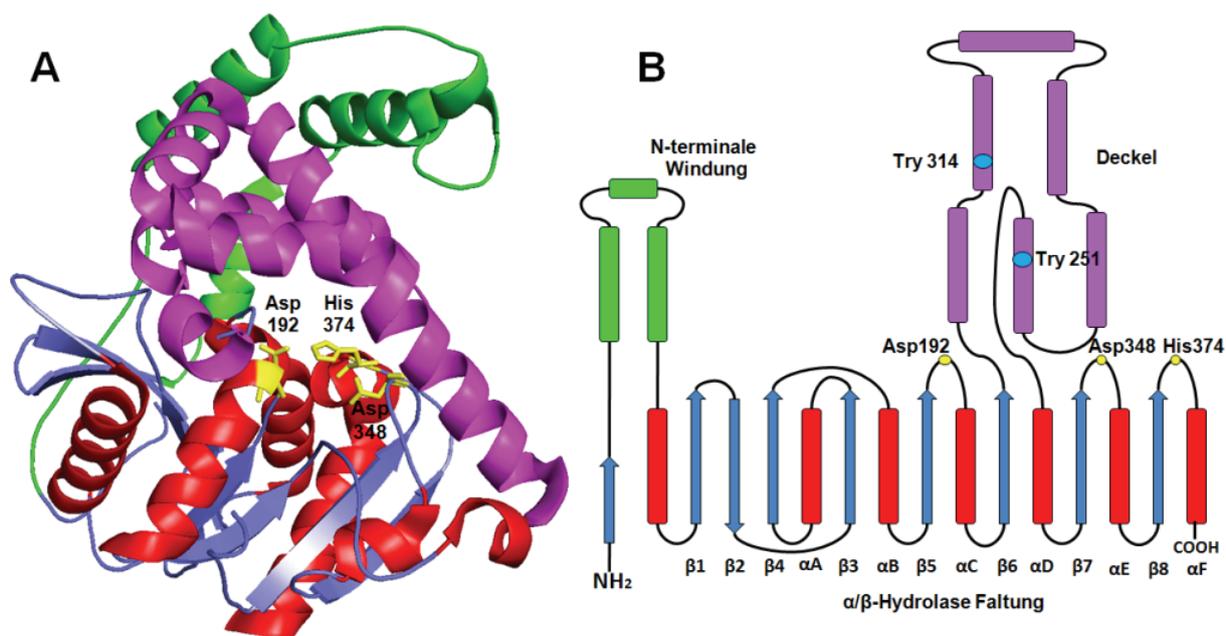


Abb. 1.7: Kristallstruktur und Topologie der AnEH (PDB: 1QO7). A. Dargestellt ist ein Monomer des Enzymes, wobei die katalytische Triade bestehend aus Asp192, His374 und Asp348 gelb hervorgehoben ist. B. Topologie der AnEH. Das Enzym setzt sich aus drei Teilen zusammen; dem Kernstück der α/β -Hydrolase-Domäne (blau und rot), in welchem das aktive Zentrum liegt, der Deckelstruktur (violett) und einer N-terminalen Schleife (grün). Die gelben Punkte markieren die Aminosäuren der katalytische Triade (Asp192, Asp348 und His374). Blau markiert sind die Protonendonoren (Tyr251 und Tyr314) [74].

Strukturell zeigt die AnEH das kanonische α/β -Hydrolase Faltungsmotiv. Dieses Motiv bildet das Gerüst für das aktive Zentrum, welches von den Aminosäuren Asp192, Asp348 und His374 zusammen mit den Protonendonoren Tyr251 und Tyr314 ausgebildet wird.

Einleitung

Die AnEH besteht aus 398 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 44,53 kDa.

Ein Sequenzvergleich mit bereits beschriebenen EH, wie sEH und mEH, zeigt eine entfernte aber eindeutige phylogenetische Verwandtschaft zwischen den beiden Enzymgruppen. Weiterhin zeigt ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von EH und Dehalogenasen (EC 3.8.1.x) große Ähnlichkeit (Abb. 1.8).

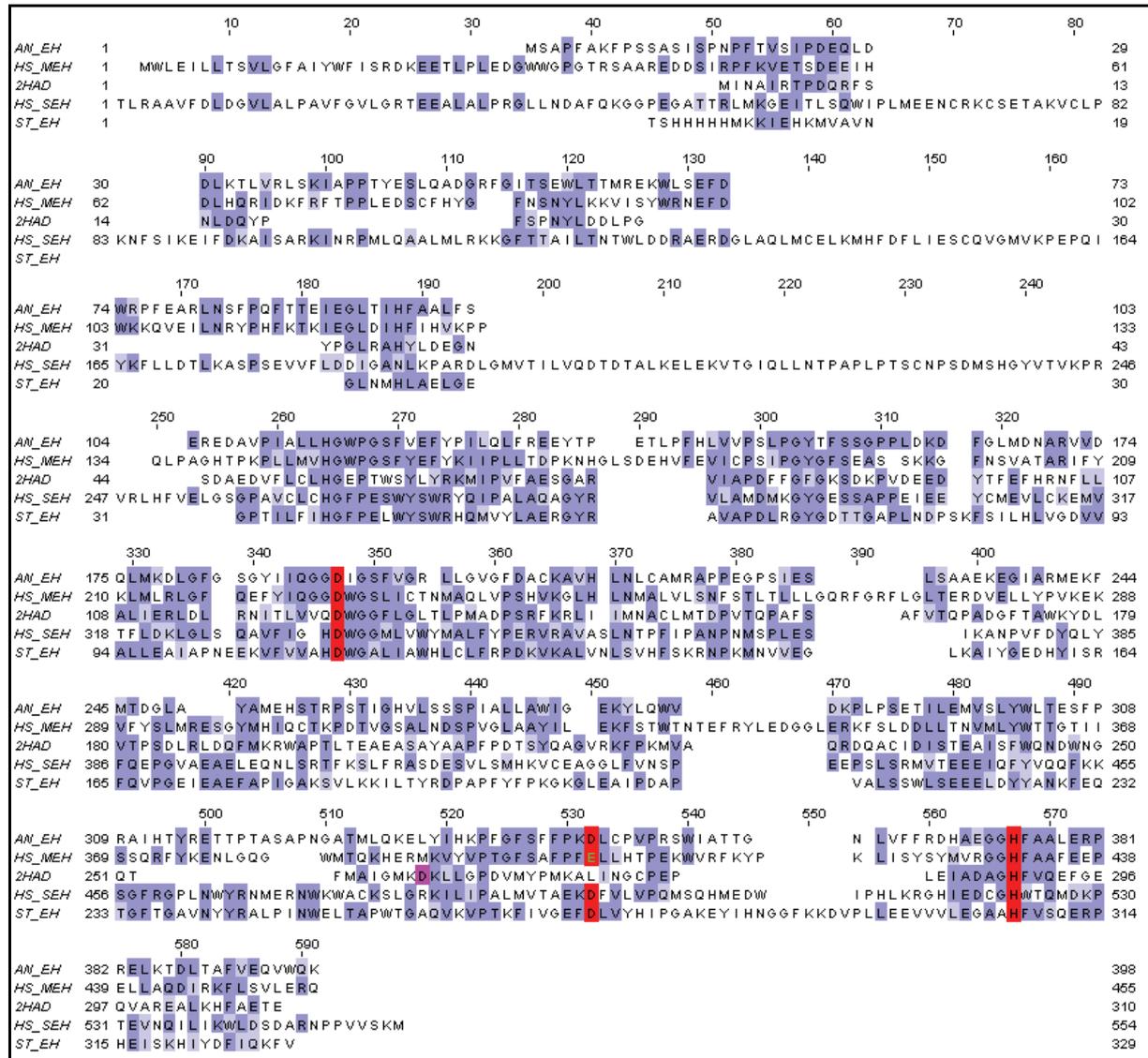


Abb. 1.8: Sequenzvergleich der *A. niger* Epoxidhydrolase (AN_EH) mit der mikrosomalen- (HS_MEH) und der lösliche Epoxidhydrolase (HS_SEH) aus *Homo sapiens*, sowie mit der *Solanum tuberosum* Epoxidhydrolase (ST_EH) und der Haloalkandehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus* (2HAD). Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot eingefärbt. Desweiteren ist das Aspartat (Asp260) des aktiven Zentrums der Halohalkanedehalogenase hervorgehoben (magenta). In der mikrosomalen Epoxidhydrolase ist das Aspartat durch ein Glutamat (grün) ersetzt. Verschiedene Aminosäuren sind schwarz, identische dunkel blau und ähnliche hell blau eingefärbt.

Zur Expression wird ein System, das in der Arbeitsgruppe von Baratti (CNRS Marseille) entwickelt wurde, verwendet ^[83, 84]. Dabei liegt das Gen der AnEH in dem

kommerziellen Vektor pQE60 vor und wird in *E. coli* DH5 α Zellen ohne Induktion exprimiert. Aktivitätsverlust wurde auch nach drei Wochen Lagerung bei 4°C praktisch nicht beobachtet ^[85].

Im Gegensatz zur oben (s. 1.2.2.2) beschriebenen BSLA ist die hier vorgestellte EH ein α/β -Hydrolase Enzym mit zusätzlichen Strukturelementen, das strukturell und mechanistisch ebenfalls erschöpfend untersucht ist und in dieser Arbeit als Modell für eine komplexer aufgebaute α/β -Hydrolase verwendet wird.

1.3 Wie sind die vielfältigen Strukturen und Reaktionsmechanismen der Enzyme entstanden?

Wie oben für das α/β -Hydrolase Faltungsmotiv beschrieben können Proteine, die unterschiedliche Reaktionen katalysieren, das gleiche generelle Faltungsmotiv aufweisen. Die Frage, wie sich diese verschiedenen Funktionen und katalytischen Strategien aus einem hypothetischen Vorläuferprotein entwickelt haben, ist bei der Betrachtung von Struktur-Funktionsbeziehungen dieser Enzyme von zentralem Interesse. Analog zur Evolution von ganzen Organismen und Organen kann bei der Entwicklung von Enzymen und Enzymfunktionen grundsätzlich zwischen konvergenten und divergenten Evolutionsprozessen unterschieden werden.

1.3.1 Konvergente und divergente Evolution als Erklärungsansätze zur Entstehung unterschiedlicher Proteinaktivitäten

Als konvergente Evolution bezeichnet man die Parallelentwicklung von Eigenschaften aus nicht-homologen (sogenannten paralogen) Vorläufern. Dies kann sich sowohl in der Entstehung von analogen Organen bei Tieren (z.B. Grabfüße des Maulwurfs und der Maulwurfsgrille) als auch in der Entwicklung von ähnlichen bzw. gleichen Katalysemechanismen bei Enzymen zeigen. Solche konvergent entstandenen Enzyme haben oft nichts außer ihrer Aktivität gemeinsam ^[86].

Ein bekanntes Beispiel für die Entwicklung einer bestimmten katalytischen Strategie, die sich strukturell und funktional in der Ähnlichkeit der aktiven Zentren äußert, sind die Vertreter der Trypsinfamilie eukaryotischer Serinproteasen, welche die gleiche katalytische Triade wie Enzyme aus der sequentiell und strukturell nicht verwandten Subtilisinfamilie oder die Cysteinproteasen, für Ihre katalytische Funktion verwenden.

Einleitung

Wie oben beschrieben (s. 1.2) findet man das gleiche Grundprinzip einer funktionell ähnlichen katalytischen Triade auch bei den verschiedenen Vertretern der α/β -Hydrolase Familie ^[11, 19, 20].

Im Gegensatz dazu definiert man divergente Evolution als Entwicklung von verschiedenen Aktivitäten ausgehend von einem gemeinsamen (oft hypothetischen) Vorläufer. Beispiele hierzu lassen sich wieder sowohl auf der Ebene ganzer Organismen (z.B. Beine und Flügel bei Wirbeltieren als homologe Organe) als auch im Bereich von Enzymen und Enzymaktivitäten finden. Ein naheliegendes Beispiel hierfür ist das Auftreten verschiedener Enzymaktivitäten bei den α/β -Hydrolasen, welche alle die gleiche Grundstruktur (Faltungsmotiv) besitzen (s. auch 1.3.3) ^[19]. Weitere Beispiele für sich divergent entwickelnde Enzymgruppen findet man in allen weiteren beschriebenen generellen Faltungsmotiven, wie dem *TIM-barrel-Motiv*, der Rossmann-Faltung, der so genannte NTP-Faltung (mit P-loop) und der Ferredoxin-Faltung.

Dass Prozesse der divergenten und konvergenten Evolution auch miteinander verknüpft sein können, zeigt folgendes Beispiel, in dem es um die Entwicklung der Hydroxynitril-Lyase geht ^[87]. Diese Gruppe von Enzymen katalysiert die Abspaltung von Blausäure aus einem Cyanhydrin. Es sind verschiedene Gruppen dieser Enzyme bekannt, die sich in Reaktionsmechanismus und Struktur deutlich unterscheiden, sich also höchstwahrscheinlich durch Mechanismen der konvergenten Evolution entwickelt haben. Betrachtet man allerdings die einzelnen Vertreter, stellt sich heraus, dass diese jeweils in Gruppen einzuordnen sind, die sich wahrscheinlich divergent entwickelt haben. So gibt es z.B. Hydroxynitril-Lyase mit α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv ^[88-90].

Man geht davon aus, dass sich Verwandtschaften in der dreidimensionalen Enzymstruktur länger nachweisen lassen als in der Primärsequenz des Enzyms ^[91, 92]. So bietet die Untersuchung der Raumstruktur die Möglichkeit, evolutionäre Zusammenhänge zu erkennen und besser zu verstehen, auch wenn sich die Aminosäuresequenz im Lauf der Zeit durch den Einfluss von Mutationen stark verändert hat ^[93].

In diesem Zusammenhang scheint gesichert, dass die Grundlage für eine divergente Evolution in Prozessen der Genduplikation zu suchen ist ^[94]. Während das ursprüngliche Gen bzw. Genprodukt seine Funktion weiter erfüllt und so den Fortbestand des Organismus sichert, können sich im duplizierten Gen, welches somit

vom Selektionsdruck der Evolution entkoppelt ist, Mutationen anhäufen, die in einigen wenigen Fällen zur Entwicklung einer neuen Funktion des Genproduktes führen können. Sobald sich durch diese Mutationen im duplizierten Gen eine neue katalytische Funktion entwickelt hat welche dem Wirt einen Selektionsvorteil bietet, wird die neue katalytische Funktion und damit das duplizierte Gen, erneut an die Prozesse der Evolution gekoppelt womit es letztendlich zur weiteren Entwicklung und damit einer Optimierung der neuen katalytischen Funktion kommt.

Man geht davon aus, dass die heutigen Gene durch diese Prozesse aus einem kleinen Bestand von sehr alten Genen hervorgegangen sind.

Durch Verknüpfen der Theorie der Genduplikation mit der Erkenntnis (Abb. 1.9), dass eine Vielzahl von Sequenzen ähnliche Strukturen annehmen können, umgeht man das Problem, dass die Entwicklung neuer oder ähnlicher Gene aus Zufallssequenzen extrem unwahrscheinlich ist. Belege für diese Hypothese beruhen auf der Tatsache, dass viele verschiedene Proteine unterschiedlicher Funktion (Aktivität) aus ähnlichen (wenigen) Bauelementen aufgebaut sind ^[95].

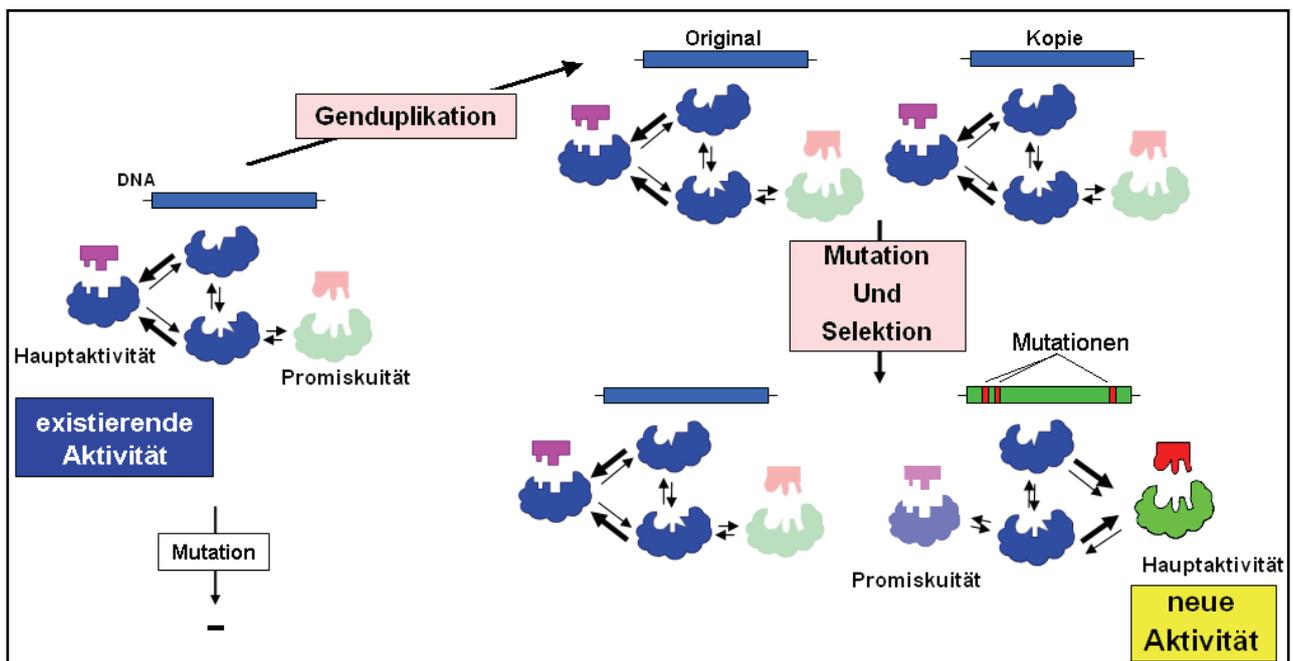


Abb. 1.9: Entwicklung einer neuen Aktivität aus einer Nebenaktivität (Promiskuität, s. 1.3.2). Die Theorie der Genduplikation geht davon aus, dass die Zelle nach der Verdopplung eines Gens ohne Verlust der ursprünglichen Funktion (Hauptaktivität) beliebige Veränderungen (Mutationen) in der Kopie tolerieren kann, durch die sich eine schwache Aktivität weiter entwickelt. Ohne Genduplikation können Mutationen in einem Gen die Abnahme oder den Verlust einer wichtigen Aktivität verursachen und so das Überleben eines Organismus gefährden. Erläuterung: Enzym (Hauptaktivität): blau, Enzyme (promiskuitive Aktivität): grün, Substrat (Hauptaktivität): magenta, Substrat (promiskuitive Aktivität): rot/hellrot.

Einleitung

Die Wahrscheinlichkeit, dass sich auf diese Weise eine völlig neue, von der ursprünglichen Aktivität abweichende, Funktion entwickelt, ist dennoch recht gering, und eine Entwicklung eines so breiten Spektrums an Aktivitäten, wie es bei den α/β -Hydrolasen zu finden ist, scheint unwahrscheinlich. Vermutet wird daher, dass das ursprüngliche Enzym bereits in der Lage war, die neue Reaktion mit geringer Aktivität zu katalysieren und sich diese Nebenaktivität im Laufe der Evolution und dem oben beschriebenen Mechanismus von Genduplikationen weiter ausgeprägt hat, bis sie die ursprüngliche Hauptaktivität überlagerte oder diese ganz in den Hintergrund trat (Abb. 1.9). Die Untersuchung solcher Nebenaktivitäten (Promiskuitäten) scheint ein gutes Mittel zu sein, um die Entwicklung neuer Enzymaktivitäten zu verstehen ^[96, 97]. Die Unterteilung von Nebenaktivitäten in Untergruppen wie Moonlighting-Aktivität oder Enzympromiskuität ist häufig recht ungenau und weicht in der Literatur oft voneinander ab. Im Folgenden wird die in den meisten Fällen verwendete Nomenklatur kurz beschrieben.

1.3.2 Nebenaktivitäten können auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen sein

Die folgende Tabelle veranschaulicht, auf welche unterschiedlichen Arten Nebenaktivitäten zustande kommen können.

Tab. 1.3: Beispiele für Prozesse, aus denen Nebenaktivitäten resultieren.

Ursache	Wirkung
Lokalisierung in der Zelle	Das gleiche Protein kann verschiedene Funktionen haben, je nachdem in welchem Teil der Zelle es vorliegt
innen vs außen	Das Protein kann, wenn es in den extrazellulären Raum sekretiert wird, andere Funktionen haben als intrazellulär
Differentielle Expression	Wenn das gleiche Protein in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert wird, kann es verschiedene Funktionen haben
Oligomerisierung	Manche Proteine weisen als Monomer andere Aktivitäten auf als als Multimer oder Oligomer.
Verschiedene Bindestellen	Die verschiedenen Funktionen können aus unterschiedlichen aktiven Zentren im gleichen Protein resultieren

Als Moonlighting-Aktivität (MLA) wird eine Nebenaktivität eines Proteins bezeichnet, die räumlich an einer anderen Stelle des Proteins als dem ursprünglichen aktiven Zentrum stattfindet. Zum Beispiel könnte ein Enzym als Aktivator an einen Rezeptor binden und so eine regulative Aufgabe erfüllen. Oft wird Moonlighting-Aktivität auch folgendermaßen definiert: MLA ist eine Aktivität des Enzymes oder Proteins, welche über den Hauptreaktions- oder katalytischen Mechanismus hinaus geht und sich auf regulative oder strukturelle Weise über z.B. allgemein strukturelle Wechselwirkungen wie Protein-Protein oder Protein-Liganden Wechselwirkungen (ohne Katalyse) manifestiert ^[98].

Der Vorteil solcher Enzyme mit mehreren gleichberechtigten Aktivitäten liegt auf der Hand: Der Organismus muss weniger Proteine synthetisieren und kann die anderweitig für die Proteinbiosynthese und auch die Replikation der DNA benötigte Energie und Ressourcen einsparen ^[99].

Im Gegensatz dazu wird eine Nebenaktivität als katalytische Promiskuität bezeichnet, wenn durch ein und dasselbe aktive Zentrum verschiedene Reaktionen katalysiert werden ^[100]. Die Unterschiede können z.B. in der Akzeptanz verschiedener funktioneller Gruppen am Substrat (z.B. Amid- oder Hydroxygruppen) oder unterschiedlichen Bindungstypen liegen. Daneben kann auch die zugrunde liegende katalytische Strategie variieren.

Am häufigsten sind Variationen in den akzeptierten funktionellen Gruppen beschrieben, z.B. katalysieren viele Proteasen auch die Hydrolyse von Esterbindungen. Hierbei werden unterschiedliche Bindungen gespalten, der grundlegende katalytische Mechanismus bleibt aber der gleiche ^[100].

Die Begriffe “cross-reactivity” oder “substrate ambiguity” überschneiden sich mit der hier vorgestellten Definition der katalytischen Promiskuität oder sind in ihr enthalten. Eine genaue Aufschlüsselung findet sich z.B. im Übersichtsartikel von Hult und Berglund ^[101].

Einen Erklärungsansatz zur Entstehung von promiskuitiven Enzymfunktionen stellen aktuelle Theorien, was die Prozesse der Enzymfaltung angeht, dar.

NMR-Untersuchungen zeigten, dass Proteine keine starren Gebilde sind, sondern sich durch eine hohe Flexibilität auszeichnen ^[102-104]. So kann es sein, dass diese Konformationsdiversität eine wichtige Rolle bei der Erweiterung des katalytischen Potenzials eines Proteins spielt. Ein Protein, das in vielen Formen vorliegt, kann prinzipiell auch verschiedene Funktionen übernehmen ^[105].

Einleitung

Diese Erkenntnisse und Überlegungen führten letztendlich zu einem Paradigmenwechsel vom weithin bekannten Schlüssel-Schloss Prinzip ^[106] zum sogenannten Neuen Modell („*new view*“) der Proteinfaltung ^[107]. In diesem Modell kann die Proteinaktivität und Multifunktionalität durch die Proteinflexibilität (Konformationsdiversität) mechanistisch gesteuert werden (Abb. 1.10) ^[107, 108].

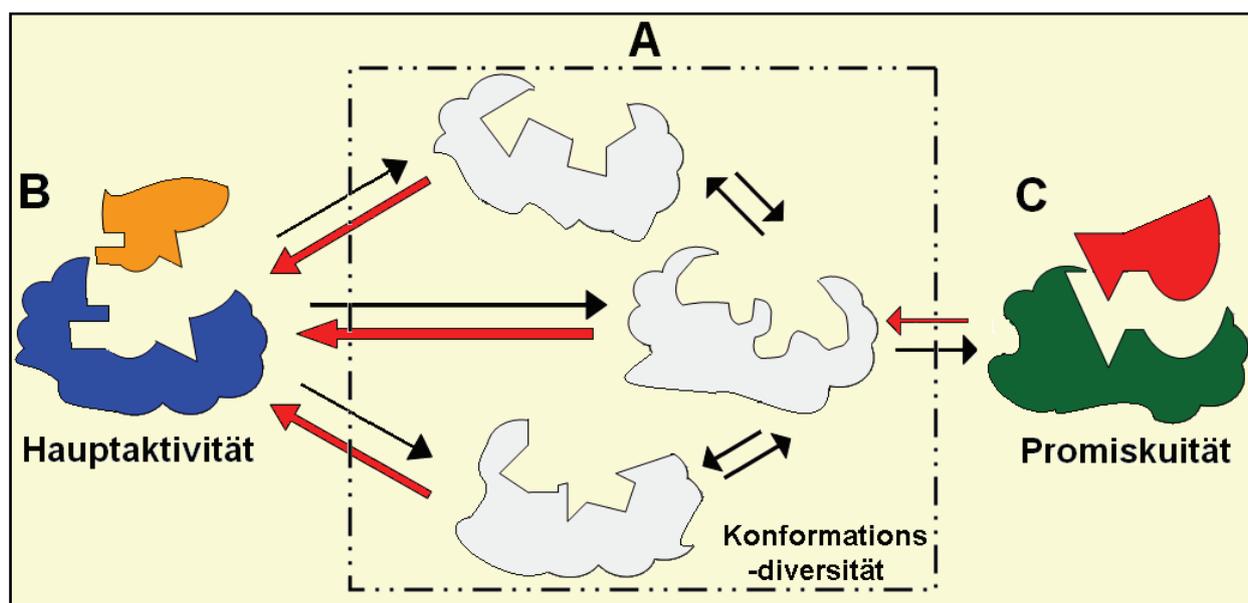


Abb. 1.10: Schematische Darstellung des „new view“ Modells der Proteinfaltung. A. Übergangszustand in Gleichgewicht als eine Ansammlung von unterschiedlichen Zuständen. B. Hauptaktivität; das Hauptsubstrat (orange) bindet an die dominante Konformation (blau) C. Promiskuitative Aktivität; eine alternative Konformation (grün) ermöglicht die Bindung eines zweiten Substrats (rot) ^[109].

1.3.3 α/β -Hydrolasen als Beispiel für divergente Evolution und katalytische Promiskuität

Wie oben schon mehrfach angesprochen, stellt die Familie der α/β -Hydrolasen ein eingängiges Beispiel für divergente Evolution dar. Die unterschiedlichen, divergent entstandenen Enzymaktivitäten wie z.B. Lipasen und Epoxidhydrolasen wurden bereits in Tab. 1.1 zusammengefasst.

Zur Unterstützung der Theorie, dass die divergente Evolution zum Teil auf schwach ausgeprägten Nebenaktivitäten beruht, die sich über den Prozess der Genduplikation weiter entwickelt haben, können ebenfalls Beispiele aus dieser Enzymklasse herangezogen werden. Viele α/β -Hydrolasen weisen neben ihrer Hauptaktivität noch schwächer entwickelte andere Funktionen auf. In Tab. 1.4 sind einige dieser Proteine sowie deren Haupt- und Nebenaktivitäten aufgelistet.

Tab. 1.4: α/β -Hydrolasen mit katalytischer Promiskuität.

Enzyme	Normale Aktivit't	Promiskuitive Aktivit't	Lit.
Lipase	Esterhydrolyse; Triglyceridhydrolyse	Resolution von chiralen Alkoholen; C–C C–N und C–S Bindungsknüpfung; Phospholipidhydrolysis	[110-114]
Esterase /Lipase	Triglyceridhydrolyse Esterhydrolyse	C–O, C–S und C–N Bindungsknüpfung	[115]
Protease	C-N-Hydrolyse in Amiden C-N-Hydrolyse in Prolinamiden	P-O-Hydrolyse in Bis(p- nitrophenyl)phosphat; Sulfinamidhydrolyse; C–N Bindungsknüpfung; P-F-Hydrolyse in Diisopropylfluorphosphat; Sulfinamidhydrolyse	[116-119]
Aminopeptidase	peptide Hydrolysis	Phosphodiester Hydrolyse	[120]
Epoxidhydrolase	Hydrolyse von Epoxiden unter Inversion der Konfiguration	Hydrolyse von Epoxiden unter Retention der Konfiguration	[121, 122]
Oxynitrilase	Addition von Cyanid an Aldehyde	Addition von Cyanid an Imine	[123, 124]
Dehalogenase	Halogenhydrolyse (Pestizide)	Maleylacetone isomerase Aktivität	[125]

*Modifiziert nach ^[100]

Das breite Spektrum an Nebenaktivitäten, die bereits für α/β -Hydrolasen beschrieben sind und das allen diesen Enzymen zugrunde liegende gleiche Faltungsprinzip legt die Frage nahe, ob sich solche Nebenaktivitäten eventuell auch künstlich (im Labor) entwickeln lassen oder sogar eine Enzymaktivität komplett in eine andere umgewandelt werden kann. Methodische Ansätze zur Klärung dieser Frage werden im nächsten Kapitel dargestellt.

1.4 Kann man eine Enzymaktivität im Labor in andere überführen?

Seit der englische Wissenschaftler Charles Darwin, im Jahr 1858 sein wichtigstes Werk „*The Origin of Species*“ ^[126] veröffentlicht hat, wird allgemein akzeptiert, dass neue Arten durch natürlicher Selektion entstehen. In der Natur beruht die Evolution auf der Anpassung an eine sich ständig ändernde Umwelt, dazu arbeitet sie weder in eine bestimmte Richtung noch auf ein bestimmtes Ziel hin. Die zugrunde liegenden Prozesse, die Erzeugung genetischer Diversität, die Reproduktion und das

Einleitung

„Überleben“ einer neuen (an die Umweltbedingungen besser angepassten) Art, geschehen spontan. Allerdings erfolgt dieser natürliche Selektionsprozess sehr langsam, da die Entwicklung und Selektion graduell vonstatten gehen.

Seit Darwins Zeiten, jedoch vor allem in den letzten Jahrzehnten, kam es auf Grund der rasanten Entwicklung in den Bereichen der Molekularbiologie, der Genetik und der Biochemie, zu einer Vermehrung des Wissens über die molekularen Mechanismen, welche der Evolution zugrunde liegen. In der Biotechnologie werden diese evolutiven Mechanismen vor allem bei der Optimierung von Biokatalysatoren im Labor eingesetzt. Dies hat vor allem zwei wesentliche Vorteile: erstens erlaubt dies das Arbeiten unter kontrollierten, reproduzierbaren Bedingungen und zweitens können so evolutive Prozesse in deutlich kürzeren Zeitspannen (Wochen/Monate im Vergleich zu Millionen von Jahren) nachgestellt werden. Es wurde eine Vielzahl von experimentellen molekularbiologischen Methoden und Strategien entwickelt, um genetische Diversität unter Laborbedingungen zu erzeugen. Es gibt grundsätzlich zwei Hauptstrategien, um Veränderungen auf Genebene einzubringen, den zufälligen Ansatz (gerichtete Evolution) und den gezielten und rationalen Ansatz (Rationales Design). Diese beiden Prinzipien werden im Folgenden näher erläutert.

Beide Ansätze sind vielfach erfolgreich eingesetzt worden um neue Biokatalysatoren für industrielle Anwendungen zu entwickeln. So gibt, es in der Literatur viele Beispiele, in denen Enzymspezifität, -selektivität und -stabilität verbessert werden konnten ^[127-134]. Da die Entstehung der verschiedenen Proteinfamilien (s. 1.2) sowie der katalytischen Promiskuität (s. 1.3), auf evolutiven Prozessen beruht, sollte diese experimentelle Methodik prinzipiell zur Beantwortung der Frage „Kann man eine Enzymaktivität im Labor in andere überführen?“ geeignet sein.

1.4.1 Gerichtete Evolution

Der Begriff „gerichtete Evolution“ wird in der Enzymtechnologie für die Erzeugung neuer Proteinvarianten durch Methoden verwendet, die zu zufälligen Mutationen in Proteinen führen, unabhängig von Vorkenntnissen über Struktur- und Katalysemechanismus. Man unterscheidet zwischen nicht-rekombinativen und rekombinativen Methoden (Abb. 1.11). Beide Ansätze erzeugen zufällige Veränderungen in der DNA-Sequenz, die zu Änderungen in der Aminosäure-Sequenz und damit in der Proteinstruktur führen können. Gesteuert wird der Prozess

(daher der Name gerichtete Evolution) durch Selektionsdruck, welcher im Labor in Form eines Screenings (s. 1.4.1.2) artifiziiell generiert wird. Im Screening-Verfahren werden aus dem Pool zufällig veränderter Enzymvarianten die besten, d.h. die Varianten mit der gewünschten Veränderung/Verbesserung identifiziert. Das bekannteste Beispiel für eine rekombinative Methode ist das DNA-Shuffling, bei dem verschiedene Gene fragmentiert und mit PCR-Methoden wieder zusammengesetzt werden. In dieser Arbeit wurden jedoch ausschließlich nicht-rekombinative Methoden verwendet, bei denen die DNA-Sequenz eines einzigen Gens mutiert wird.

In Abb. 1.11 sind die wichtigsten experimentellen Strategien sowie das generelle Prinzip der gerichteten Evolution dargestellt.

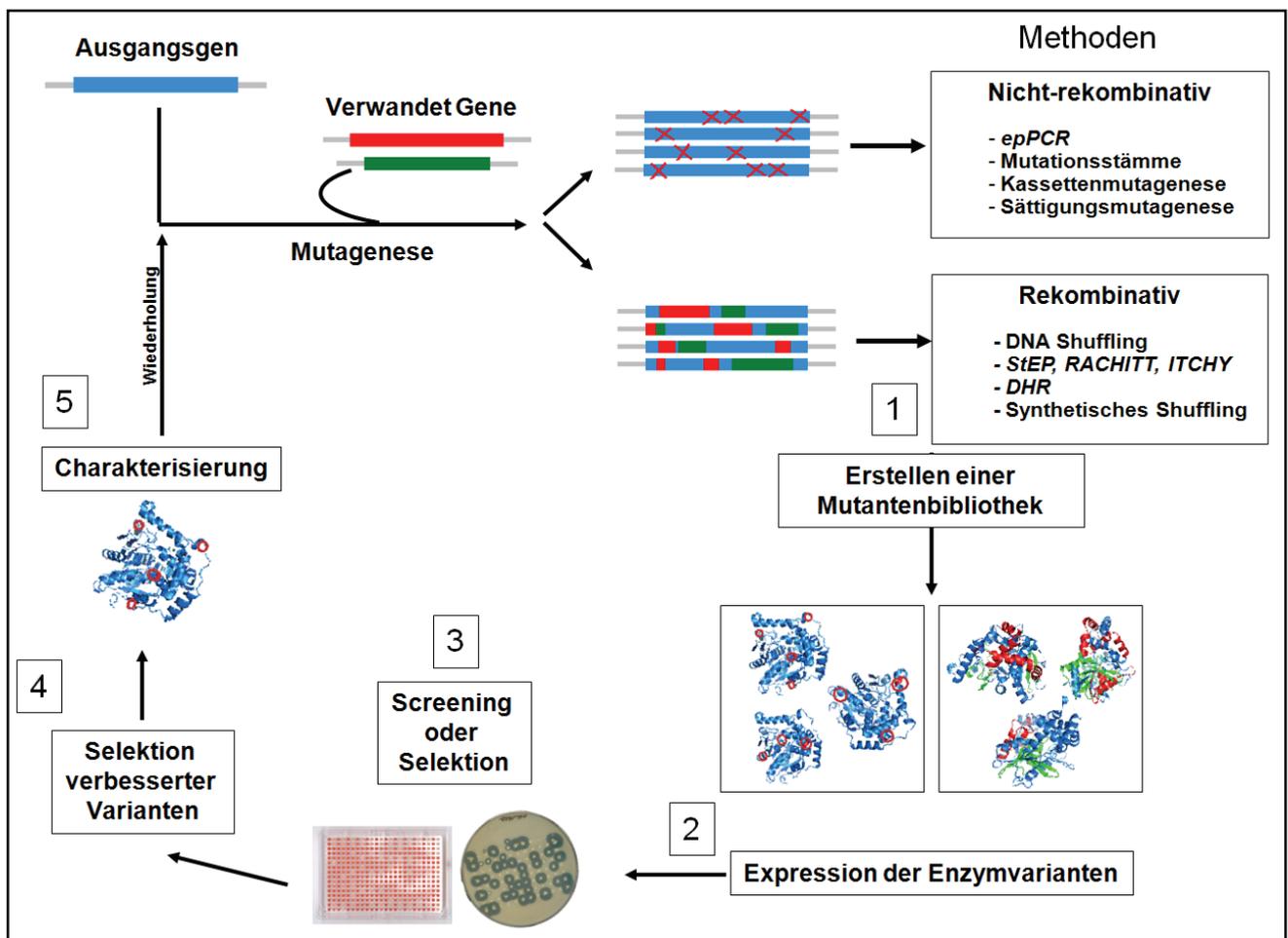


Abb. 1.11: Schematische Darstellung der prinzipiellen Strategien welche in der gerichteten Evolution benutzt werden.

Einleitung

Die wichtigsten Eckpunkte für den Erfolg der gerichteten Evolution sind somit eine effiziente Mutationsstrategie, ein funktionelles Expressionssystem und ein schnelles und zuverlässiges Screeningverfahren.

1.4.1.1 Die fehlerhafte PCR ist eine der Standardmethoden in der gerichteten Evolution

Seit vielen Jahrzehnten benutzt man, teilweise mit großem Erfolg, konventionelle (nicht molekularbiologische) evolutive Methoden zur Erzeugung von Mutationen (genetische Diversität) auf Genebenen. So wurden z.B. mutagene Agenzien wie Chemikalien und UV-Strahlung zur Anpassung von Organismen an bestimmten Problemstellungen im Labor eingesetzt ^[135, 136].

Seit der Entwicklung der Polymerasen-Kettenreaktions (PCR für „*polymerase chain reaction*“)- Technik durch Mullis ^[137, 138], wird jedoch vor allem diese Methodik zur Erzeugung von genetischer Diversität eingesetzt. Heute findet die fehlerhafte PCR (epPCR für „*error prone*“ PCR) ^[139-145] am häufigsten Verwendung. Diese Methode erlaubt es auf zufällige Weise Basenpaar-Mutationen im Zielgen einzuführen, welche sich auf Proteinebene in der Veränderung der Primärsequenz des Enzymes äußern. Prinzipiell sollten damit also sämtliche Aminosäure-Positionen im Zielprotein randomisiert werden können. Dies eröffnet jedoch gleichzeitig eine unglaubliche Anzahl möglicher Varianten, die auf verbesserte Eigenschaften gescreent werden könnten oder müssten, womit der Screeningaufwand je nach Proteingröße sehr schnell ins Unermessliche wächst. Ein komplett-randomisiertes Protein bestehend aus z.B. 100 Aminosäuren kann in $20^{100} = 1,3 \times 10^{130}$ verschiedenen Formen vorliegen, da jede der 20 proteinogenen Aminosäuren prinzipiell an jeder der 100 Positionen des Proteins vorkommen kann. Diese Anzahl aller möglichen Varianten eines Proteins bezeichnet man als Proteinsequenzraum.

Daraus folgt, dass je nach Grad der Diversität unterschiedlich große Bibliotheken gescreent werden müssen, um den kompletten Proteinsequenzraum abzudecken. Die Anzahl der möglichen Varianten **N** bei einem Enzym bestehend aus **X** Aminosäuren bei **M** randomisierten Positionen kann mit folgender Formel berechnet werden ^[146-148].

$$N = \frac{19^M X!}{[(X-M)! M!]}$$

Gleichung 1: M = Anzahl der ausgetauschten Aminosäuren; X = Sequenzlänge; N = Bibliotheksgröße

Falls also in einem Mutagenese-Experiment zwei Aminosäuren zufällig ausgetauscht werden, entsteht bei einer Sequenzlänge von beispielsweise 300 Aminosäuren eine theoretische Bibliotheksgröße von über sechs Millionen Enzymvarianten ^[149].

Diese Zahlen zeigen deutlich, dass mit heutigen Testsystemen diese Art von Bibliotheken unmöglich komplett gescreent werden kann und dass der mögliche Proteinsequenzraum nur zu einem Bruchteil durchsucht werden kann. Der zeitlimitierende Faktor bei der gerichteten Evolution ist damit das Screeningverfahren. Es müssen also Screeningsysteme entwickelt werden, welche praktisch, schnell und damit möglichst unkompliziert oder aber automatisierbar sind, um eine möglichst große Anzahl von Varianten in möglichst kurzer Zeit untersuchen zu können ^[150, 151].

Es ist also sinnvoll, entweder die Anzahl der Varianten zu beschränken oder jedoch ein extrem effizientes Screeningverfahren zur Verfügung zu stellen.

Eine Möglichkeit, den Sequenzraum einzuschränken, ist die Festlegung der zu mutierenden Bereiche im Gen. Hierzu werden vor allem die Kassettenmutagenese ^[152, 153] das Einführen von Mutationen nur in einem bestimmten Abschnitt der Sequenz ^[154, 155] oder die Sättigungsmutagenese verwendet ^[49, 156]. Bei der Sättigungsmutagenese wird nur eine einzige Aminosäure gegen alle anderen möglichen proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht. Im Folgenden werden die wichtigsten Grundlagen zu Screening- und Selektionssystemen beschrieben.

1.4.1.2 Screening und Selektion- „Survival of the fittest“

Prinzipiell werden zwei Methoden zur Identifizierung interessanter Varianten in großen kombinatorischen Bibliotheken von Varianten unterschieden: die Selektion ^[151] und das Screening ^[157]. Der prinzipielle Unterschied zwischen den beiden Ansätzen ist in Abb. 1.12 schematisch dargestellt.

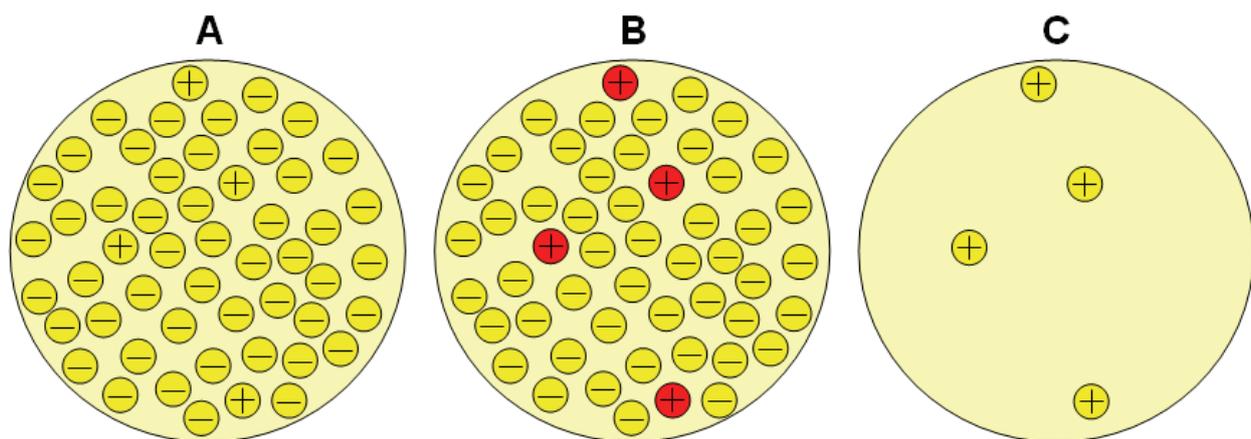


Abb. 1.12: Unterschiedliche Methoden zur Identifizierung von Varianten mit den gewünschten Enzymaktivitäten. A. *Zufallsscreening*: Jede einzelne Kolonie muss untersucht werden, um die enzymatisch aktiven Klone (+) von den nicht aktiven (-) zu unterscheiden. B. *Erleichtertes Screening*: Man kann aktive von inaktiven Klonen anhand ihres charakteristischen Phänotyps unterscheiden (rot) C. *Selektion*: Durch die Wahl eines Selektionssystems ist es möglich aktive Klone direkt zu identifizieren. Dies basiert in der Regel auf einem selektiven Wachstumsvorteil der aktiven Klone gegenüber Klonen die inaktive Varianten tragen ^[150].

Screening

Der Begriff Screening beschreibt eine (halb-)quantitative Bestimmung einer (oder mehrerer) spezifischer Messgrößen, wobei die Individuen ohne Selektionsdruck einzeln analysiert werden und die Identifizierung der verbesserten Enzymvarianten über den direkten Vergleich der Messwerte erfolgt ^[158, 159].

Das Screening nimmt im Prozess der gerichteten Evolution eine entscheidende Stellung ein, da es oftmals der Schritt ist, der die Größe einer zu durchsuchenden Enzymbank limitiert. Eine Vielzahl etablierter analytischer Methoden bietet sich als Grundlage für ein Screeningverfahren an, wobei keine ist universell einsetzbar.

Im Vergleich zu selektiven Testsystemen sind sie einfacher zu entwickeln und insbesondere zur Durchmusterung von Mutantenbibliotheken geeignet, die durch gerichtete Evolution erzeugt wurden, denn hierbei weisen üblicherweise alle Varianten die gleichen Fähigkeiten auf, so dass eine Differenzierung nur über die unterschiedliche Ausprägung dieser Eigenschaften möglich ist. Auch bei der Suche nach neuen Biokatalysatoren kann die Anzahl der im ersten Schritt selektierten Enzyme durch Bestimmung einer spezifischen Messgröße weiter reduziert werden.

Die Durchmusterung einer Mutantenbibliothek mit $10^3 - 10^6$ Kandidaten erfordert Verfahren, die einen hohen Durchsatz ermöglichen (Hochdurchsatztestsysteme; HTS-Systeme). Klassische Methoden zur Produktanalyse von enzymatischen Reaktionen wie pH-Stat, Flüssig- oder Gas- chromatographische Nachweisverfahren sind in diesen Dimensionen nicht mehr einsetzbar, sie kommen allenfalls zur nachträglichen Verifikation des Auswahlverfahrens in Frage. Zudem wurde schon früh erkannt, dass Standard-Testsysteme nicht immer das wahre Potenzial eines Biokatalysators aufzeigen und so die Auswahlverfahren stets an das aktuelle Problem angepasst werden müssen^[160]. Die Entwicklung von HTS-Systemen ist nur an Fortschritte im Bereich der Laborautomation gebunden. Robotergesteuerte Analysen erhöhen die Reproduzierbarkeit und Auswertungsgeschwindigkeit des Testsystems enorm. Eine sehr wichtige Rolle spielt hierbei auch die daraus entstehende Möglichkeit, die Mengen der benötigten Testkomponenten (Biokatalysator, Substrat, Kofaktoren, Lösungen) drastisch reduzieren zu können. Dies erlaubt die Durchführung einer größeren Anzahl von Reaktionen unter identischen Bedingungen^[161].

Das Screeningverfahren zur Identifizierung eines neuen oder verbesserten Enzyms sollte im Idealfall auf dem realen/relevanten Substrat basieren. Oft werden jedoch Modellverbindungen, wie z.B. ein Chromophor an Stelle von Hydroxylresten verwendet, um absorptions- oder fluoreszenzspektrometische Verfahren einsetzen zu können, die sich durch hohe Geschwindigkeit und einfache Miniaturisierbarkeit auszeichnen. Diese Modellverbindungen müssen dem eigentlichen Zielsubstrat sehr ähnlich sein, um ein erfolgreiches Testsystem zu gewährleisten^[162].

Ein Verfahren mit abgewandelten, nur mittelbar ähnlichen Testsubstanzen führt dagegen häufig in eine „falsche“ Richtung^[159, 163, 164].

Selektion

Die genetische Selektion ist zurzeit vielleicht die effizienteste zur Verfügung stehende Technik, um große Populationen biologischer Makromoleküle zu analysieren^[150].

Selektionssysteme erlauben im Vergleich zu Screeningsystemen die Betrachtung wesentlich größerer Bibliotheken, dafür sind die Aussagen, die sie treffen eher qualitativer Natur. Selektive Testsysteme sind auf dem Gebiet der Molekularbiologie

Einleitung

weit verbreitet und das beste Beispiel ist die Zugabe eines Antibiotikums in ein Kulturmedium, das sicher stellt, dass selektiv nur die Bakterien wachsen, die innerhalb der Transformation ein Plasmid aufgenommen haben, welches für die entsprechende Resistenz codiert ^[150].

Weiterhin führt die Kopplung der gewünschten Enzymaktivität an eine zusätzliche Nahrungsquelle bei Verwendung von Minimalmedien zu einem verstärkten Wachstum der positiven Klone (größere Kolonien) ^[165]. Diese Arten von phänotypischer Selektion sind aber auf die Identifizierung von Biokatalysatoren beschränkt, die eine direkte biologische Relevanz besitzen wie z.B. für das Überleben eines Klons. Damit stellen Selektionsysteme das Labor-Analogon zu Darwins „survival of the fittest“ Hypothese dar.

Eine zusätzliche Einschränkung besteht darin, dass es Mikroorganismen „gelernt“ haben, sich schnell an drastische Änderungen des Umgebungsmilieus anzupassen. Aus diesem Grund führt ein angelegter Selektionsdruck oft zu weiteren Mutationen, die nicht mit der gewünschten enzymatischen Aktivität korrelieren. So kann z.B. die Erhöhung der Expressionsrate eines eigentlich ungeeigneten Enzyms einen verbesserten Biokatalysator vortäuschen ^[158, 166].

Neben der zuvor beschriebenen *in vivo* Selektion, die auf einem Wachstumsvorteil spezifischer Mutanten beruht, gibt es auch Methoden, welche die qualitative Unterscheidung der einzelnen Individuen einer Bibliothek ermöglichen. Ein Beispiel hierfür ist der Tributyrin-Test auf Lipase und Esterase-Aktivität, bei dem aktive Klone durch Klärhöfe identifiziert werden können. Vergleichbare Systeme basieren auf Farbreaktionen auf Grund von Änderungen des pH-Werts oder der Freisetzung eines Chromophors ^[167, 168]. In diesen Fällen sind somit zwar auch noch andere Kolonien vorhanden, die Positiven lassen sich aber ähnlich leicht auswählen. Auch in diesen Fällen ist keine Quantifizierung möglich ^[169].

Wie angedeutet bilden diese Tests bereits den Grenzbereich zum Screening und fallen streng genommen nicht mehr unter den Begriff Selektion ^[150].

Der wichtigste Vorteil der Selektion gegenüber dem Screening ist die Möglichkeit der simultanen Analyse von wesentlich mehr Varianten. Dies basiert auf der Tatsache, dass uninteressante Varianten gar nicht erst in Erscheinung treten ^[150].

Mit den besten zurzeit verfügbaren Screeningverfahren (wie bei der Benutzung fluoreszierenden oder chromogenen Substanzen) beträgt die maximal prüfbare Zahl an Varianten ungefähr 10^5 , dagegen können durch genetische Selektion bis zu 10^{10}

Klone in einem einzigen *in vivo* Experiment in *E. coli* Zellen beurteilt werden. Trotzdem ist es nicht immer trivial, geeignete Selektionsstrategien für beliebige katalytische Umsetzungen zu entwickeln ^[150].

1.4.2 Rationales Proteindesign

Beim rationalen Proteindesign wird mittels bioinformatischen (*in silico*) Methoden versucht, Vorhersagen darüber zu machen, welche Veränderungen der Primärstruktur eines Enzyms zu einer Verbesserung oder Änderung der katalytischen Eigenschaften führen. Neben der Kenntnis der Aminosäuresequenz sind hierfür auch die 3D-Struktur (Röntgenstrukturanalyse oder genaues Strukturmodell) des Enzyms sowie Kenntnisse der mechanistischen und dynamischen Vorgänge während der Katalysereaktion nötig (Abb. 1.13).

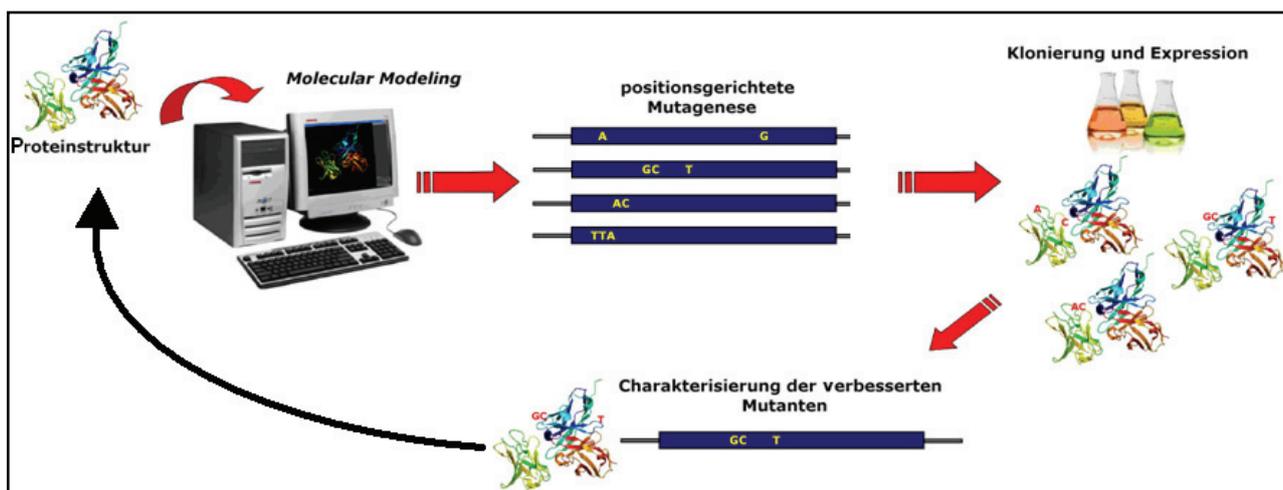


Abb. 1.13: Schematische Darstellung der prinzipiellen Vorgehensweisen beim rationalen Proteindesign.

Die Komplexität dieser Beziehung lässt sich daran ermessen, dass Proteine meist am Rand zur Instabilität stehen, d.h. der räumliche Aufbau des aktiven Enzyms ist das Ergebnis aller intramolekularen Wechselwirkungen, wobei z.B. schon die Änderung einzelner Wasserstoffbrücken zu einem Konformations-Wechsel und damit zum Aktivitätsverlust führen kann. Somit ist auch die Auswirkung einer Merkmalsänderung (z.B. erhöhte Enantioselektivität) auf eine andere Eigenschaft (z.B. Stabilität) kaum vorhersagbar ^[170, 171].

Da in den letzten Jahren eine immer größere Anzahl an Strukturen und Mechanismen einzelner Enzyme aufgeklärt wurde, befindet sich das rationale

Einleitung

Proteindesign in einem rasanten Aufschwung. Gestützt wird dieser Trend durch die Postulierung eines modularen Aufbaus vieler Biokatalysatoren, wodurch der Erfolg des rationalen Proteindesigns erheblich erhöht werden könnte ^[171-173].

Bis heute wurden die besten Ergebnisse des rationalen Designs in Kombination mit Methoden der Zufallsmutagenese erzielt. Dieser Ansatz stellt eine aussichtsreiche Perspektive für die Zukunft dar ^[171].

Unterstützt wird dieser Anspruch durch neueste Erkenntnisse, dass die derzeit bekannten Enzyme nur aus wenigen gemeinsamen Vorläufern abstammen und somit die unterschiedlichen Aktivitäten auf geringen Modifikationen in den Strukturen der aktiven Zentren beruhen ^[174].

1.5 Aufgabenstellung

Wie einleitend beschrieben, weist die Enzymfamilie der α/β -Hydrolasen ein weitgehend konserviertes strukturelles Gerüst auf, katalysiert aber eine Vielzahl von enzymatischen Reaktionen. Viele dieser Enzyme sind eingehend beschrieben sowie bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften, ihrer dreidimensionalen Struktur und ihres Reaktionsmechanismus intensiv charakterisiert. Trotz dieser umfangreichen Datenlage sind die genauen Struktur-Funktionsbeziehungen zwischen den einzelnen Enzymklassen noch unklar. Die zentralen Fragestellungen „Was macht die Lipase zur Lipase?“ oder „Was genau unterscheidet die Lipase von der Epoxidhydrolase?“ können noch nicht umfassend beantwortet werden. Es liegt auf der Hand, dass das Fernziel, die Struktur bzw. die Funktion und den Mechanismus eines Enzyms direkt aus seiner Sequenz ableiten zu können, nicht im Laufe kurzer Zeit erreicht werden kann. Das Hauptziel dieser Arbeit war es daher, mit der Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen von α/β -Hydrolasen einen Beitrag zum Verständnis dieser Zusammenhänge zu leisten. Die dahinter stehende Strategie sollte der Versuch sein, eine Enzymfunktion in eine andere umzuwandeln und so Ansätze zur Beantwortung der oben formulierten Fragen zu finden. Die verwendeten Methoden, der randomisierte Ansatz zur Veränderung eines Enzyms durch gerichtete Evolution, der zielgerichtete Ansatz durch rationales Design sowie Kombinationen erfordern leistungsfähige Testsysteme.

Dementsprechend liegt der Fokus des ersten Teilabschnitts (3.1) auf der Entwicklung, Etablierung und Anpassung von hochdurchsatzfähigen Aktivitätstests

für verschiedene α/β -Hydrolase-Enzymfunktionen. Mit Hilfe dieser Enzymtests sollte danach das oben formulierte Hauptziel angegangen werden: Die Einführung anderer Aktivitäten bzw. Nebenaktivitäten in ein Enzym.

Im zweiten Abschnitt (3.2) werden Methoden der gerichteten Evolution verwendet und auf das gesamte Spektrum der α/β -Hydrolaseaktivitäten gescreent. Dagegen wurde im dritten Teil (3.3) der rationale Ansatz gewählt: Der zielgerichtete Aspekt bezieht sich hierbei einerseits auf die Auswahl der zu verändernden Aminosäuren, so ist es z.B. sinnvoll, Veränderungen im aktiven Zentrum sowie der katalytischen Triade herbeizuführen. Darüber hinaus soll im Vorfeld geplant werden, welche anderen Enzymaktivitäten einzuführen sind, so dass nicht auf alle Funktionen getestet werden muss. Weiterhin kann eine auf diesen rationalen Ansatz aufgesetzte ungerichtete Strategie sinnvoll sein, um eine Feinanpassung der neuen Struktur vorzunehmen.

Durch diese Ansätze identifizierte Enzymvarianten mit neuen oder veränderten Aktivitäten und/ oder Nebenaktivitäten sollten im nächsten Schritt näher charakterisiert werden, damit theoretische Erklärungsansätze für die veränderten Eigenschaften gefunden werden können.



2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Antibiotika und Enzyme wurden von den folgenden Firmen in p.a.-Qualität bezogen und sie sind in Tab.2.1 aufgeführt:

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Enzyme und Chemikalien.

Enzym	Firma
Pfu-Polymerasen	Stratagene (Heidelberg)
Taq-Polymerasen	Fermentas (St. Leon-Roth)
Goldstar-Taq-Polymerasen	Eurogentec (Seraing,Belgien)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Roth) und Roche Diagnostics (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Antibiotika	Serva (Heidelberg)
Chemikalien	Fluka (Sternheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Medienkomponenten	Invitrogen (Karlsruhe), Oxoid (Wesel), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.2 Bakterienstamm und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und alle verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide sind in Tab.2.2, Tab.2.3, Tab. 2.4 und Tab.2.5 aufgeführt.

Tab. 2.2: Der verwendete Bakterienstamm.

Stamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
E. coli BL21(DE3)	<i>F- ompT hsdS_B(rB⁻mB⁻) gal dcm (λclts857 ind1Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>	Studier(1986) ^[175] Novagen (Madison, USA)
E. coli XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac^fZM15 Tn10 Tet^r]</i>	Bullock (1987) ^[176] Stratagene (Heidelberg)
E. coli DH5α	<i>F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan (1983) ^[177] Invitrogen (Karlsruhe)

Material und Methoden

Tab. 2.3: Der verwendete Wildtyp-Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	DSM 43296	DSMZ
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	DSM 432	DSMZ

Tab. 2.4: Übersicht der verwendeten Vektoren für *E. coli*.

Vektor	genetische Marken	Bezugsquelle
pET22b(+)	ColE1 P _{T7Φ10} /lacI ^f <i>peIB</i> -Signalsequenz „His-Tag“ Amp ^r	Novagen (Madison, USA)
pET19b	ColE1 P _{T7Φ10} /lacI ^f Amp ^r „His-Tag“	Novagen (Madison, USA)
pQE60	ColE1 PT5 <i>lacO</i> Amp ^r „His-Tag“	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Tab. 2.5: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide.

Rekombinante Plasmide	Beschreibung	Referenz
pET22lipA	pET22b(+) mit 557 bp <i>EcoRV</i> / <i>SacI</i> Fragment aus pUlipA (<i>peIB</i> - <i>lipA</i> -Fusion, Plac kontrolliert).	Eggert (2001) ^[47] Funke <i>et al.</i> (2003) ^[178]
pET19lipB	pET19b mit 549 bp <i>NdeI</i> / <i>XhoI</i> <i>lipB</i> -PCRFragment, ohne Signalsequenz	Rosenbaum (2003) ^[179]
pET22lipB	pET22b(+) mit 549 bp <i>NdeI</i> / <i>XhoI</i> <i>lipB</i> -PCRFragment	Rosenbaum (2003) ^[179]
pQE-EH	pQE60 mit 1266 bp <i>BglIII</i> / <i>EcoRI</i> Epoxidhydrolase PCR Fragment	Torre (2003) ^[85]
pETmut-P1C8	pET22lipA mit Punktmutationen für M18G Substitution	diese Arbeit
pETmut-P1D5	pET22lipA mit Punktmutationen für M18C Substitution	diese Arbeit
pETmut-P1E6	pET22lipA mit Punktmutationen für H10P Substitution	diese Arbeit
pETmut-P3A1	pET22lipA mit Punktmutationen für H10P Substitution	diese Arbeit
pETmut-P3A11	pET22lipA mit Punktmutationen für H10A Substitution	diese Arbeit
pETmut-P1D12	pET22lipA mit Punktmutationen für H10A Substitution	diese Arbeit
pETmut-P1F4	pET22lipA mit Punktmutationen für I12T Substitution	diese Arbeit
pETmut-P1F8	pET22lipA mit Punktmutationen für Iso12Ala Substitution	diese Arbeit

pETmut-P1F3	pET22lipA mit Punktmutationen für I12A Substitution	diese Arbeit
pETmut-P3C10	pET22lipA mit Punktmutationen für G14E Substitution	diese Arbeit
pETmut-P3D3	pET22lipA mit Punktmutationen für Gly14S Substitution	diese Arbeit
pETmut-P2A12	pET22lipA mit Punktmutationen für D18L Substitution	diese Arbeit
pETmut-P5B4	pET22lipA mit Punktmutationen für D18C Substitution	diese Arbeit
pETmut-P2G9	pET22lipA mit Punktmutationen für T45E Substitution	diese Arbeit
pETmut-P2H4	pET22lipA mit Punktmutationen für T45E Substitution	diese Arbeit
pETmut-P4A1	pET22lipA mit Punktmutationen für V71S Substitution	diese Arbeit
pETmut-P4A2	pET22lipA mit Punktmutationen für V71S Substitution	diese Arbeit
pETmut-P4A8	pET22lipA mit Punktmutationen für V71S Substitution	diese Arbeit
pETmut-P5G1	pET22lipA mit Punktmutationen für A105R Substitution	diese Arbeit
pETmut-P5G3	pET22lipA mit Punktmutationen für A105I Substitution	diese Arbeit
pQE_Mut1	pQE-EH mit Punktmutationen für D192S Substitution	diese Arbeit
pQE_Mut2	pQE-EH mit Punktmutationen für F196A Substitution	diese Arbeit
pQE_Mut3	pQE-EH mit Punktmutationen für R219A Substitution	diese Arbeit
pQE_Mut4	pQE-EH mit Punktmutationen für D192S/F196A Substitution	diese Arbeit
pQE_Mut5	pQE-EH mit Punktmutationen für D192S/R219A Substitution	diese Arbeit
pQE_Mut6	pQE-EH mit Punktmutationen für F196A/R219A Substitution	diese Arbeit
pQE_Mut7	pQE-EH mit Punktmutationen für D192S/F196A/R219A Substitution	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma THERMO (Ulm) bezogen und sind im Detail in den Tab. 2.6 aufgeführt.

Material und Methoden

Tab. 2.6: Übersicht der für die verwendeten Oligonukleotide.

Name	DNA-Sequenz (5'→3' Richtung)	Merkmale
pBSLA_up	ctt tgt tag cag ccg gat ctc agt ggt ggt g	HindIII
pBSLA_dwn	gcg gat aac aat tcc cct cta gaa ata att ttg tt	XbaI
pqe-up_Eh	gat aac aat ttc aca cag aat tca tta aag agg ag	EcoRI
pqe-down_Eh	cca agc tca gct aat taa gct tag tga tgg tga tg	HindIII
eh_mut192fwr	cca aca aag cta cca atg cta cct ccc tga ata ata taa c	Asp192Aer
eh_mut192rev	gtt ata tta ttc agg gag gta gca ttg gta gct ttg ttg g	Asp192Aer
eh_mut219fwr	cct gtg cgc aat ggc ggc tcc ccc tga gg	Arg219Ala
eh_mut219rev	cct cag ggg gag ccg cca ttg cgc aca gg	Arg219Ala
eh_short_196fwr	gag gta gca ttg gta gcg ctg ttg gac gac tgt tgg	Phe196Ala
eh_short_196rev	cca aca gtc gtc caa cag cgc tac caa tgc tac ctc	Phe196Ala
eh_mut192-196_fwr	ggt tat att att cag gga ggt agc att ggt agc gct gtt gga cga ctg ttg gg	Asp192Ser / Phe196Ala
eh_mut192-196_rev	ccc aac agt cgt cca aca gcg cta cca atg cta cct ccc tga ata ata taa cc	Asp192Ser / Phe196Ala

2.4 Nährmedien

LB (Luria-Bertani) Medium	M1-Medium	M65-Medium
Trypton 10 g	Peptone 5 g	Glucose 4 g
NaCl 5 g	Fleischextrakt 3 g	Hefeextrakt 4 g
Hefeextrakt 5 g	ad 1 L A. Dest., pH-Wert auf 7,0 einstellen (mit NaOH)	Malzextrakt 10 g
ad 1 L A. Dest., pH-Wert auf 7,0 einstellen (mit NaOH)		CaCO ₃ 2 g (nur Festmedium)
		ad 1 L A. Dest., pH-Wert auf 7,2 einstellen (mit NaOH)

M9 Lösungen	
M9-Lösung 1	40 g/l Glukose
M9-Lösung 2	25 g/l MgSO ₄ x 7H ₂ O
M9-Lösung 3	2 g/l CaCl ₂ 2H ₂ O
M9-Lösung 4a mit NH ₄	70 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; 30 g/l KH ₂ PO ₄ ; 5 g/l NaCl; 10 g/l NH ₄ Cl
M9-Lösung 4b ohne NH ₄	70 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; 30 g/l KH ₂ PO ₄ ; 5 g/l NaCl

Material und Methoden

M9-Medium (Minimal Medium)	
Lösung 1	100 ml
Lösung 2	10 ml
Lösung 3	10 ml
Lösung 4a	100 ml
ad 1L A. Dest. (steril)	

Selective Medium - Base	
Lösung 2	10 ml
Lösung 3	10 ml
Lösung 4b	100 ml
Thiamin (1M)	1 ml
Spurenlösung	1 ml
Agar	1,5 %
ad 1L A. Dest. (steril)	

Spurenlösung	
Nitrilotriacetic acid	1,5g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,0 g
MnSO ₄ x 2 H ₂ O	0,5 g
NaCl	1,0 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,01 g
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,02 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,3 mg
ad 1L A. Dest. (steril)	

Die Medien wurden vor der Anwendung autoklaviert (20 min bei 120°C). Nicht-hitzebeständige Chemikalien wurden steril filtriert [Porendurchmesser 0,2 µm Schleicher & Schuell (Dassel)] und die autoklaviertem Medien nach dem Erkalten hinzugesetzt. Zur Herstellung von Festmedien wurde dem entsprechenden Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Material und Methoden

2.5 Anzucht und Lagerung von Bakterien

E. coli Stämme wurden in LB-Medium angeimpft und bei 37 °C bebrütet. Die Anzucht von *Rhodococcus erythropolis* erfolgte in M65-Medium und *Xanthobacter autotrophicus* in M1-Medium im Schüttelkolben bei 30 °C, 120 UpM für 24 Stunden oder auf Agarplatten.

Überexpressionskulturen wurden in LB-Medium angezogen. Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden im Reagenzglas auf einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg) angezogen. Flüssigkulturen größerer Volumina wurden in Erlenmeyerkolben auf einem Inkubationsschüttler (GFL, Burgwedel) bei 120 UpM bebrütet. Als Übernachtskulturen wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 18 h bebrütet wurden. Das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer Kolbens betrug maximal 1:5. Die Hauptkulturen wurden jeweils aus einer Übernachtskultur mit 1/100 Volumen angeimpft. Die Expression der heterologen Gene durch die T7-RNA-Polymerase wurde bei Erreichen einer OD₅₈₀ von 0,6 – 0,8 durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,4-1 mM) induziert. Stämme mit Plasmid-kodierten Resistenzmarkern wurden stets unter Selektionsdruck durch Zugaben von 100 µg/ml Ampicillin oder Carbenicillin kultiviert. Zur Durchmusterung von Enzybibibliotheken wurden Plasmid-tragende *E. coli* BL21(DE3)-Klone in Deepwells-MTP angezogen. Dabei betrug das Kulturvolumen 1 ml. Zur Expression der heterologen Gene wurde die Expression der T7-RNA-Polymerase bei dem Erreichen einer OD_{580nm} von 0,5-0,7 mit IPTG (Endkonzentration 0,4 mM) induziert.

Zur dauerhaften Lagerung der Stämme wurden Übernachtskulturen mit 8-10 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C tiefgefroren.

2.6 Isolierung von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde nach der von Birnboim & Doly (1979) ^[180] beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder unter Verwendung von Plasmid-Isolationskits der Firma Qiagen (Hilden) und Eppendorf (Hamburg) nach Herstellerangaben durchgeführt.

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

2.7 Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA und der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Dabei wurde die von Sambrock *et al.* 1989^[181] beschriebene Methode angewendet.

TBE-puffer 0,5X (pH 8,3)		Probenpuffer Bromophenol blue 5x		Ethidiumbromidlösung	
Tris-Base	45 mM	EDTA	100 mM	Ethidiumbromid	0,5 % (w/v)
Borat	45 mM	Glycerol	50 %		
EDTA	1,25 mM	Bromophenol blue	0,05 %(w/v)		

Als Größtstandard für die DNA-Gele wurde die „1kb-ladder“ von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Zur Dokumentation der Gelelektrophorese-Ergebnisse wurde das Videodokumentationssystem „EagleEye II“ der Firma Stratagene (Heidelberg) genutzt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep Gelcleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

2.8 In vitro Rekombination von DNA

Die Restriktion und die Ligation von DNA-Fragmenten wurde nach Sambrock *et al.* (1989)^[181] sowie nach den Angaben der Hersteller der jeweiligen Enzyme durchgeführt. Die Reaktionen wurden in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.9 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Als Transformationskompetenz wird die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden nach zwei Methoden durchgeführt.

Material und Methoden

2.9.1 Chemische Transformation von *E. coli*

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden nach der RbCl-Methode von Hanahan (1983) durchgeführt [177].

Zellen aus einer Dauerkultur wurden auf einer LB-Platte ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie in 5ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 40 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium mit 0,8 ml Mg²⁺ Mix (0,5 M MgCl₂ / 0,5 M MgSO₄) wurden mit 0,4 ml der Kultur angeimpft und bis OD = 0,5-0,8 bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde 5min auf Eis gekühlt und 15 min bei 4000 UpM und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 40 ml eiskaltem TMF puffer resuspendiert und nach 5 min Inkubation auf Eis 10 min bei 4000 UpM und 4°C abzentrifugiert. Nach sorgfältigem entfernen des Überstands wurden die Zellen in 4ml eiskaltem TMF plus 1 ml Glycerin resuspendiert und die Zellen wurden in Volumina zu je 100 µl in vorgekühlte Eppendorfs aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

TMF Puffer	
MnCl ₂	40 mM
CaCl ₂	100 mM
RbCl	50 mM

Nachdem sie auf Eis aufgetaut wurden, wurden 100 µl der kompetenten *E. coli*-Zellen mit bis 5 µl Ligationsansatz versetzt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde dieser Ansatz 1,5 min bei 42°C, dann wieder 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 900 µl LB-Medium aufgenommen und vor dem Ausplattieren auf LB-Platten (Selektivmedium) 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

2.9.2 Elektrotransformation von *E. coli*

Die Herstellung elektrokompeter *E. coli* Zellen sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden nach Dower *et al.*, (1988) durchgeführt [182].

500 ml LB-Medium wurden mit 3 ml einer Übernachtskultur inokuliert. Bei einer OD₅₈₀ = 0,4– 0,7 wurden die Zellen 20 min auf Eis gekühlt und anschließend pelletiert (4000 UpM, 15 min, 4°C). In drei Schritten wurde das Pellet mit abnehmenden

Volumina eiskaltem, 10% Glycerol gewaschen (500 ml, 250 ml und 20 ml) und nach einer letzten Zentrifugation in 1 ml eiskaltem 10% Glycerol resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots (50 µl) bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Elektroporation wurde mit Hilfe des MicroPulsers (BioRad, München) durchgeführt gemäß dem durch den Hersteller zur Verfügung gestellten Protokoll (BioRad, München).

Beim Elektroporationsverfahren werden die Zellmembranen der in Suspension befindlichen *E. coli*-Zellen durch kurze elektrische Pulse einer hohen Feldstärke von ca. 2,5 kV/cm für DNA-Moleküle durchlässig gemacht. Es wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis mit 1-2 µl einer Plasmidpräparation gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten gefüllt. Diese Küvetten wurden in eine Elektroporationsanlage des Typs MicroPulser (Biorad, München) gestellt und die Zellen einer Spannung von 2,5 kV ausgesetzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit 900 µm LB-Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, damit sich die Zellen regenerieren konnten. Dadurch erhalten die Zellen die mit dem Plasmid übertragene Resistenz. Die Zellen wurden dann auf LB-Agar (Selektivmedium) ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.10.1 Standard-PCR-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion („*Polymerase Chain Reaction*“, PCR) wurde erstmalig und gleichzeitig bei Saiki *et al.* ^[137] und Mullis *et al.* ^[136] 1985 beschrieben, ist eine Methode zur in vitro Vermehrung ("Amplifikation") definierter DNA- Stücke mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Sie erlaubt den schnellen, empfindlichen Direktnachweis kleinster Mengen von DNA oder RNA ^[136].

Die PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten:

Denaturierung: der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge;

Anlagerung (Annealing): von synthetischen Oligonukleotiden (Primern) an die flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereiches;

Polymerisierung (Neubildung) der doppelsträngigen DNA - ausgehend von den Primern – mit Hilfe des Enzyms DNA Polymerase sowie der vier Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Standardmäßig wurden PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

Material und Methoden

1 ng Plasmid-DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Taq*- oder *Pfu*-DNA-Polymerase. Die Reaktionen wurden in den $MgCl_2$ oder $MgSO_4$ enthaltenden Puffern der Hersteller durchgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Automaten („Mastercycler gradient“) der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt.

Dabei kam folgendes Programm zur Anwendung:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	1min	35
Annealing	X°C	1min	
Extension	72°C	1,5 min	
Finale Extension	72°C	10 min	1

Die Annealing-Temperatur (X) wurde dabei den entsprechenden Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide angepaßt. Zur Reinigung von PCR-Produkten wurde das „gel cleanup“- Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellervorschrift angewendet.

2.10.2 Fehlerhafte PCR („error prone PCR“ epPCR)

Es wurde drei Protokolle für epPCR durch angewandt (s. Tab. 2.7).

Tab. 2.7: Experimentelle Bedingungen der epPCR zum zufälligen Basenaustausch.

Fehlerrate (Basensubstituon/Gen)	epPCR Protokoll		
	1	2	3
	1-2	3-4	5-8
DNA Matrizen	1 ng	1 ng	1 ng
Primer 1	5 pMol	5 pMol	5 pMol
Primer 2	5 pMol	5 pMol	5 pMol
PCR Puffer	75 mM	75 mM	75 mM
$MgCl_2$	6,5 mM	6,0 mM	6,0 mM
$MnCl_2$	-	0,15 mM	0,3 mM
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Goldstar <i>Taq</i> Polymerase	10 U	10 U	10 U

Durch mehrere parallele epPCR Ansätze, welche anschließend vermischt wurden, wurde eine höhere Diversität der eingeführten Mutationen gesichert

2.10.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Zum Einbringen gezielter Punktmutationen in die DNA-Sequenz wurde das Quikchange™ „site-directed mutagenesis“ Protokoll der Firma Stratagene angewendet. Für dieses Protokoll werden zwei komplementäre Primer mit dem gewünschten Basenaustausch benötigt. Als „template“ dient das Plasmid mit dem zu mutierenden Gen. Auf den ersten Schritt der Polymerase Kettenreaktion (PCR), die Denaturierung des Plasmids, folgt im Anlagerungsschritt die Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge des Plasmids. Im Syntheseschritt wird das gesamte restliche Plasmid kopiert. Am Ende der PCR besitzen alle DNA-Stränge die entsprechende Mutation, mit Ausnahme der „template-DNA“. Diese liegt methyliert vor, da sie durch Plasmidisolierung aus Zellen gewonnen wird. Im Gegensatz hierzu sind die während der PCR *in vitro* gebildeten Tochterstränge nicht methyliert. Der Verdau der Elternstränge mit dem Restriktion Enzym *DpnI*, das selektiv methylierte DNA angreift, lässt nur DNA übrig, die bei der PCR amplifiziert wurde und die gewünschte Mutation trägt (Abb. 2.1).

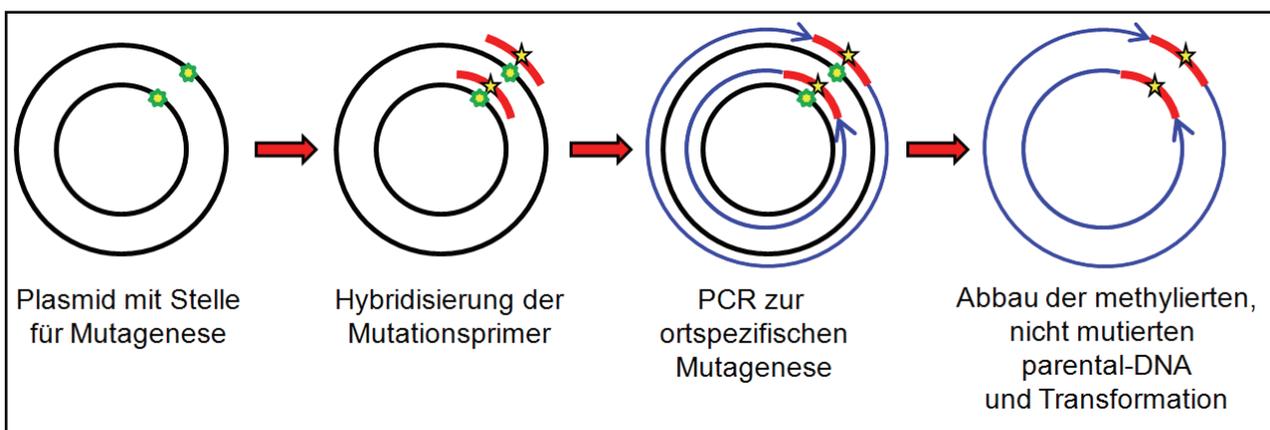


Abb. 2.1: Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese mit dem „Quikchange“ Protokoll.

Die ortsgerechte Mutagenese an der Epoxidhydrolase wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 20 ng *Template*-DNA, je 5 pmol der Primer, je 0,2 mM der dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$ und 5 U *Pfu*Turbo-Polymerase (Stratagene) in 50 μ l. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Material und Methoden

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	1min	
Annealing	X°C	2min	20 – 25
Extension	68°C	6min	
Finale Extension	68°C	10 min	1

Die Annealing-Temperatur (X) wurde dabei den entsprechenden Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide angepaßt.

2.11 Sequenzierung von DNA

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

2.12 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) spektralphotometrisch (UV/ VIS Spektrophotometer 16A, Bechmann Instruments GmbH, München) bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.13 TCA-Fällung von Proteinen

1/10 Volumen einer 10 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat-Lösung wurden zur proteinhaltigen Lösung gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Die Proteine wurden durch die Zugabe von 1/10 Volumen einer 70 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und der Ansatz für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden zentrifugiert (RT, 13.000 UpM) und das Pellet zweimal mit eiskaltem 80 % (v/v) Aceton gewaschen und anschließend über Nacht getrocknet. Die Proteine wurden in 15 µl SDS-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH6,8; 4% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerol; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,03% (w/v) Bromphenol-Blau aufgenommen.

2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS in einem diskontinuierlichem Gelsystem (Laemmli, 1970)^[183], welches sich aus einem 5 % Sammelgel und aus einem 15 % Trenngel zusammensetzte. Dazu wurde die „Mini Protean II Dual Slap Cell“-Gelapparatur der Firma BioRad (München) bei einer Spannung von 120 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 99 °C denaturiert. Gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Elektrophorese durch eine TCA-Fällung nach Peterson (1977)^[184] präzipitiert und in A. dest aufgenommen. Die aufgetrennten Gele wurden mit „PageBlue“ der Firma Fermentas (St.Leon-Roth) gefärbt.

2.15 Nachweis und Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.15.1 Lipase/Esterase Assays

Tributyrim-Agarplatten

Das Verfahren wird zur Darstellung von Esterase-Aktivität benutzt und geht auf eine Beschreibung von Kok *et al.* (1993) zurück^[185]. Durch die enzymkatalysierte Aufspaltung des Tributyrins entstehen Klärhöfe auf den Agarplatten^[186].

Tributyrim Emulsion	
Tributyrim	15 ml
Gummi arabicum	1,5 g
H ₂ O	50 ml

Das Tributyrin Gemisch wurde 2 min mit dem Homogenisator (Ultra Turrax T25, Ika Labortechnik, Staufen) emulgiert und anschliessend 1L autoklaviertem LB-Agar zugegeben.

Rhodamin-B Agarplatten

Zur Detektion von Lipase produzierenden Klonen wurden die Bibliotheken auf einen Rhodamin-B/Triolein Agar überstempelt^[187]. Aktive Klone gegen das Substrat

Material und Methoden

Olivenöl zeigten nach drei bis vier Tagen eine leuchtend orange Fluoreszenz unter UV-Licht.

Rhodamin-B Emulsion	
Rhodamin-B	0,001 % (0,01 g/l)
Gummi arabicum	1,5 g/L
Olivenöl	(2 %) 20 ml
H₂O	50 ml
Das Gemisch wurde 2 min mit dem Homogenisator (Ultra Turrax T25, Ika Labotechnik, Staufen) emulgiert und anschliessend 1L autoklaviertem LB-Agar zugegeben.	

2.15.2 Protease Assays

Der Nachweis proteolytisch aktiver Klone wurde auf Agarplatten durchgeführt, wo Magermilchpulver eingearbeitet ist, wodurch es zu einer Trübung des Mediums kommt. Die enzymatische Hydrolyse der Magermilchproteine führt zur Hofbildung um die betreffenden Kolonien. Diese Methode wurde nach Sokol ^[188] und Brown ^[189] modifiziert.

„skim-milk“ Agarplatten	
Magermilchpulver(„Skim milk“)	4 %
Lactose	1 %
H₂O	200 ml
Die Mischung wurde vollständig gelöst und 7 min bei 120 °C autoklaviert, anschliessend autoklaviertem 800 ml LB-Agar zugegeben.	

2.15.3 Phospholipase Assays

Eigelb als Zusatz zu Nährböden eignet sich zum Nachweis der Phospholipase-Aktivität von Mikroorganismen. Price und Mitarbeiter beschrieben 1982 eine Methode für den Nachweis von Phospholipaseaktivität in *C. albicans* ^[190], die auf Eigelb als Quelle für Phospholipide (v. a. Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin) beruht, inkorporiert in einen Sabouraud-Dextrose haltigen Plattenagar. Wachsen

Phospholipase-positive *Candida*-Zellen auf diesem Medium, so bilden sich nach ein paar Tagen Präzipitate um die Kolonien herum, die als definierte, undurchsichtige weiße Höfe erkennbar sind. Dieses weiße Präzipitat entsteht vermutlich durch die Bildung von Kalzium-Komplexen mit frei werdenden Fettsäuren, die wiederum durch die Aktivität der Phospholipasen aus den im Eigelb vorhandenen Phospholipiden gespalten werden ^[191].

Die Methode der hier verwendeten Eigelb Platten wurde nach der Veröffentlichung von Kim und Rhee (1994) ^[192] durchgeführt.

Eigelb-Agarplatten	
Eigelb	20 g [2 % (w/v)]
Taurocholic acid	5 g [0,5 % (w/v)]
H₂O	200 ml
Die Mischung wurde vollständig gelöst und 7 min bei 120 °C autoklavieren, anschliessend autoklaviertem LB-Agar und CaCl ₂ (20mM) zugegeben.	

2.15.4 Phosphatase-Assays

Die Detektion von Phosphatase kann auf Agarplatten erfolgen, die X-Phosphat (5-Brom-4chlor-3-indoylphosphat) enthalten ^[193]. Phenolphthalein-Diphosphat ist ein unspezifisches Substrat für Phosphatasen und kann nach Dephosphorylierung Höfe um die positiven Kolonien bilden ^[194, 195].

X-Phosphat-Agarplatten (pH 7,0)	
Trypton	1 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)
Glycerol	10 ml/L
Agar	1,5 % (w/v)
Nach dem Autoklavieren steril einzugeben 2ml/L eine Lösung 2% (w/v) von X-Phosphat	

Phenolphthalein –Agarplatten	
In Phosphate Puffer 0,1M pH 6,6 einsetzen:	
Trypton	1 % (w/v)
Hefe Extrakt	0,5 % (w/v)
Agar	1,5 % (w/v)
Phenolphthalein Diphosphat	1,5 g/L
Nach dem Autoklavieren steril zugeben MgCl ₂ (10 mM)	

Material und Methoden

2.15.5 Peroxidase-Assays

Der Nachweis der Peroxidase Aktivität wurde durch eine modifizierte Methode von Mayfield *et al.* durchgeführt ^[196].

Die Zellen wurden auf *o*-Anisidine oder *o*-Dianisidine-Platten ausplattiert, dann wurden sie ÜN bei 37°C für das Wachstum der Kolonien und danach für 3 Tage bei RT bebrütet, anschließend wurden sie mit einer Lösung des 50 mM Na-Phosphatpuffers (pH 4.5) und 100 mM H₂O₂ überschwemmt, die positiven Kolonien entwickelten einen purpurroten Hof nach Bebrütung bei 30°C. Die Platten wurden für 2 bis 18 Stunden auf Aktivität untersucht.

<i>o</i>-Anisidine/<i>o</i>-Dianisidine-Agarplatten	
Trypton	0,5 % (w/v)
Hefe Extrakt	0,1 % (w/v)
NaCl	0,1 % (w/v)
Glycose	1 % (w/v)
Agar	1,5 % (w/v)
<i>o</i>-(Di)Anisidine	0,05 % (w/v)

2.15.6 Epoxidhydrolase Assays

Es wurde die Bert van Loo Methode ^[197] in dieser Arbeit benutzt, um Epoxidhydrolaseaktivität nachzuweisen. Für den Agarplatten-Assay wurden die zu testenden Bakterien auf Safranin-Platten ausgestrichen bzw. gestempelt und mindestens ÜN bei 37°C und einen Tag bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten in ein geschlossenes Glasfläschchen mit entweder Styroloxid oder 1,2-Epoxybutan Dampf für 2 bis 18 Stunden bei RT inkubiert. Positive Kolonien wurden anhand ihrer Färbung identifiziert.

Safranin –Agarplatten	
Trypton	1 % (w/v)
Hefe Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
Agar	1,5 % (w/v)
Safranin-O	100 µM

2.15.7 Dehalogenase Assays

Bei der enzymatisch katalysierten hydrolytischen Dehalogenierung chlorierter Kohlenwasserstoffe wird der Halogenligand durch eine Hydroxylgruppe aus dem Wasser ersetzt; gleichzeitig entsteht Chlorwasserstoff ^[198]. Die Reaktion wurde daher sowohl über die Detektion des abgespaltenen Chloridions als auch über die Verfolgung des absinkenden pH-Wertes nachgewiesen.

Für den Nachweis der pH-Absenkung auf Agarplatten wurden Vorschriften von Chang *et al.* (1999), Holloway *et al.* (1998) und Bosma *et al.* (2002) modifiziert ^[199-201].

Die zu testenden Bakterien wurden direkt auf den pH-Indikatorplatten ausgestrichen oder gestempelt und mindestens ÜN bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Platten geöffnet und in eingeschlossene Glasfläschchen mit entweder 1,2,3-Trichloropropan (TCP) oder 1,2-Dichloroethan Dampf für 2 Stunden bis 3 Tagen bei RT inkubiert. Positive Kolonien wurden anhand ihrer Färbung identifiziert.

Phenolrot Indikatorplatte	
LB ohne NaCl	5X verdünnt
Agar	1,5 % (w/v)
Phenolrot	13 µg/ml
Bromthymolblau	13 µg/ml
pH 8,2 mit 5 M NaOH	

Material und Methoden

Eosin Indikatorplatte	
LB ohne NaCl	5X verdünnt
Agar	1,5% (w/v)
Eosin	40 mg/L
Methyleneblau	6,5 mg/L
pH 8,2 mit 5 M NaOH	

2.15.8 Selektivplatten testen

Die zu testenden Transformanden wurden auf verschiedenen Selektivmedien ausplattiert, und 5-7 Tagen bei 30°C inkubiert. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurde ein Aliquot des Transformationsansatzes auf normal LB_{amp} ausgespaltelt.

Epoxidhydrolase		
1	2 ^[202]	3 ^[202]
M9 selektiv Medium Base 2,3-Epoxy-propanol (Glycidol) 0,75 mM	LB-Agar Glycidyl phenyl ether (0,45mM in DMSO)	LB-Agar 4-Nitrostyroxid (0,025mM in DMSO)

Dehalogenase	
1	2
M9 selektiv Medium Base 2-Monochlorpropionat (2MCP) 0,5 g/l	M9 selektiv Medium Base Monochloroacetat (MCA) – 0,5 g/l

Amidase
M9 Medium ohne NH ₄
Malonamid – 0,1 g/L
Propionamid – 0,1 g/L
Benzamid – 0,1 g/L

2.16 Spektrophotometrischer Nachweis von Lipase/Esterase Aktivität

Die Lipaseaktivität wurde nach Winkler & Stuckmann bestimmt. ^[203] In basischer Lösung absorbiert abgespaltenes *p*-Nitrophenol Licht der Wellenlänge $\lambda = 410$ nm. Die OD₄₁₀ ist somit ein Maß für die Aktivität der Lipase.

Substratemulsion		
Lösung 1	Natriumdexocholat	207 mg
	Gummiarabicum	100 mg
	Sørensen Puffer	90 ml
Lösung 2	Nitrophenyl-ester	8 mM
	Isopropanol	10 ml

Sørensen Phosphatpuffer (pH 8.0)	
Lösung A	50 mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O
Lösung B	50mM KH ₂ PO ₄
Lösungen A und B wurden im Verhältnis 17:1 gemischt	

Für eine Reaktion wurden in einer MTP 180µl Substratemulsion mit 20 µl Probe vermischt. Anschließend wurde die OD₄₁₀ im Spektralphotometer (UV 1602, Shimadzu, Duisburg) gemessen. Es wurde *p*-Nitrophenyl-palmitat (*p*NPP) als Substrat verwendet.

2.17 Spektrophotometrischer Nachweis von Dehalogenase Aktivität

Die Umsetzung des chlorierten Substrats mit ganzen Zellen bzw. Zellextrakt in Lösung erfolgte wie bei der Beschreibung von Holloway *et al.* (1998) ^[200].

Phenolrot Puffer (pH8.2)	
HEPES	1 mM
EDTA	1 mM
Natriumsulphate	20 mM
Phenolrot	20 µg/ml
1,2-Dichloroethan	10 mM

Material und Methoden

Für eine Reaktion wurden in einer MTP 180-190 μl Substratemulsion mit 20-10 μl Probe (Kultur oder Überstand) vermischt. Anschließend wurde die OD_{540} im Spektralphotometer (UV 1602, Shimadzu, Duisburg) gemessen.

Im Falle einer Umsetzung des Substrats führt die damit verbundene Abnahme des pH-Wertes zu einer Farbänderung der Indikatoren von rot zu gelb, die visuell beurteilt wird

2.18 Spektrophotometrischer Nachweis von Epoxidhydrolase Aktivität

Der Nachweis der Epoxidhydrolase Aktivität wurde durch eine modifizierte Methode von Cedrone *et al.* durchgeführt ^[204].

Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden mittels *p*-Nitrobenzylpyridin (NBP) Vortest, einem kolorimetrischen Test auf EH-Aktivität, durchgeführt. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Kupplung eines Epoxids mit NBP zu einem blauen Farbstoff (Abb. 2.2). Liegen aktive Epoxidhydrolasen vor, findet keine Blaufärbung statt, da kein Epoxid mehr vorliegt, das eine Reaktion mit dem NBP eingehen kann.

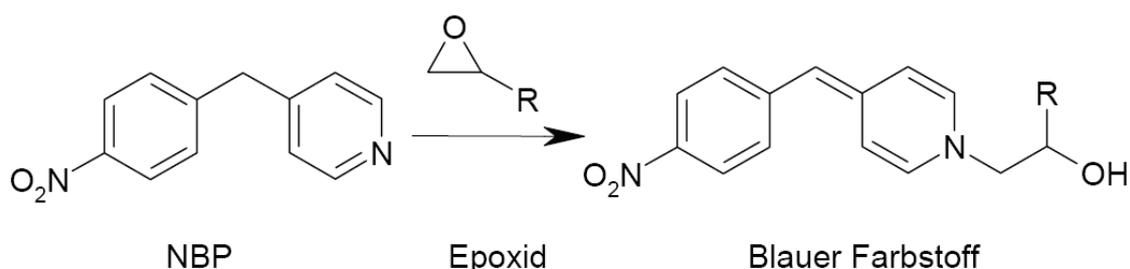


Abb. 2.2: Prinzip des NBP-Aktivitätstest. Nicht umgesetztes Epoxid reagiert mit *p*-Nitrobenzylpyridin (NBP) in Anwesenheit einer Base zum blauen Pyridinfarbstoff

Für eine Reaktion wurden in ein MTP 25 μl Zellextrakt mit 25 μl Substratlösung gemischt und bei 30°C (oder RT) in einem Schüttelschrank 15 bis 20 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde 25 μl NBP Lösung zugegeben und bei 80°C 20 min inkubiert. Um diese Reaktion zu beenden wurden 50 μl Ethanol (100%) hinzugefügt. Die blaue Farbe kommt nach Zugabe von 25 μl K_2CO_3 Lösung. Die optische Dichte wurde bei $\text{OD}_{570\text{nm}}$ gemessen.

Substratlösung		NBP Lösung	
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7.0	90 mM	4-5(p-nitro-benzyl)pyridine	100 mM
DMSO	10% (v/v)	Ethylenglycol/ethanol	80/20 (v/v)
Styroloxid	8 mM		

Färbung Lösung	
K ₂ CO ₃	1 M

2.19 Spektrophotometrischer Nachweis von Phospholipase Aktivität

Der Nachweis der Phospholipase C Aktivität in flüssigen Proben wurde photometrisch mit *p*-Nitrophenylphosphorylcholin (*p*NPPC) als Substrat durch eine modifizierte Methode von Bennett, et al. (1998) Flieger *et al.* (2000), Kurioka&Matsuda (1976) und Baine (1988) durchgeführt ^[205-208]. Das bei der enzymatischen Spaltung von *p*-NPPC freiwerdende *p*-Nitrophenol weist eine Gelbfärbung auf und kann photometrisch bei 410 nm bestimmt werden.

90µl Zellkultur wurde mit 110 µl *p*-NPPC Lösung gemischt und bei 37°C 20 Stunden inkubiert. Anschliessend wurde die optische Dichte bei 410 nm gemessen.

<i>p</i> NPPC Lösung	
Tris-HCL (pH 8.0)	50 mM
Triton X-100	5 mM
CaCl ₂	10 mM
<i>p</i> -Nitrophenylphosphorylcholin (<i>p</i> NPPC)	10 mM

2.20 Hochdurchsatz-Testsystem für Lipase-katalysierte enantioselektive Esterhydrolysen

Chirale Alkohole, die in verschiedenen industriellen Anwendungen Einsatz finden, können durch die Lipase-katalysierte Hydrolyse von racemischen Estern produziert werden. Um neue enantioselektive Enzyme oder optimierte enantioselektive Lipasen (mittels gerichteter Evolution) nachzuweisen, wurde die folgende Hochdurchsatz-

Material und Methoden

Methode entwickelt, bei der die in der Esterspaltung entstandenen chiralen Alkohole bezüglich ihrer Enantiomere detektiert werden.

In diesem gekoppelten Enzymtest werden die bereits in der Literatur beschriebenen ADHs ^[209, 210] (rekombinante *R*-ADH (*Lactobacillus kefir*) und *S*-ADH (*Rhodococcus erythropolis*) verwendet. Die entsprechenden Enzyme wurden wie beschrieben aufgereingt, die Aktivität wurde mit Acetophenon als Substrat in Triethanolamin Puffer (50 mM; pH 7.0) gemessen, wodurch NAD(P)H produziert wird.

Der Ablauf des Assays kann wie folgt skizziert werden (Abb. 2.3); die *E. coli* Zellen wurden in Deepwell-MTP überführt und in einem Brutschüttler ÜN angezogen. Nach der Induktion und Inkubation wurden die Rohextrakte zusammen mit der Substratlösung und Puffer mit der **Reaktionslösung** gemischt und weitere 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe des Pipettier-Roboters (Tecan Workstation 200) untersucht. Dazu wurden die Proben und die (*R* oder *S*) ADH Lösungen gemischt und 5 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reduktion von 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl--2H-tetrazolium (INT) resultiert in einem roten **Farbstoff**, der direkt im Roboter spektrophotometrisch (A_{492nm}) gemessen werden kann. Dazu wurden folgenden Lösungen verwendet.

ADH Lösung			
<i>Lactobacillus kefir</i>		<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
R-ADH	1,0 U/ml	S-ADH	0,5 U/ml
Diaphorase	1,0 U/ml	Diaphorase	1,0 U/ml
INT	0,22 mM	INT	0,22 mM
Triton X-100	0,1 %	Triton X-100	0,1 %
Na⁺ Puffer	0,2 M pH7.0	Na⁺ Puffer	0,2 M pH7.0

Substratlösung	
1-phenylethyl Acetat	0,2 % (v/v)
Gummi arabicum	0,1 %

Coenzym Lösung			
Für <i>S</i> -ADH		Für <i>R</i> -ADH	
NAD	4 mM	NADP	4 mM

Material und Methoden

Reaktionslösung	
Substratlösung	400 μ l
Na ⁺ Puffer (0,5M pH7.0)	100 μ l
<i>E. coli</i> Rohextrakte	500 μ l

Farbreaktion	
Reaktions Lösung	20 μ l
(R oder S) ADH Lösung	40 μ l
Coenzyme Lösung	20 μ l

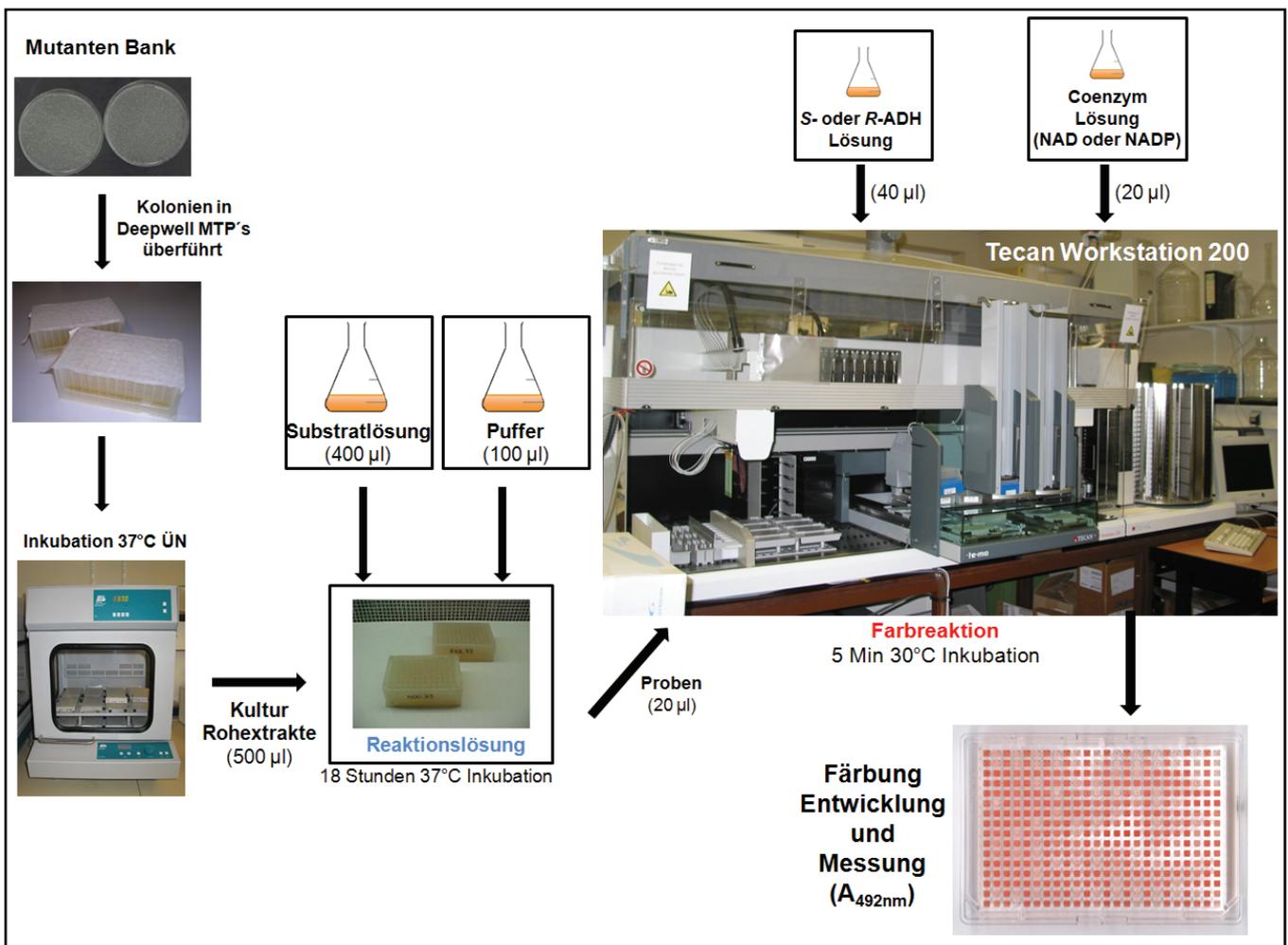


Abb. 2.3: Ablauf des Enantioselektiven Lipase-Hochdurchsatz Screenings Assay.

Als Standard wurden auf jeder MTP definierte Alkoholkonzentrationen (10 bis 150mM, 1-phenylethyl Acetat) aufgegeben, sowie *E. coli* Zellen mit Leervektor (negative Kontrolle) und *E. coli* Zellen mit pET22LipA (negative Kontrolle).

Material und Methoden

2.21 Epoxydhydrolase Filterpapier-assay

Das Substrat 4-Nitrostyroloxid ($pNSO$) wurde, wie bei Pedragosa-Moreau *et al.* (1996) ^[77] beschrieben, hergestellt. Alle verwendeten EH-Substrate (Abb. 3.18) wurden in verschiedenen Konzentrationen (50 mM; 100 mM und 200 mM) in Aceton gelöst und getestet.

Beim Filterpapierertest wurden die auf Agarplatten kultivierten Bakterien-Kolonien von einem mit EH-Substrat-getränktem und an Luft trockenem Filterpapier abgedeckt und bei 30 °C für 3 bis 5 Stunden inkubiert. Dabei findet die Hydrolysereaktion der Epoxide zu den korrespondierenden Diolen statt. Anschließend wurde das Papier für 15 min getrocknet und auf Fluoreszenz überprüft. In Abb. 2.4 ist dieser Versuchsablauf skizziert.

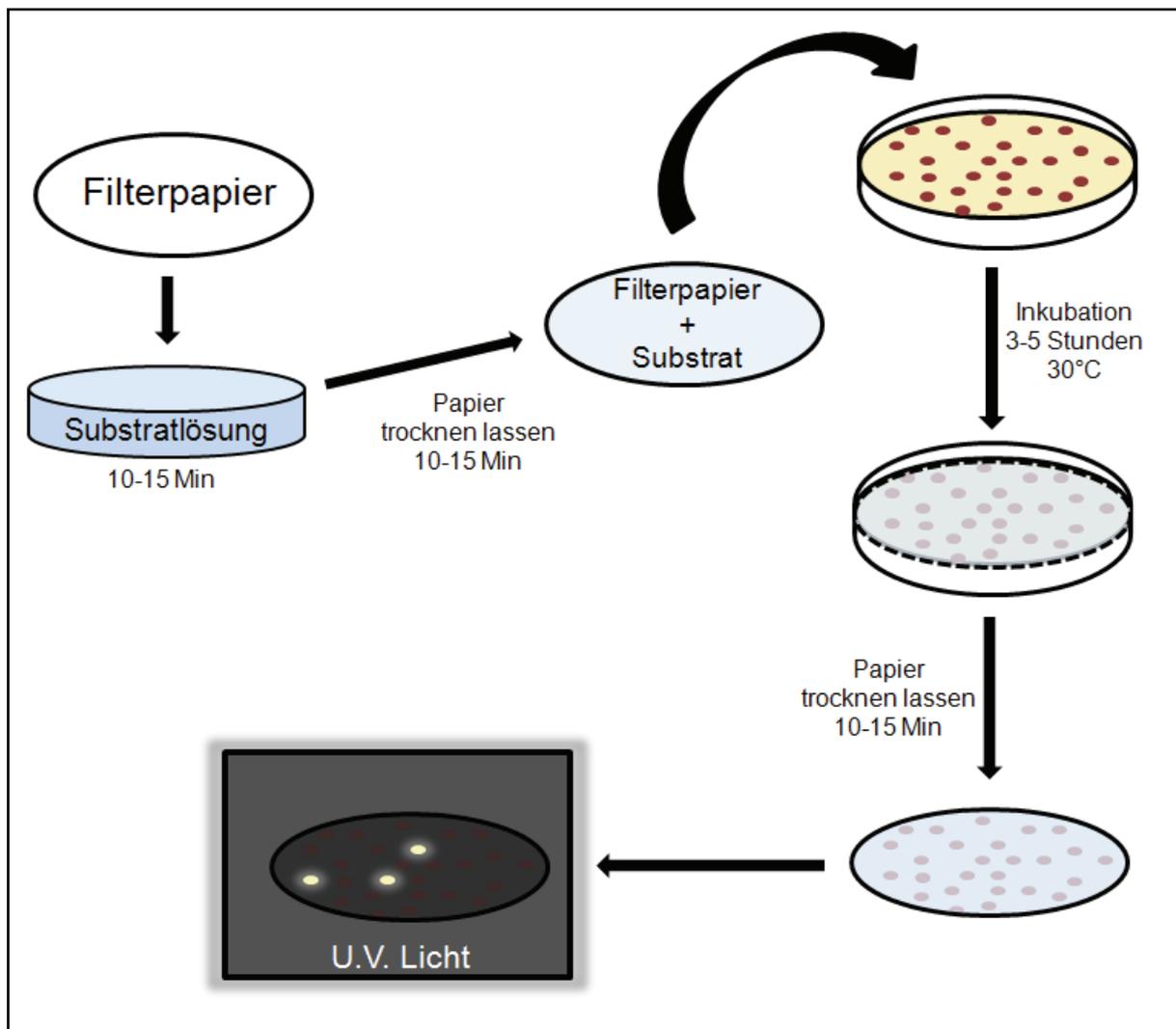


Abb. 2.4: Prinzip des EH Filterpapiertests. Kolonien werden von einem Filterpapier mit Substrat abgedeckt und 3-5 Stunden bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Filterpapiere von den Agarplatten genommen und unter UV Licht betrachtet. Zellen mit Epoxidhydrolaseaktivität lassen sich aufgrund ihrer Fluoreszenz erkennen.

2.22 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA und Aminosäuresequenzen sowie Protein-Strukturuntersuchungen erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme „Clone Manager für Windows 7.0“, „CS ChemDraw Pro 7.0“ (Cambridgesoft, Cambridge, USA) und „Cn3D4.1 des National Center For Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Homologie- und Sequenzvergleiche wurden mittels der Internet-Datenbank des „National Center For Biotechnology Information“ mit den BLAST-Algorithmen (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)^[211] und ClustalW^[212] (www.ebi.ac.uk/clustalw - EMBL EBI) durchgeführt. In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe eines Scanners („HP Precisionscan Pro 3.1“, Hewlett Packard, Böblingen), einer digitalen Kamera sowie einer Videodokumentationsanlage digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Bei diesen Ergebnissen handelt es sich um die der Agarosegelelektrophorese, der SDS-PAGE-Analysen sowie der Indikatorplatten für die qualitativen Enzymnachweise. Während der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Änderungen der Abbildungen vorgenommen.

Die 3D-Modelle von allen Mutanten wurden mit Hilfe der Programme PyMOL (DeLano 2002), Yasara (www.yasara.org ; IMBM , University of Graz, Austria) und RasMol (www.umass.edu/microbio/rasmol/index2.htm)^[213] erstellt und bearbeitet.

Alle in dieser Arbeit gezeigten Strukturabbildungen basieren auf den Strukturdaten von Van Pouderoyn *et al.*, (2001)^[26] für Lipase und Zou *et al.* (2000)^[74] für Epoxidhydrolase.



3. Ergebnisse und Diskussion

Wie einleitend beschrieben, sind leistungsfähige Testsysteme die Grundlage zur Untersuchung von Enzymen und Struktur-Funktionsbeziehungen. Nach der Vorstellung der in dieser Arbeit verwendeten Enzymassays (3.1) wird zunächst die Untersuchung einer mit Zufallsmutagenese erzeugten Variantenbank beschrieben (3.2), im Anschluss daran erfolgt die Beschreibung von mit Methoden des rationalen Designs erzeugten Enzymvarianten (3.3).

3.1. Hochdurchsatz-Testsysteme in der gerichteten Evolution

Die Voraussetzungen für eine erfolgreiche gerichtete Evolution zur Herstellung eines Enzyms mit verbesserten oder neuen Eigenschaften sind neben der funktionellen Expression des Proteins in einem mikrobiellen Wirtsorganismus ein schnelles und zuverlässiges Testsystem zur Identifizierung der positiven Enzymvarianten aus einer Bibliothek von mehreren Tausend oder gar Millionen Mutanten. Dazu zählen, wie in Kapitel 1.4.1.2 beschrieben, beispielsweise Agarplattenassays oder Selektionssysteme.

Um die funktionelle Vielfalt des α/β -Hydrolase vollständig abzudecken, wurden die folgenden Enzymaktivitäten ausgewählt und für diese Agarplattenassays und/oder Selektionssysteme etabliert bzw. neu entwickelt: Lipase-, Esterase-, Protease-, Phosphatase-, Peroxidase-, Amidase-, Dehalogenase-, Phospholipase- und Epoxidhydrolaseaktivität. Alle diese Enzymklassen zeigen das kanonische α/β -Hydrolasen Faltungsmotiv, welches in Kapitel 1.2 ausführlich dargestellt wurde.

3.1.1 Überblick über die etablierten Testsysteme

Im Folgenden werden die bereits in der Literatur beschriebenen Testsysteme kurz vorgestellt und Beispiele für das Erscheinungsbild von positiven und negativen Ergebnissen gegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Lipase/Esterase

Aufgrund der enormen Diversität von Lipasen und Esterasen bezüglich der umgesetzten Substrate sind bereits unterschiedlichste Verfahren beschrieben worden, um die entsprechenden Enzymaktivitäten auf festen Nährmedien nachzuweisen. Der Mechanismus Lipase-katalysierter Reaktionen ist detailliert in Kapitel 1.2.2 beschrieben (vgl. auch Tab. 1.2).

Unter anderen kann Rhodamin B dem Medium zugesetzt werden ^[54, 187]. Dieser Farbstoff ist in der Lage, die Abbauprodukte lipolytischer Aktivität nachzuweisen, indem er mit diesen Komponenten Komplex-Verbindungen eingeht, die anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können. Dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Rhodamin-B Agarplattentest wurde Olivenöl als natürliches Lipasesubstrat zugesetzt (Abb.3.1A).

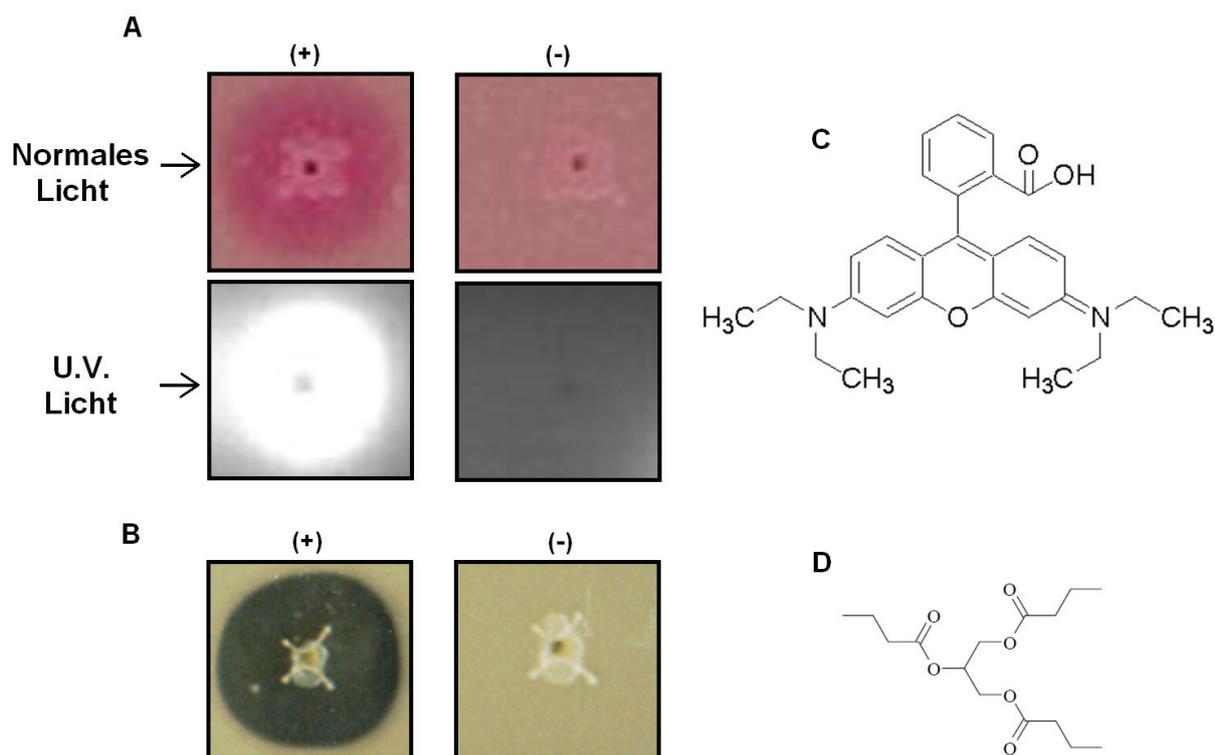


Abb. 3.1: Qualitativer Nachweis lipolytischer Aktivität. A. Visualisierung lipolytisch aktiver Klone auf Rhodamin-B Platten. Lipolytische Aktivität wird durch die Bildung von fluoreszierenden Höfen um die Kolonien herum angezeigt. Die obere Reihe zeigt die Platten in normalem Licht, die untere bei Betrachtung unter UV-Licht. B. Visualisierung lipolytischer Aktivität durch den Abbau von Tributyrin. Die Lipase/Esterase-katalysierte Umsetzung von Tributyrin zu dem entsprechenden Diglycerid und Buttersäure führt zur Bildung von Klärhöfen (der Klärhof erscheint durch die schwarze Unterlage dunkel) in der ansonsten trüben Agarplatte um die Kolonie herum. C. Strukturformel von Rhodamin-B. D. Strukturformel von Tributyrin. In allen Fällen ist die Positivkontrolle (Lipase-exprimierender Stamm) mit (+) und die Negativkontrolle (Stamm mit Leervektor) mit (-) gekennzeichnet.

Ein weiteres Testsystem verwendet einen Tributtersäureglycerylester (Tributyryn) ^[185]. Tributyrin ist ein sterisch wenig anspruchsvolles Triglycerid, das von den meisten Lipasen und Esterasen als Substrat akzeptiert wird. In Wasser ist es kaum löslich, so dass Tributyrin in Kombination mit Agar eine trübe Emulsion bildet. Aktive Lipasen spalten Tributyrin in wasserlösliche Produkte, wodurch Kolonien, die eine aktive Enzymvariante exprimieren, auf der Agarplatten durch sie umgebende Klärhöfe zu erkennen sind (Abb. 3.1B).

Lipasen und Esterasen können unter anderem anhand ihres Substratspektrums voneinander unterschieden werden (s. 1.2.2). Während Lipasen bevorzugt wasserunlösliche Triacylglyceride langkettiger Carbonsäuren (≥ 10 C-Atome) spalten, zeigen Esterasen höhere Aktivität gegenüber kurzkettigen Triacylglyceriden (< 10 C-Atome) ^[51]. Um dieses breit gefächerte Substratspektrum abzudecken, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Testsysteme verwendet. Beide Methoden wurden bereits sehr erfolgreich angewandt, um z.B. Metagenombanken zu untersuchen, mit dem Ziel völlig neuartiger Gene und Genprodukte in Umweltproben zu identifizieren. Ein solches Metagenomscreening setzt dabei weder eine Kenntnis über die Sequenz oder Struktur, noch einen kultivierbaren Wirtsorganismus als Quelle voraus ^[214-216]. So wurde z.B. eine neue Lipase mit hoher Stereoselektivität gegenüber (*R*)-Ibuprofenestern durch Screening auf Tributyrin und Rhodamin-B/Triolein (Olivenöl) entdeckt ^[217].

Protease

Proteasen katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen (vgl. Tab. 1.2). Der Nachweis proteolytisch aktiver Klone kann auf Agarplatten erfolgen, in die Magermilchpulver eingearbeitet ist. Hierbei erfolgt der Abbau des Proteins Casein (im Ausgangszustand gelblich-weiß und undurchsichtig) durch die Protease ^[188, 189]. Enzymatische Aktivität ist dabei am Auftreten klarer Höfe auf den sonst milchig trüben Platten zu erkennen. Abb. 3.2 zeigt die Hydrolyse von Peptiden auf Magermilch-Agarplatten durch eine aktive Protease.

Ergebnisse und Diskussion

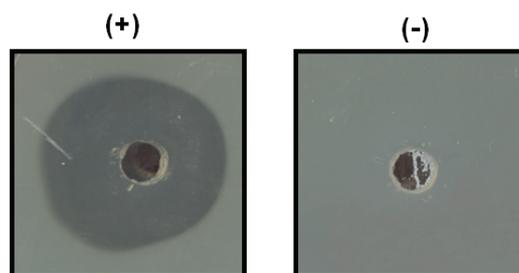


Abb. 3.2: Qualitativer Nachweis von proteolytischer Aktivität durch Abbau von Casein. Als Positivkontrolle (+) wurde Subtilisin (Protease) benutzt. Als Negativkontrolle (-) diente die Lipase aus *Candida rugosa*.

Diese Methode wurde bereits erfolgreich in vielen Arbeiten eingesetzt. So konnte z.B. in einer aus Tiefseesedimenten gewonnenen Metagenomprobe eine neue fibrinolytische Metalloprotease gefunden ^[218] werden. Desweiteren wurde diese Methode erfolgreich zur Identifizierung und Charakterisierung von verschiedenen Protease-produzierenden Mikroorganismen verwendet ^[219-221]. Neben diesen positiven Erfahrungen werden allerdings auch Arbeiten beschrieben, in denen das System nicht erfolgreich anwendbar war, so war K. Lämmle (2004) ^[222], nicht in der Lage, aktive Klone in einer großen Variantenbank (insgesamt 32 000 untersuchten Klonen) mittels dieses Tests zu identifizieren, obwohl das Vorhandensein von Proteasen in einer Bank solcher Größe doch recht wahrscheinlich ist ^[223]. Bei der Überexpression von Proteasen besteht natürlich immer das Risiko, dass der Wirtsorganismus bzw. dessen Proteine durch die Protease geschädigt (proteolytische Spaltung) werden, wodurch es zu einem negativen Screeningergebnis kommen. Ebenso wäre mögliche, dass neue Enzyme, wegen einer abweichenden Substratspezifität nicht in der Lage waren, das angebotene Substrat umzusetzen ^[224].

Phosphatase

Phosphatasen sind eine Gruppe von Enzymen, die durch Hydrolyse aus Phosphorsäureestern oder Polyphosphaten (z.B. Proteinen, Nukleotiden oder Alkaloiden) Phosphorsäure abspalten (vgl Tab. 1.2) ^[225].

Phenolphthalein-Diphosphat ist ein unspezifisches Phosphatasesubstrat, dessen Dephosphorylierung zur Bildung heller Höfe um die positiven Kolonien führt (s. 2.15) (Abb. 3.3A). Des Weiteren kann der Phosphatasenachweis auch auf Agarplatten

erfolgen, welche X-Phosphat enthalten ^[193]. In diesem Fall weisen die aktiven Kolonien eine Blaufärbung auf (s. 2.15) (Abb. 3.3B).

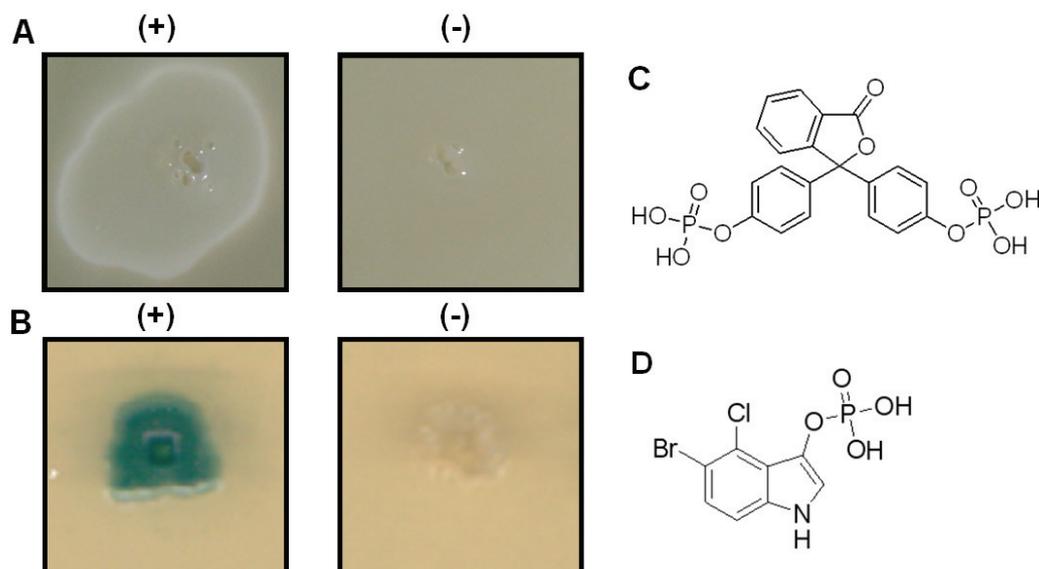


Abb. 3.3: Nachweis von Phosphataseaktivität. A. Hofbildung durch Dephosphorylierung des Phenolphthalein-Diphosphats durch Alkalische Phosphatase. Als Positivkontrolle wurde Phosphatase aus Kälberdarm benutzt. Als Negativkontrolle diente die Lipase aus *C. rugosa*. B. Phosphatase-Agarplatten Aktivitätstest mit X-Phosphat. Als Positivkontrolle wurde *E. coli* K12 benutzt, der normalerweise PhoA (alkalische Phosphatase) produziert und als Negativkontrolle diente *E. coli* BI21(DE3) mit dem Vektor pET22lipA, der BSLA exprimiert. C. Strukturformel von Phenolphthalein-Diphosphat. D. Strukturformel von X-Phosphat.

Phenolphthalein-Diphosphate als Substrat wurde ursprünglich im medizinischen Bereich benutzt, wie z.B. bei der Bestimmung von Phosphatase-Aktivität in Blutproben ^[226]. Mittlerweile sind erfolgreiche Applikationen dieses Testsystems auch bei der Identifizierung neuer Phosphatasen aus DNA-Bibliotheken beschrieben ^[227]. Mit ein und demselben Test konnten Enzyme mit unterschiedlichen Substratpräferenzen, unter anderem eine unspezifische Säure-Phosphatase, eine Hexose-Phosphatase und eine alkalische Phosphatase, gefunden werden.

Ein weiteres Beispiel ist die Identifizierung von 13 Klonen mit Phosphatase (und Phytase) Aktivität aus einer Metagenombank (insgesamt 32 000 Varianten) mittels des ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten X-Phosphattests ^[224]. Das zeigt, dass diese Substrate es ermöglichen, ein breites Spektrum von Phosphatasen zu identifizieren, und sie so zur Untersuchung von Varianten-Bibliotheken sehr gut geeignet sind.

Ergebnisse und Diskussion

Phospholipase

Die Bezeichnung „Phospholipasen“ umfasst eine weit verbreitete, heterogene Gruppe von Enzymen, deren Mitglieder Esterverbindungen in Glycerophospholipidmoleküle spalten können (vgl. Tab. 1.2). Zur Überprüfung auf Phospholipase Aktivität wurden die zu untersuchenden Mutanten auf „Eigelb-Agarplatten“ plattiert. Wenn Phospholipase produziert wird, werden die Proteine des Eigelbs im Medium denaturiert, was zu einer Trübung des Mediums um die Kolonien führt (Abb. 3.4) (s. 2.15).

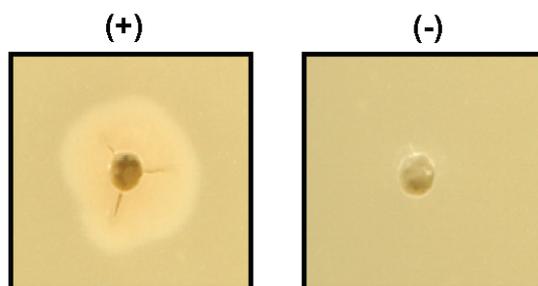


Abb. 3.4: Nachweis von Phospholipase Aktivität. Durch die enzymkatalysierte Aufspaltung des Lecithins aus Eigelb entstehen helle und undurchsichtige Halos auf den Agarplatten. Als Positivkontrolle wurde Phospholipase C aus *Bacillus cereus* benutzt. Als Negativkontrolle diente die Lipase aus *C. rugosa*.

Bei der Verwendung der Phospholipase A₂ (aus Schweinepankreas) als Positivkontrolle (nicht gezeigt) war die Bildung eines dunklen Hof zu beobachten. Diese Methode wird häufig zur Identifizierung von Phospholipase C benutzt ^[228], aber auch zur Charakterisierung von Phospholipase A ^[229] und B ^[230] Enzymen.

Hierbei erwies es sich als wichtig, dem Medium Calcium (in Form von CaCl₂) zuzugeben, da dieses als Kofaktor für das Enzym notwendig ist. Auf Platten ohne Calcium konnte auch nach langer Inkubationszeit (über 5 Tage) keine Phospholipase (A₂ und C) Aktivität nachgewiesen werden.

Wie oben beschrieben (vgl. Tab. 1.2) handelt es sich bei Phospholipasen um eine sehr heterogene Gruppe von Enzymen, nicht nur bezüglich der Substratpräferenz, sondern auch hinsichtlich des Faltungsmotivs. In „ESTHER“, der Datenbank für α/β -Hydrolasen (<http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER/general?what=index>) werden die Phospholipasen (Lysophospholipasen) zusammen mit den Carboxylesterasen in eine Gruppe eingeordnet, diese weist daher per Definition ein sehr breites Substratspektrum auf ^[231]. Es ist schwierig, zu sagen, ob Phospholipase-Aktivität die

Hauptaktivität eines bestimmten Enzymes ist, da viele Enzyme aus dieser Gruppe verschiedene Substrate akzeptieren. Ein Beispiel ist die Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus* ^[111], die schwache Phospholipase-Nebenaktivität aufweist und durch Gerichtete Evolution (3 Mutationen) in eine Phospholipase verwandelt werden konnte.

In letzter Zeit wurden neue Phospholipasen mit α/β -Hydrolase Faltungsmotiv entdeckt, die den Phospholipase-Klassen A1 ^[232] und A2 ^[233, 234] zugeordnet werden konnten. Weiterhin zeigen bisher nur als Lipasen beschriebene Enzyme Phospholipase-Aktivität, z.B. die Lipase aus der Bauchspeicheldrüse von Meerschweinchen (Klasse A1) ^[235] oder ein Calcium-abhängiges Enzym aus *Staphylococcus hyicus* ^[236-238]. Auch in dieser Arbeit wurde in der Lipase A aus *Bacillus subtilis* eine deutliche Phospholipase-Nebenaktivität nachgewiesen (s. 3.2.1).

Peroxidase

Peroxidasen sind Enzyme, die Oxidationen mit Hilfe von Peroxiden katalysieren (vgl. Tab. 2). Der Nachweis von Peroxidaseaktivität erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch eine modifizierte Methode nach Mayfield *et al.* ^[196]. Bei Anwesenheit von H_2O_2 verleiht die durch die Peroxidase katalysierte Oxidation des Chromogens den Höfen um die aktiven Kolonien eine dunkelbraune Färbung. (Abb. 18). Als alternatives Substrat kann auch *o*-Dianisidin verwendet werden ^[239].

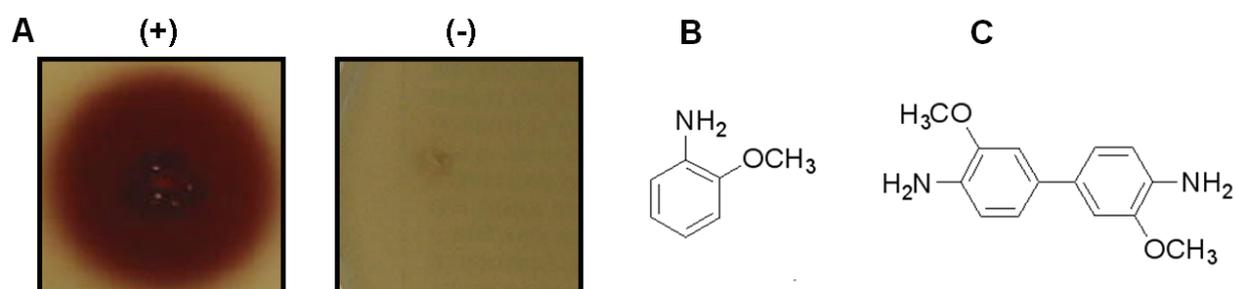


Abb. 3.5: Nachweis der Peroxidaseaktivität. A Oxidation von *o*-Anisidin durch die Peroxidase, als Positivkontrolle wurde die Peroxidase aus Meerrettich (*A. rusticana*) benutzt, und als Negativkontrolle die Lipase aus *C. rugosa*. B Strukturformel von *o*-Anisidin. C Strukturformel von *o*-Dianisidin.

Diese Methode wurde entwickelt, um aus Bodenproben neue Mikroorganismen mit unspezifischer Peroxidase-Aktivität zu isolieren ^[240] sie wurde aber auch zur

Ergebnisse und Diskussion

Identifizierung von mikrobiellen (meistens aus Pilze) spezifischen Mangan- oder Lignin-Peroxidasen eingesetzt. Da *o*-Anisidine (bzw. *o*-Dianisidine) ein universeller Elektronendonator für Peroxidasen ist, können mit demselben System verschiedene Peroxidasen gefunden werden.

Lipasen ^[241] und Esterasen ^[242] können auch Peroxidase-Aktivität zeigen, die meistens auf halogener Peroxidierung (Haloperoxidase) beruht. Weiter wurde gezeigt, dass auch Phosphatasen Peroxidase-Aktivität aufweisen können ^[243]. Die katalytische Triade der Haloperoxidasen ähnelt der der Serinhydrolasen ^[244], so hat die Bromperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* eine Ser-His-Asp katalytische Triade im aktiven Zentrum. Es wird hier eine Verwandtschaft zu Dehalogenasen postuliert, die die Hydrolyse von halogenhaltigen Substraten katalysieren (s. nächste Abschnitt) (vgl Tab. 1.2). Es wird vermutet, dass Haloperoxidasen im aktiven Zentrum eine Bindestelle für halogenhaltige Substrate besitzen, die den Dehalogenasen ähnelt. In ersten Ansätzen, diesen Sachverhalt zu beweisen, wurde bisher lediglich die Einbindung der katalytischen Triade in die entsprechenden Reaktionen nachgewiesen ^[244].

Dehalogenase

Als Grundlage für die Identifizierung dehalogenierender Enzyme (Dehalogenasen, vgl. Tab. 1.2) werden Testverfahren verwendet, die auf dem Nachweis einer pH-Absenkung infolge der Freisetzung von Protonen bei hydrolytischen Dehalogenierungsreaktionen beruhen ^[198] (Abb. 3.6). Dazu wurden Vorschriften von Chang *et al.* (1999), Holloway *et al.* (1998) und Bosma *et al.* (2002) ^[199-201] wie in Kapitel 2.15 des Materialien und Methodenteils beschrieben, kombiniert und modifiziert. Um zu überprüfen, ob die entwickelte Methode eine Identifikation von Dehalogenase-positiven Klonen auf Agarplatten erlaubt, wurden verschiedene Bakterienstämme (nicht alle gezeigt), wie *Xanthobacter autotrophicus* (DSM 432) und *Rhodococcus erythropolis* (DSM 43296), die Dehalogenasen produzieren, als Positivkontrollen zusammen mit *E. coli* [BL21(DE3) und DH5 α] als Negativkontrolle verwendet. Kolonien, die in der Lage waren, das in den Indikatorplatten enthaltene Substrat 1,2-Dichloroethan zu verstoffwechseln, wiesen nach 3 Tagen Inkubation infolge der pH-Absenkung eine gelbe Färbung auf. Im Gegensatz dazu verfärbten sich Kolonien der Negativkontrolle, die das Substrat nicht umsetzen konnten, blau

oder sehr schwach blau/grünlich (Abb. 3.6). Auf Indikatorplatten ohne Substrat trat keine Gelbfärbung der Positivkontrolle auf. Die Indikatorplatten selbst färbten sich während der Inkubation mit Bakterien intensiv blau oder violett.

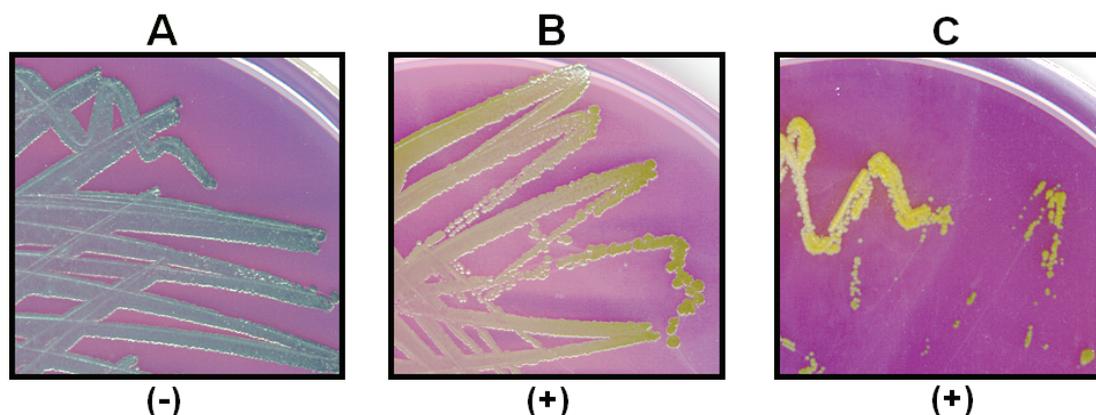


Abb. 3.6: Dehalogenase Aktivitäts tests auf pH-Indikatorplatten. Die Dehalogenase-produzierenden Bakterienstämme *Xanthobacter autotrophicus* (B) und *Rhodococcus erythropolis* (C) sowie die Negativkontrolle *E. coli* BI21(DE3) (A) wurden auf Agarplatten mit pH-Indikator (Phenolrot und Bromothymolblau) ausgestrichen und nach ÜN Wachstum bei RT auf Platten mit 1,2-Dichloroethan als Substrat bebrütet. Positive Kolonien weisen eine gelbe, negative eine blau-grünliche Färbung auf.

Organismen der Genera *Xanthobacter* und *Rhodococcus* zeigen eine der bisher am besten beschriebenen Dehalogenase-Aktivität ^[245]. So ist die Dehalogenase Dh1A aus *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 ^[246] seit 1985 bekannt, die Dehalogenase aus *Rhodococcus erythropolis* Y2 seit 1990 ^[247]. Eine weitere Dehalogenase DhaA aus *Rhodococcus rhodochorous* NCIMB 13064 wurde 1994 beschrieben ^[248]. Auch der am Institut vorhandene Stamm *Xanthobacter autotrophicus* Py2 (DSM 432) zeigt Dehalogenaseaktivität (vgl Tab. 1.2). Mittels einer Datenbankrecherche konnten drei putative Haloalkan-Dehalogenasen (Contig75 Gene Xaut0955 ; Contig75 Gene Xaut0956 und Contig75 Gene Xaut1705), innerhalb des komplett sequenzierten Genoms (nur in der Website http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/xanau/xanau.home.html - komplett seit Juli 2007) des Stammes *Xanthobacter autotrophicus* Py2 (GenBank accession: CP000781 und CP000782) identifiziert werden. Die so gefundene putative Haloalkan-Dehalogenase, wurde jedoch ausschliesslich basierend auf einer Sequenzhomologie zu bekannten Haloalkan-Dehalogenasen annotiert. Ihre Funktionalität/Aktivität wurde jedoch bisher nicht experimentell überprüft. Die ähnlichste Sequenz besitzt 61% Identität (auf Aminosäure-Ebene) mit einer Dehalogenase aus *Anaeromyxobacter dehalogenans*,

Ergebnisse und Diskussion

die andere zeigen zusätzlich Ähnlichkeiten zu Epoxidhydrolasen aus *Agrobacterium tumefaciens* (37 % Identität auf Aminosäure-Ebene). Es wäre somit interessant, diese Gene zu klonieren, zu exprimieren und die Enzyme auf ihre Aktivität, bzw. hinsichtlich promiskuitiver Aktivitäten, zu charakterisieren.

Im Laufe dieser Arbeit wurden einige bereits veröffentlichte Methoden zur Detektion von Dehalogenase-Aktivität übernommen und zur in dieser Arbeit vorgestellten Methodik zusammengefasst.

Die erfolgreiche Anwendung dieser beschriebenen Systeme wurde z.B. von Lämmle^[222] demonstriert, der Klone mit Dehalogenase-Aktivität gegenüber Monochloroacetat in einer Metagenom-Bodenprobe identifizierte^[222]. Bei den meisten dieser Methoden werden die Zellen zuerst auf Nitrozellulose-Membranen oder normale Agarplatten ausplattiert und nach dem Wachstum auf die Indikatoren-Agarplatten transferiert. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten System wurden die Zellen direkt auf die verschiedenen Indikator-Agarplatten überstempelt. Dies hat den Vorteil, dass schwache Dehalogenase-Aktivität besser erkennbar ist. Werden die Zellen auf den Membranen angezogen, stellt sich die erwartete Gelbfärbung nur bei sehr hohen Dehalogenase-Aktivitäten ein, sonst verfärben sich die Zellen bläulich-violett. Besonders bei diesem Test ist es wichtig, Replikplatten anzufertigen, da die Zellen bei längerer Exposition (bis zu 7 Tagen) mit den toxischen Substraten schnell absterben.

Epoxidhydrolase

Epoxidhydrolasen katalysieren die regio- und enantiospezifische Hydrolyse von Epoxiden. Dabei wird die Etherbindung der Epoxide gespalten und es kommt zur Bildung von vicinalen Diolen^[62] (vgl. Tab. 2, s. 1.2.3).

Um Epoxidhydrolaseaktivität nachzuweisen wurde zunächst die von Bert van Loo entwickelte Methode^[197] benutzt. Diese Methode basiert auf der Hydrolyse eines Epoxides durch die die Epoxidhydrolase exprimierenden Kolonien. Die entstehenden vicinalen Diole werden, gekoppelt an die Zellatmung, weiter oxidiert, wobei NADH freigesetzt und das Membranpotenzial erhöht wird. Den Agarplatten wird zusätzlich der nicht metabolisierbare, aber frei in die Zellen diffundierende Farbstoff *o*-Safranin zugesetzt. Durch die Erhöhung des Membranpotenzials und damit verbunden der Erzeugung eines stärkeren Protonengradienten über die Membran wird in

Epoxidhydrolase exprimierenden Zellen die *o*-Safranin Aufnahme erhöht, was zu einer uniformen rosa Färbung dieser Zellen führen sollte (Abb. 3.7B). Im Gegensatz dazu sollten negative Kolonien einen weißen Rand besitzen. Diese Methode funktioniert gut für frisch transformierte und ausplattierte Zellen, für Zellen, die aus Mikrotiterplatten auf Agarplatten überstempelt wurden, war diese Methode nicht erfolgreich, da keine Unterschiede zwischen positiven und negativen Kolonien erkannt werden konnten (Abb. 3.7A).

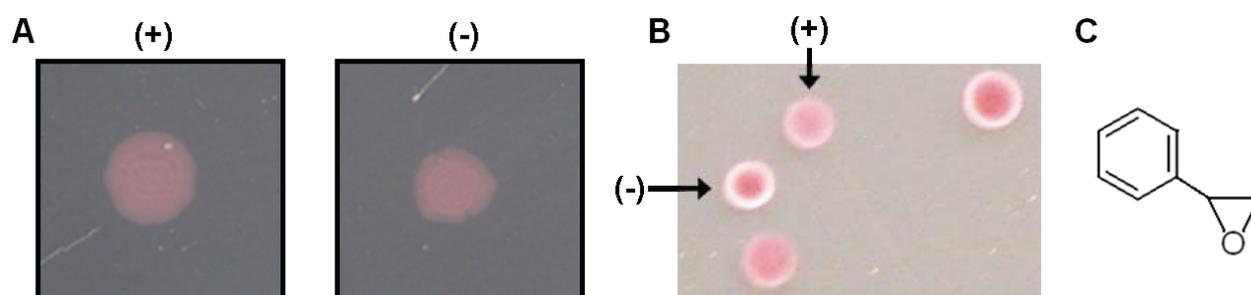


Abb. 3.7: Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität auf Safranin-O Agarplatten. A. Überstempelte Zellen aus Flüssigkulturen. Als Positivkontrolle diente *E. coli* DH5 α mit dem Vektor pQE-EH, der eine Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* exprimiert. Als Negativkontrolle diente *E. coli* BL21(DE3) mit dem Vektor pET22lipA, der BSLA exprimiert. B. Abbildung aus der Veröffentlichung von van Loo^[197] C. Strukturformel des verwendeten Substrates Styroloxid.

Ein Erklärungsansatz für die schlechte Anwendbarkeit des Tests kann auf das ungleichmäßige und unterschiedlich schnelle Wachstum von überstempelten Kolonien im Vergleich zu frisch transformierten Zellen zurückzuführen sein. Außerdem besitzen die Kolonien, die aus Flüssigkulturen überstempelt wurden, keinen scharf abgegrenzten kreisförmigen Rand, was möglicherweise die Absorption des Substrates auf den Oberflächen der Kolonien beeinflussen kann. Eine andere Erklärung könnte sein, dass im Gegensatz zu der oben beschriebenen Veröffentlichung der *E. coli*-Stamm DH5 α bzw. BL21(DE3) (und nicht *E. coli* Top10) benutzt wurde. Theoretisch wird erwartet, dass alle *E. coli* Stämme Diole, also die EH Reaktionsprodukte oxidieren können, jedoch nicht die EH Substrate Styroloxid oder 1,2-Epoxybutane. Die oben beschriebene Methodik ist die bisher einzige, nicht chromatographische Methode (FPLC oder GC), zur Detektion von EH-Aktivität^[204].

Da im Rahmen dieser Arbeit diese Methode jedoch nicht erfolgreich angewendet werden konnte, wurde das im Folgenden beschriebene System neu entwickelt (s. 3.1.2 und 3.1.4). Alternativen sind noch in Form von spektroskopischen

Ergebnisse und Diskussion

Nachweissystemen beschrieben, wie z.B. eine kolorimetrische Methode von Cedrone *et al.* (s. 2.18) ^[204]

3.1.2 Etablierte Selektions-Systeme

Bei einem Screening mittels Selektion ist die gesuchte Enzymaktivität an das Überleben des entsprechenden Klons gekoppelt, d.h. man macht sich die natürlichen Prozesse der Evolution (natürliche Auslese) zur Identifizierung der gewünschten Enzymaktivität- bzw. Eigenschaft zu Nutze. Dies ist möglich, wenn beispielsweise das Reaktionsprodukt des Ziel-Enzymes als einzige Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Sulfatquelle für den Organismus dienen kann, das Substrat der Ziel-Enzymreaktion jedoch nicht verstoffwechselt werden kann. Außerdem kann Selektion dadurch ermöglicht werden, wenn z.B. das Substrat der Ziel-Enzymreaktion toxisch für den Organismus ist, dessen enzymatisches Abbauprodukt jedoch nicht mehr, oder dieses gar direkt metabolisiert werden kann. Der Einsatz eines Selektionssystems erlaubt es also, nur diejenigen Klone (aus einer großen Bibliothek an Varianten, oder einer Metagenombank) zu identifizieren, welche tatsächlich die gewünschte Aktivität besitzen, da nur diese unter den Assay (Selektionsbedingungen) wachsen können, bzw. diese Wuchsvorteile gegenüber inaktiven Klonen besitzen. Ein Screening basierend auf funktioneller Selektion ermöglicht somit höchsten Durchsatz und ist gleichzeitig schnell durchführbar und demzufolge kostengünstig und effizient. Vor allem in Variantenbanken, die durch randomisierte Mutagenesemethoden entstanden sind, gibt es häufig sehr viele inaktive Varianten, diese werden in einem solchen Screeningsystem überhaupt nicht in Betracht gezogen und verringern den Zeit- und Arbeitsaufwand so beträchtlich. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten, etablierten Selektionssysteme kurz vorgestellt.

Epoxidhydrolase

Epoxidhydrolasen (EHs), deren Eigenschaften, sowie industrielle Anwendungen wurden bereits ausführlich in Kapitel 1.2.3 beschrieben. In der Natur sind EHs für die Entgiftung von Epoxiden verantwortlich, dazu wird durch hydrolytische Spaltung des Epoxidrings ein nicht giftiges vicinales Diol gebildet ^[249, 250]. Eben diese Eigenschaft wird im Labor für die funktionelle Selektion ausgenutzt. Die im Rahmen dieser Arbeit

benutzte Selektions-Methode, basiert auf dem von Reetz *et al.* [202], beschriebenen Ansatz. Nur Klone, welche EH-Aktivität besitzen (d.h. eine aktive EH exprimieren) haben einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber Klonen ohne EH. Dazu wurden in die entsprechenden Selektions-Agarplatten Epoxide als Substrat eingegossen. Es wurden hierbei drei verschiedene Substrate verwendet, deren biokatalytische Umsetzungen durch EHs in Abb.3.8 dargestellt sind.

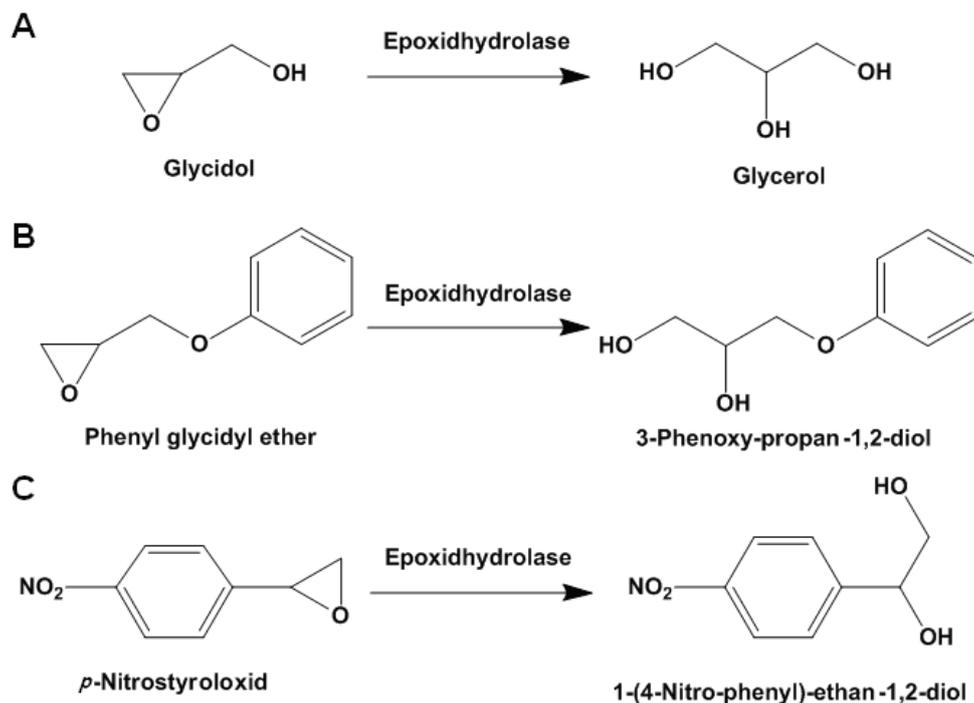


Abb. 3.8: Biokatalytische Umsetzungen durch EH.

Bei der Verwendung von Glycidol als EH-Substrat, können EH-positive Klone bei einer Konzentration von 0,05% (v/v) Glycidol innerhalb von 3-4 Tagen wachsen, wohingegen EH-negative Klone innerhalb dieses Zeitraumes keinen Wuchs zeigten. (Abb. 3.9)

Ergebnisse und Diskussion

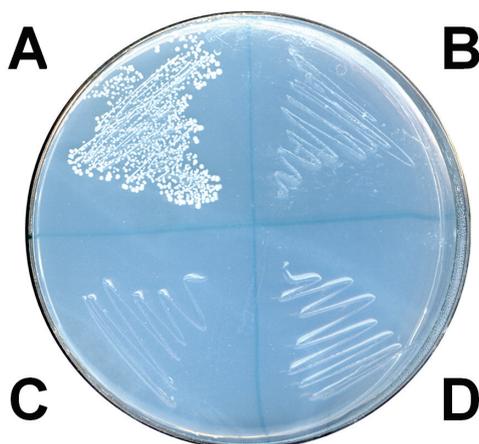


Abb. 3.9: Selektions-Agarplattentests auf Epoxidhydrolase Aktivität. Exemplarisch ist hier Selektion auf Glycidol als EH Substrat gezeigt. Selektion auf die beiden anderen Substrate ergab identische Ergebnisse (nicht dargestellt) (A) *E. coli* DH5 α mit Epoxidhydrolase (pQE-EH), (B) Negativkontrolle *E. coli* DH5 α mit pQE-60 (Leervektor), (C) Negativkontrolle, Lipase (BSLA) in *E. coli* BL21(DE3) mit pET22lipA und (D) Negativkontrolle *E. coli* BL21(DE3) mit pET22b (Leervektor). Nur Zellen mit Epoxidhydrolaseaktivität können auf den Selektiv-Platten wachsen. Nur die Positivkontrolle (A) zeigt Wachstum nach 4 Tage Inkubation. Die Negativkontrollen (C, D) wuchsen hingegen innerhalb des gleichen Zeitraumes nicht.

Die anderen beiden Substrate, Phenyl-glycidylether und *p*-Nitrostyroloxid, wurden ebenfalls auf Ihre Einsetzbarkeit als EH-Selektionssubstrat überprüft und dazu den entsprechenden LB-Agarplatten zugesetzt. Die Produkte der EH-katalysierten Umsetzungen wurden vorher auf ihre Giftigkeit für den Expressionstamm untersucht, wobei keine cyto-toxischen Effekte unter den Assaybedingungen beobachtet wurden. In dieser Arbeit wurde mit 7 mM Phenyl-Glycidylether und 0,5 mM *p*-Nitrostyroloxid als Endkonzentration im Medium gearbeitet. Ein Wachstum positiver Klone konnte dabei nach 4-5 Tagen beobachtet werden.

Da man nicht davon ausgehen kann, dass die entsprechenden Proteine (hier EHs) von Anfang an in ausreichendem Maße exprimiert werden, hat es sich als sinnvoll herausgestellt, die Zellen zunächst in Flüssigkulturen oder auf normalem Agar anzuziehen und erst nach dieser ersten Wachstumsphase auf das Selektivmedium zu übertragen.

Hier wurden drei unterschiedliche Substrate verwendet, um ein breiteres Substratspektrum abzudecken und so die Möglichkeit, eine aktive EH auszumachen, zu erhöhen. In den entsprechenden Veröffentlichungen wurde zunächst eine Obergrenze des entsprechenden Substrats ermittelt, bei der normale *E. coli* Zellen (ohne EH) nicht mehr wachsen können. Diese Werte lagen bei 3,5mM für Phenylglycidyl-ether und 0,4 mM für *p*-Nitrostyroloxid. Es wurde im Anschluss

getestet, ob die EH positiven Zellen unter 7 mM Phenylglycidyl-ether und 0,5 mM *p*-Nitrostyroloxid wachsen konnten, dabei stellte sich heraus, dass die Zellen mit EH (wenn auch verlangsamt) unter diesen Bedingungen auf dem Selektivmedium wachsen können.

Weiterhin wurde innerhalb dieser Arbeit das Substrat Glycidol verwendet (persönliche Mitteilung U. Bornscheuer, Universität Greifswald), dass eine Obergrenze für Wildtypzellen von 0,45 mM ermittelt, als Endkonzentration im Test wurde diese Konzentration auf 0,75 mM erhöht, bei denen EH-positive Klone noch gut wachsen können und auf diese Weise wird die Gefahr der Detektion falsch-positiver Varianten minimiert.

Dehalogenase

Dehalogenasen sowie deren Reaktionsmechanismus wurden bereits kurz in Kapitel 1.2 beschrieben. Für den in dieser Arbeit verwendeten Dehalogenase-Selektivtest wurden Monochloracetat und 2-Chlorpropionat als Substrat benutzt. Beide inhibieren das Wachstum des *E. coli* Expressionsstammes in Abwesenheit einer aktiven Dehalogenase, sollten aber im Falle der rekombinanten Expression einer aktiven Dehalogenase ein Wachstum dieser positiven Klone ermöglichen. Dies beruht auf der Tatsache, dass die dehalogenierten Produkte Glycolsäure und Milchsäure (Abb.3.10) für *E. coli* nicht mehr toxisch sind und gleichzeitig vom Organismus metabolisiert werden können.

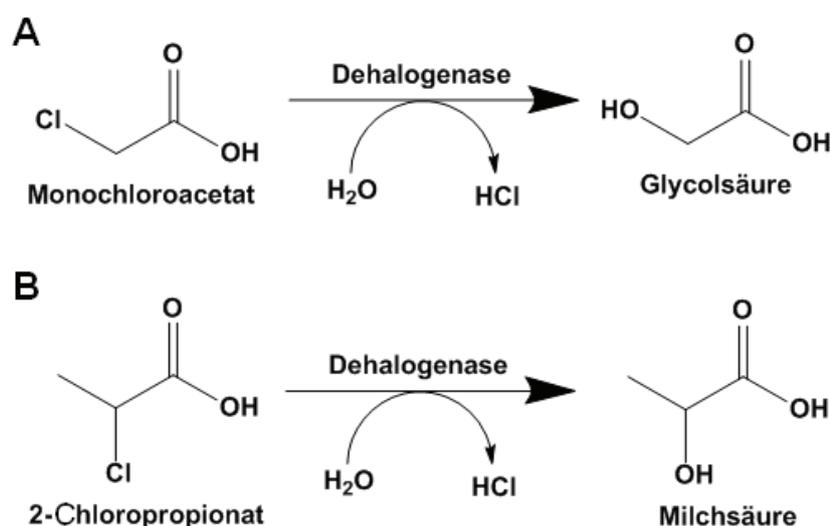


Abb. 3.10: Biokatalytische Umsetzungen durch Dehalogenasen.

Ergebnisse und Diskussion

Leider stand für diese Experimente kein Plasmid-Konstrukt zur rekombinanten Expression einer Dehalogenase in *E. coli* als Positivkontrolle zur Verfügung. Deshalb wurden zur Überprüfung des Selektionssystems Wildtyp-Bakterienstämme verwendet, welche aus Genera stammen, die laut Literatur aktive Dehalogenasen produzieren (s. 3.1.1 Dehalogenase). Im Einzelnen wurden *Xanthobacter autotrophicus* und *Rhodococcus erythropolis* verwendet, welche beide Wachstum auf den entsprechenden Selektiv-Agarplatten zeigen. Die Negativkontrolle (*E. coli* Stämme) konnte hingegen unter den Assaybedingungen nicht wachsen (Abb. 3.11).

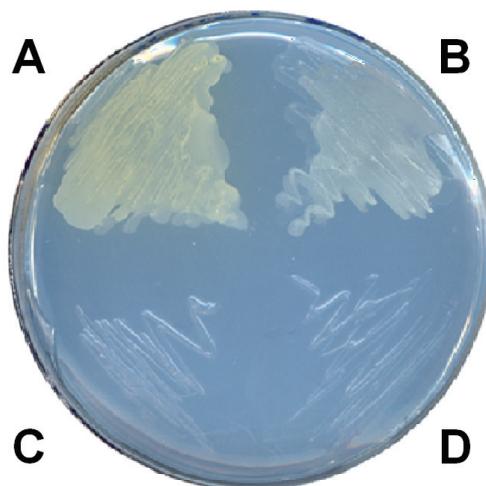


Abb. 3.11: Selektions-Agarplattentests auf Dehalogenaseaktivität. Als Substrat wurde hier exemplarisch 2-Chloropropionat verwendet. Verwendung von Monochloracetat als Substrat ergab ähnliche Ergebnisse (nicht gezeigt). (A) Positivkontrolle: *Rhodococcus erythropolis* (B) Positivkontrolle *Xanthobacter autotrophicus* (C) *E. coli* DH5 α mit EH (pQE-60-EH) (D) *E. coli* BL21(DE3) mit BSLA (pET22lipA). Nur Zellen mit Dehalogenaseaktivität können auf den Platten wachsen. Nach 3 Tagen Inkubation zeigt *R. erythropolis* (A) besseres Wachstum als *X. autotrophicus* (B). BSLA und EH produzierende Zellen (C und D) zeigen kein Wachstum.

Wie oben beschrieben, kann es sinnvoll sein, die Konzentration des Substrats im Test zu erhöhen, um die Anzahl falsch-positiver Treffer zu minimieren. In diesem Fall wurde die beschriebene Konzentration von 2 mM Substrat auf 5 mM erhöht, nachdem gezeigt wurde, dass Dehalogenase-exprimierende Bakterien problemlos unter diesen Bedingungen wachsen können.

Bei der Übertragung dieses Testsystems auf andere Substrate ist es wichtig, dass das Endprodukt der Dehalogenierungsreaktion direkt vom Organismus verwertet werden kann. Durch die Notwendigkeit, noch weitere Enzyme, die nicht unbedingt in *E. coli* vorhanden sind, zwischenschalten zu müssen, wird das System stark verkompliziert und deutlich fehleranfälliger. Dies ist z.B. bei 1,2-Dichlorethan der Fall, das in *Xanthobacter* zur 2-Chlorethanol und dann im Laufe eines Stoffwechselweges

über 2-3 weitere enzymatische Umsetzungen zu 2-Hydroxyessigsäure umgesetzt wird.

Amidase

Zur Detektion von Amidasen musste zunächst ein Selektionssystem etabliert werden, um große Bibliotheken zu untersuchen. Bei der enzymatischen Umsetzung von Amiden entsteht im Fall eines primären Amides die entsprechende Säure und Ammoniak (Abb. 3.12). Diese Reaktionsprodukte können zur Selektion und Detektion genutzt werden. Ammoniak kann der heterologe Screeningwirt *E. coli* als Stickstoffquelle und die produzierte Säure möglicherweise als Kohlenstoffquelle nutzen. Dieses prinzipielle System wurde schon häufiger in der Literatur beschrieben [251, 252]. Nur die Klone mit Amidaseaktivität zeigen ein Wachstum auf den entsprechenden Substraten, wohingegen alle verwendeten Negativkontrollen auf dem Selektivmedium kein (oder nur sehr schwaches) Wachstum zeigten (Abb. 3.13). Für den Amidase-Selektivtest wurden drei verschiedene Substrate gleichzeitig in einer Agarplatte verwendet. Zuerst wurde *R. erythropolis* (*Rhodococcus* Spezies können Amidase produzieren [253-255]) als Positivkontrolle genutzt. *E. coli* Zellen (BL21(DE3) und DH5 α) mit pETLipA und pQE-EH zeigen keine Wachstum auf den Selektiv-Platten. (Abb. 3.13)

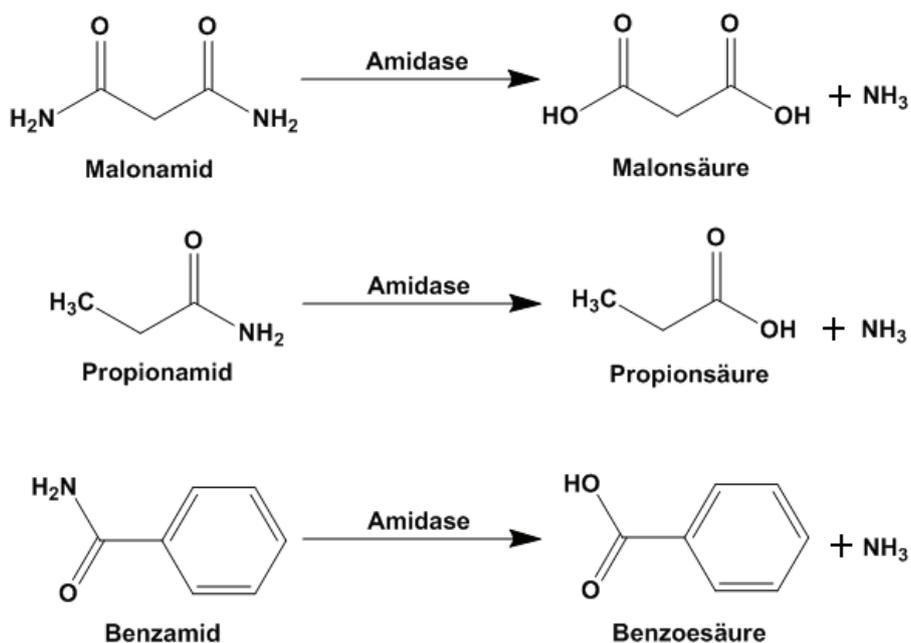


Abb. 3.12: Biokatalytische Umsetzungen durch Amidase.

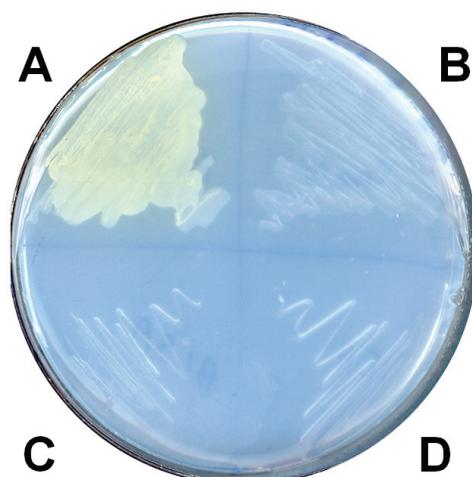


Abb. 3.13: Selektions-Agarplattentest auf Amidaseaktivität. Als Substrat wurden Malonamid, Propionamid und Benzamid verwendet. (A) Positivkontrolle *R. erythropolis*, (B) *E. coli* BL21(DE3) mit pET22b (Leervektor), (C) *E. coli* BL21(DE3) mit BSLA (pET22lipA) und (D) *E. coli* DH5 α mit EH (pQE-60-EH). Nur Zellen mit Amidaseaktivität können auf den Selektiv-Platten wachsen. Der Amidase produzierende Stamm wie *R. erythropolis* (A) zeigt Wachstum nach 3 Tage Inkubation, wohingegen BSLA und EH produzierende Zellen (C, D) im selben Zeitraum kein oder nur sehr schwaches Wachstum zeigten.

Im Gegensatz zu dem vorher beschriebenen Selektivitätstest beruht dieses System ausschließlich auf der Tatsache, dass *E. coli* das Reaktionsprodukt als Nährstoff braucht. Das Edukt ist in diesem Falle nicht toxisch für die Zellen.

3.1.3 Ein Hochdurchsatz-Testsystem für Lipase-katalysierte enantioselektive Esterhydrolysen

Wie in 1.4.1.2 kurz angesprochen sind chirale Alkohole wichtige Synthesebausteine in der pharmazeutischen- und Agro-Chemie sowie bei der Synthese von Feinchemikalien. Bisher werden sie hauptsächlich durch Kohlenwasserstoffoxidation, Reduktion von Ketonen oder mittels Esterhydrolysen produziert, dabei entstehen jedoch in der Regel keine enantiomerenreinen Produkte. Deshalb wurden alternative Methoden entwickelt, die z.B. auf enantioselektiven Lipase-katalysierten Hydrolysen von racemischen Estern zu chiralen Alkoholen basieren. Die dabei entstehenden chiralen Alkohole liegen in unterschiedlichen Verhältnissen vor, was sich quantitativ als Enantiomerenüberschuss (**ee**) ausdrücken lässt. Um z.B. Lipasen auf die enantioselektive Umsetzung von racemischen Estern zu chiralen Alkoholen mittels

gerichteter Evolution optimieren zu können, ist es notwendig Methoden zur Hochdurchsatz-Detektion des entstehenden chiralen Alkohols zu entwickeln. Für ein Hochdurchsatz-Screening wurden bisher nur technisch anspruchsvolle Methoden wie: ESI-MS ^[256], HPLC-CD ^[257] sowie FT-IR ^[258] Spektroskopie Methoden beschrieben. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine neue kolorimetrische Methode zur ersten groben Abschätzung der *ee*-Werte der produzierten chiralen Alkohole entwickelt. So können interessante Varianten aus einer großen Anzahl von Klonen schnell vorselektiert werden und anschließend eingehend mit instrumenteller Analytik wie chiraler HPLC oder GC untersucht werden.

3.1.3.1 Grundlagen der Detektions-Methodik

Wie zuvor beschrieben können Lipasen racemische Ester enantioselektiv zu chiralen Alkoholen umsetzen. Zur Unterscheidung der beiden entstandenen Enantiomere werden in diesem Ansatz zwei komplementäre enantioselektive Alkoholdehydrogenasen (ADHs) verwendet ^[260]. Hierbei oxidiert die ADH aus *Rhodococcus erythropolis* (DSM 43297) selektiv nur das (*S*)-Enantiomer, die ADH aus *Lactobacillus kefir* (DSM 20587) hingegen kann nur das (*R*)-Enantiomer umsetzen ^[209, 210, 259]. Bei beiden Oxidationsreaktionen wird NAD(P)H als Redoxäquivalent freigesetzt. Im nächsten Schritt wird das gebildete NAD(P)H durch die Diaphorase aus *Clostridium kluyveri* wieder zu NAD(P) oxidiert. Dieser Schritt geht mit der Reduktion von zugegebenen 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl--2H-tetrazolium (INT) zu Formazan, einem roten Farbstoff einher (Abb. 27). Die Entwicklung dieser Rotfärbung kann bei 492 nm leicht verfolgt werden. Zur genauen Beschreibung der Testzusammensetzung s. 2.20 (s. Abb. 2.2).

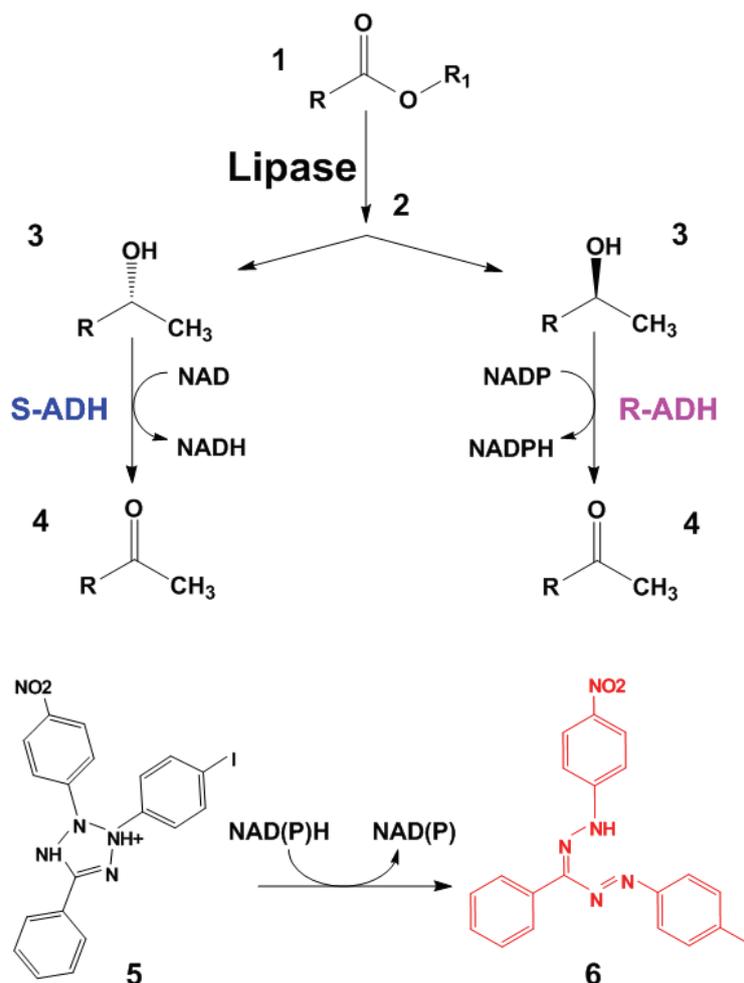


Abb. 3.14: Prinzip des entwickelten kolorimetrischen Hochdurchsatz-Tests für die enantioselektive Bestimmung durch Lipasen gebildeten chiralen Alkoholen.

Der als Racemat vorliegende Ester (1) wird im Test durch die zu untersuchende Lipase (2) zu den jeweiligen chiralen Alkoholen (3) umgesetzt. Diese werden in einer gekoppelten Enzymreaktion durch komplementäre enantioselektive ADHs [(*R*)-spezifische ADH aus *L. Kefir* (*R*-ADH) und (*S*)-spezifische ADH aus *R. erythropolis* (*S*-ADH)] oxidiert (4). Die dabei freigesetzten Redoxäquivalente NAD(P)H werden im Anschluss durch die Diaphorase aus *C. kluyveri* wieder zu NADP bzw NADPH oxidiert. Dabei wird die Tetrazolium-Verbindung (INT) (5) zum rot gefärbten Formazan (6) reduziert. Die Bildung dieses Farbstoffs kann photometrisch bei 492 nm verfolgt werden ^[260].

Zur Überprüfung der Funktionalität wurde diese Methode erfolgreich in der gerichteten Evolution angewendet, verschiedene BSLA Mutantenbibliotheken wurden bezüglich der Enantioselektivität der Hydrolyse von 1-Phenylethyl-acetaten durchmustert. Es ist bekannt, dass die BSLA diese Reaktion mit einer sehr hohen Enantioselektivität (92% ee (*R*), bestimmt mit chiraler GC) katalysiert. Darüber hinaus wurde die Anwendbarkeit des Tests in 386er Mikrotiterplatten gezeigt, die Pipettiervorgänge wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters (Tecan Workstation 200) durchgeführt. Abb. 3.15 zeigt das typische Erscheinungsbild einer solchen Platte,

deutlich zu erkennen ist die Präferenz des verwendeten Enzyms (BSLA) für das *R*-Enantiomer (links bzw. rechts) ^[260].

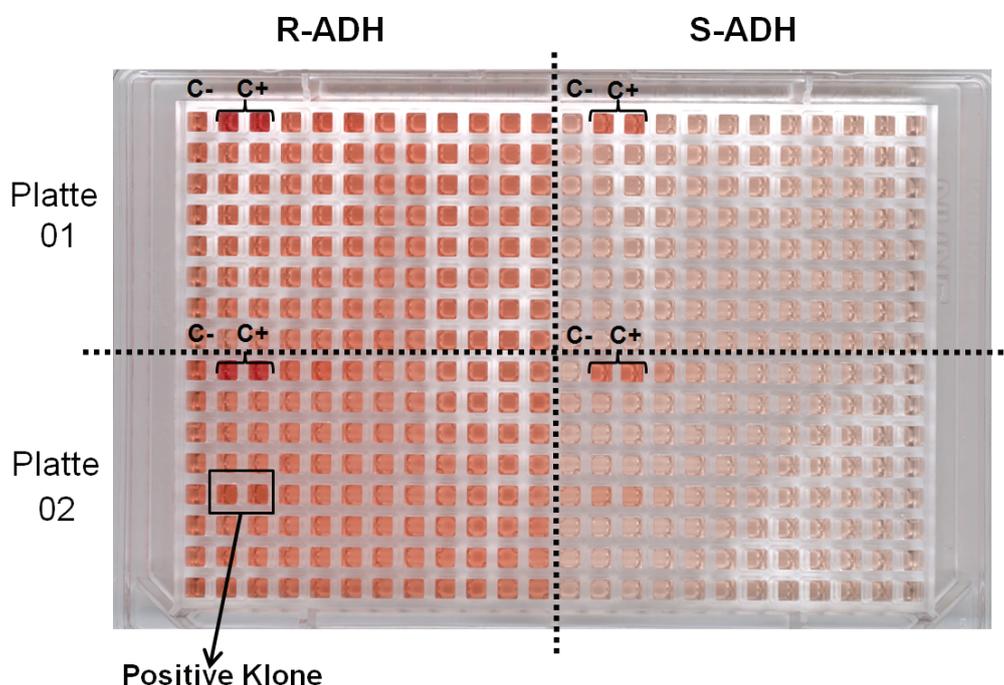


Abb. 3.15: Fotografie einer 386er Mikrotiterplatte, in der der beschriebene Assay durchgeführt wurde. Linke Hälfte: Umsetzung der entstandenen Alkohole mit *R*-ADH, rechte Hälfte: Umsetzung der entstandenen Alkohole mit *S*-ADH. Hier zeigt die Färbung nach 5 Minuten Reaktionszeit. Auf dieser Platte wurde ein positiver Klon gefunden.

Ein sehr wichtiger Punkt bei der Entwicklung dieses Tests war die Verwendungsmöglichkeit als Hochdurchsatzsystem. Das Probenvolumen konnte sogar soweit reduziert werden, dass 386er Mikrotiterplatten verwendet werden konnten, was den Durchsatz und die Materialkosten noch einmal entscheidend erhöht bzw. verringert. Mit Hilfe der Automatisierung können bis zu 192 Proben in 20 Minuten getestet werden, das bedeutet einen Durchsatz von 14000 Proben pro Tag. Der Test kann prinzipiell auch mit Zellrohextrakten durchgeführt werden, diese Anwendung wurde mit dem Screening einer kleinen Lipasebank gezeigt (s. 3.1.3.2), hier ergeben sich allerdings einige Unwägbarkeiten, die bei der Verwendung solcher heterogener Proben immer auftreten. So kann man z.B. nicht davon ausgehen, dass in jeder Probe (also jedem Well der Anzuchtplatte) die gleiche Enzymmenge vorhanden, da einzelne Varianten besser oder schlechter exprimiert werden können. Dies kann zu falsch-positiven Treffern führen, bei denen das Enzym nicht aktiver ist, sondern nur in größerer Menge exprimiert wird. Ein weiterer negativer Aspekt ist auf das Kulturmedium zurückzuführen, einige Komponenten können mit der ADH-

Ergebnisse und Diskussion

Reaktion oder der Diaphorase interferieren. Daraus resultiert eine Variation in der Farbentwicklung. Wie unten demonstriert wird, ist der Assay mit den entsprechenden Negativkontrollen jedoch gut durchführbar.

3.1.3.2 Anwendung des Enantioselektiven Lipase-Hochdurchsatz-Tests

In einem ersten Screening wurden ca. 2000 Klone einer BSLA-Sättigungsmutagenese-Bank untersucht. Interessanterweise wurden die Aktivität und der hohe ee-Wert (92%) des Wildtyp-Enzymes in allen Varianten eher negativ beeinflusst. Weiter konnten mit Hilfe des entwickelten Hochdurchsatz-Tests Mutanten mit invertierter Enantioselektivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym identifiziert werden. Die Ergebnisse für einige dieser Mutante wurden mittels chiraler Gaschromatographie (GC) überprüft. Interessant ist, dass alle diese Varianten nur einzelne Mutationen aufweisen, diese reichen jedoch aus, um die Enantioselektivität der Wildtyp BSLA zu zerstören. Die scheinbar invertierte Enantioselektivität konnte mittels chiraler GC für einen der Klone bestätigt werden (10% ee(S)), die anderen wiesen keine Enantioselektivität mehr auf. Dies zeigt einerseits, wie wichtig es ist, die im Test vorselektierten Varianten eingehend mit instrumenteller Analytik zu untersuchen, um genaue Aussagen treffen zu können. Andererseits wird hierdurch auch deutlich, wie wertvoll ein solches System ist, um aus einer Bank mit mehreren tausend Klonen, interessante Kandidaten auszusondern, die dann genauer untersucht werden können.

3.1.4 Entwicklung eines Agarplatten-Assays für Epoxidhydrolasen

Eine im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelte Methode zur Detektion von Epoxidhydrolaseaktivität basiert auf der Fluoreszenz des Reaktionsproduktes 1-(4-Nitrophenyl)-Ethan-1,2-diol (Abb. 3.16), welches bei der Hydrolyse der von *para*-Nitrostyroloxid (*p*NSO) als Substrat-Epoxid entsteht (s. auch 2.21.).

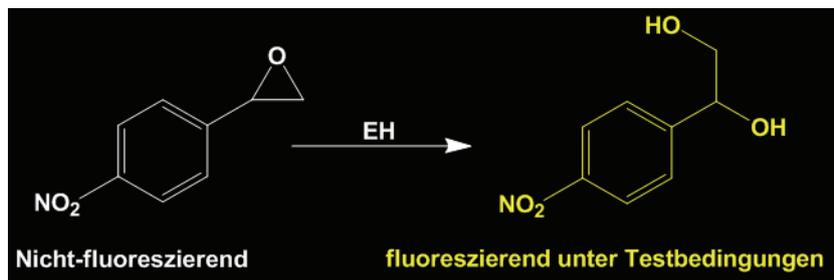


Abb. 3.16: Epoxidhydrolase Reaktion mit *para*-Nitrostyroloxid (pNSO)

Für den Test wurden *E. coli* BL21(DE3)-Klone, welche die Vektoren pET22lipA (BSLA) und pBBXPL (Esterase aus *P. aeruginosa*) tragen als Negativkontrollen und *E. coli* DH5 α mit dem Vektor pQE60-EH (Epoxidhydrolase aus *A. niger*) als Positivkontrolle verwendet. Als zusätzliche Negativkontrolle diente der Leervektor pQE-60.

Die Zellen wurden ÜN auf LB-Agarplatten angezogen. Filterpapier wurde mit pNSO-Lösung getränkt und an der Luft getrocknet. Das getrocknete Filterpapier wurde direkt auf die frischen Kolonien aufgelegt. Die in den Bakterien-Zellen auf der Agarplatten exprimierte EH setzt das Substrat pNSO zu dem fluoreszierenden Produkt um. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Filterpapiere von den Agarplatten abgenommen und unter UV Licht betrachtet. Zellen mit Epoxidhydrolaseaktivität lassen sich aufgrund ihrer Fluoreszenz erkennen. Die Abb.3.17 zeigt die mit den verschiedenen oben beschrieben Bakterienstämmen erhaltenen Resultate. Nur die Zellen mit Epoxidhydrolaseaktivität zeigen Fluoreszenz. Der Test ist selektiv für Epoxidhydrolaseaktivität, da keine Fluoreszenz für die Lipase- und Esteraseklone sichtbar war.

Ergebnisse und Diskussion

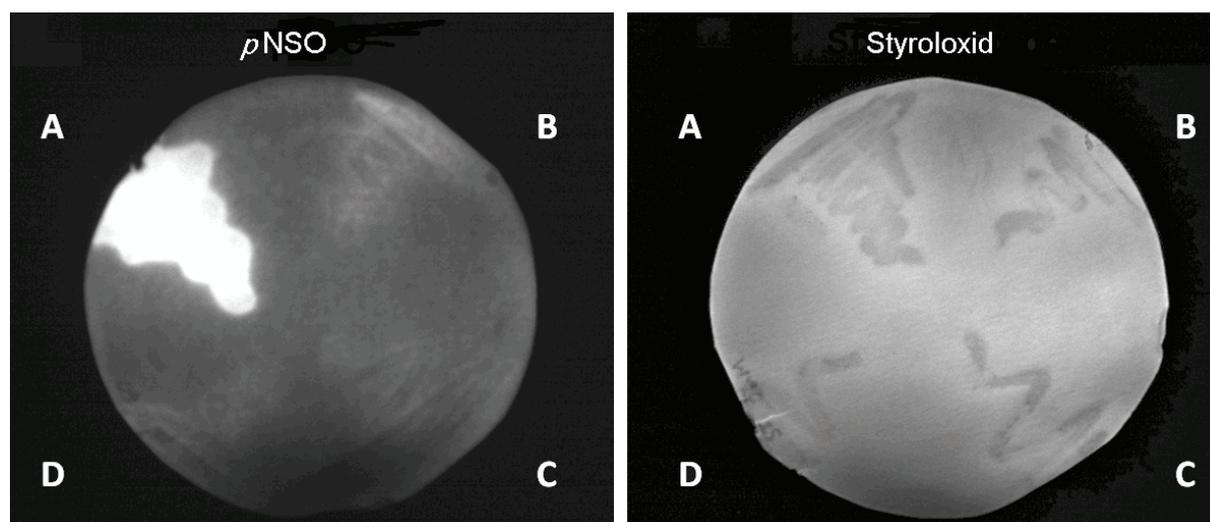


Abb. 3.17: Filterpapier-Test auf Epoxidhydrolaseaktivität. Als Substratlösung wurde entweder 100mM pNSO (links) oder als Fluoreszenz-Negativ-Kontrolle Styroloxid (rechts) verwendet. (A) Epoxidhydrolase – pQE-EH mit *A. niger* Epoxidhydrolase, (B) Negativkontrolle BI21(DE3) mit pET22b (Leervektor), (C) Esterase pBBXPL mit Esterase von *P. aeruginosa* und (D) Lipase – pET22lipA BSLA. Nur Zellen mit Epoxidhydrolaseaktivität zeigen Fluoreszenz im pNSO-Filterpapier Test.

Es wurden weitere EH Substrate mit verschiedenen großen Substituenten getestet, wie z.B. Styroloxid (Abb. 3.17), die besten Ergebnisse wurden mit allerdings pNSO erzielt. Abb. 3.18 zeigt die chemischen Strukturen der zusätzlich getesteten Substrate.

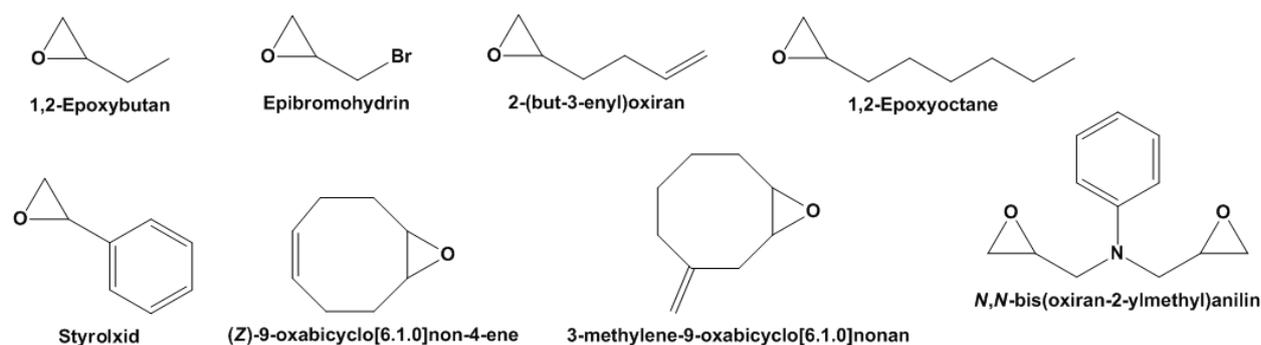


Abb. 3.18: Andere potenzielle EH Substrate, die im neu entwickelten Fluoreszenstest untersucht wurden.

Der Vorteil dieses Assays ist seine Einfachheit, es sind keine aufwändigen Pipettierschritte oder gekoppelte Enzymreaktionen notwendig. Dies ist im Besonderen für einen Metagenomansatz vorteilhaft, wo normalerweise auf mehrere Aktivitäten gleichzeitig getestet wird. Ein Nachteil ist, dass der Assay nicht direkt mit den transformierten und ausplattierten Zellen durchgeführt werden kann. Es kam vor,

dass fast die ganze Kolonie auf den Filterpapieren kleben blieb, so ist die Anfertigung einer Replikplatte unerlässlich für den Test.

Ein anderer Nachteil ist die Einschränkung des Systems auf ein bestimmtes Substrat. Nur EHs mit Aktivität gegenüber *p*NSO können detektiert werden. Durch die Verlängerung der Expositionszeit können aber auch EHs mit geringer Aktivität gegenüber *p*NSO gefunden werden, die dann evtl. andere Substrate besser umsetzen. Dies kann dann bei der genauen Charakterisierung der identifizierten Varianten mit quantitativen und chiralen Methoden überprüft werden. So ist dieser Assay gut geeignet, um neue EHs zu entdecken, oder mittels gerichteter Evolution EH Nebenaktivitäten zu identifizieren oder zu verbessern.

3.2 Gerichtete Evolution als Methode zur Veränderung von Enzymaktivitäten

Im diesem Teil der Arbeit sollten neue Enzymaktivitäten durch das Einbringen von zufälligen Mutationen in ein Enzym entwickelt werden. Als Modellenzym diente hier die Lipase A aus *B. subtilis*, ein intensiv charakterisiertes Enzym, das als minimale α/β -Hydrolase bezeichnet wird ^[26] (s.1.2.2.2) und von dem zu Beginn der Arbeit schon mehrere Variantebanken existierten, die als Startpunkt genutzt werden konnten.

3.2.1 Die Lipase A (BSLA) aus *B.subtilis* zeigt eine Phospholipase-Nebenaktivität

Vor Durchführung der Mutagenese und des Screenings auf katalytische Promiskuität, wurde das Wildtypenzym (BSLA) auf etwaige Nebenaktivitäten hin untersucht (Abb. 3.19). Interessanterweise zeigte sich im Rahmen dieses Test, dass BSLA eine Phospholipase-Nebenaktivität besitzt, welche bisher noch unbekannt für dieses Protein war.

Ergebnisse und Diskussion

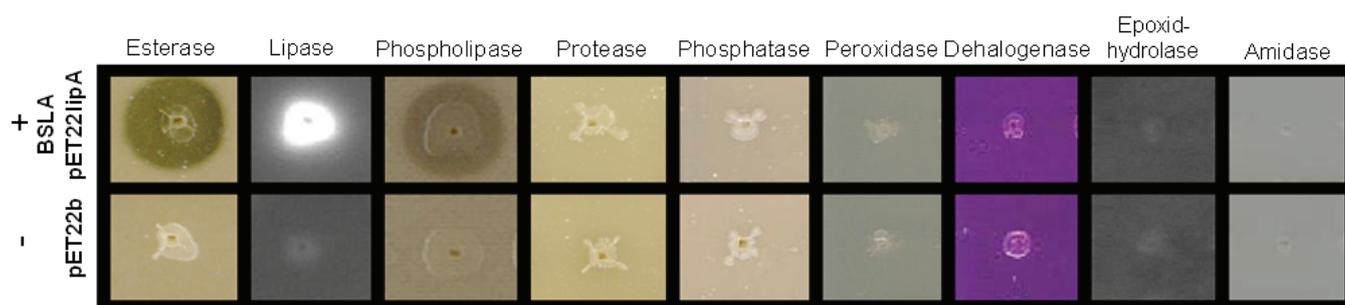


Abb. 3.19: Screening von BSLA auf verschiedenen Agarplattentests. BSLA zeigt nicht nur Lipase- und Esterase- Aktivität sondern auch Phospholipase-Aktivität.

Wie bereits mehrfach diskutiert, besitzen die verschiedenen Enzymklassen der α/β -Hydrolase Familie oftmals eine breite Substratspezifität (s. 1.3.3). So zeigt BSLA Aktivität gegenüber vielen verschiedenen Lipiden: Unter anderem werden kurzkettige- und langkettige Triacylglyceride hydrolysiert. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden das BSLA zusätzlich Phospholipide spalten kann. Unter den bakteriellen Lipasen ist die Lipase aus *S. hyicus* (SHL) die einzige, die hohe Phospholipase A1- und etwas schwächere Phospholipase A2-Aktivität besitzt. Außerdem besitzt das Enzym hohe Lipase-Aktivität gegenüber Triacylglyceriden ^[261, 262]. Die meisten Lipasen, die Phospholipase-Aktivität zeigen, gehören, wie die *S. hyicus* Lipase zur I6-Familie (diese Klassifikation beruht auf dem von Arpigny und Jaeger vorgeschlagenen Schema ^[263]). Lipasen und Esterasen aus dieser Familie besitzen ca. 40% Sequenzhomologie (auf Aminosäure-Ebene) mit den eukaryotischen Lysophospholipasen ^[263].

Andere Mitglieder dieser Familie wurden bereits oben erwähnt, z.B. die Lipase aus *B. thermocatenuatus* (BTL2) ^[111] und die Lipase aus *S. aureus* (SAL) ^[264]. Im Vergleich zum letzteren Enzym (SAL) haben BTL2 und SHL nur eine sehr schwache Phospholipase A1-Aktivität. Ein Vergleich zwischen BSLA, und den hier beschriebenen bakteriellen Lipasen (mit Phospholipase-Nebenaktivität) hat gezeigt, dass nur eine geringe Sequenzhomologie (auf Aminosäure-Ebene) (Abb. 3.20) zwischen den verschiedenen Enzymen vorhanden ist. Ein Vergleich bekannter 3D-Strukturen, z.B. BSLA mit SHL, zeigt jedoch eine hohe Konservierung des generellen Faltungsmotivs, d.h. diese auf Sequenzebene so verschiedenen Enzyme sind sich in ihrer 3D-Struktur sehr ähnlich.

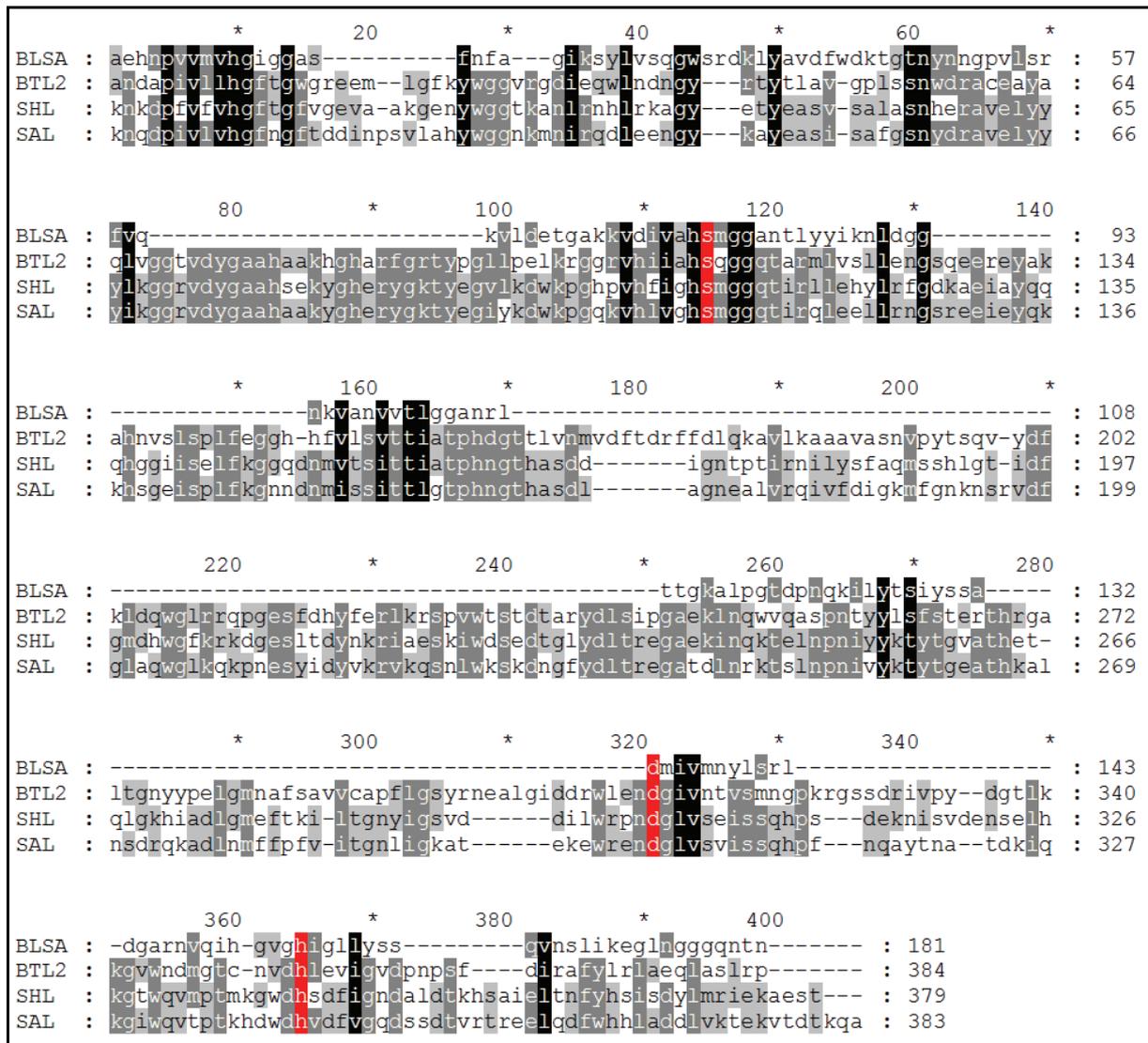


Abb. 3.20: Sequenzvergleich der BSLA mit anderen bakteriellen Lipasen mit Phospholipase Nebenaktivität. Der Vergleich zeigt geringe Homologie zwischen der BSLA und den anderen Lipasen, jedoch eine hohe Homologie zwischen SHL, SAL und BTL2. BSLA besitzt 7% Identität mit SAL mit BTL2 und 8% Identität mit SHL. Die katalytische Triade (Ser-Asp-His) der jeweiligen Lipasen ist im Alignment rot hervorgehoben. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau (drei Sequenzen) bzw. hellgrau (zwei Sequenzen) eingefärbt.

Im Gegensatz dazu zeigen Lipasen aus Eukaryoten oft eine sehr hohe Phospholipase-Aktivität, so z.B. die Meerschweinchen Pankreaslipase (GPL) ^[265, 266]. Interessanterweise besitzt GPL, wie BSLA keine definierte Deckelstruktur was zu der Annahme führte, dass die Abwesenheit dieses Strukturelementes wichtig für die Entwicklung von Phospholipase-Nebenaktivität ist ^[267]. Mit der Entdeckung und Charakterisierung der humanen Pankreaslipase (HPL), welche in ihrer Sequenz sehr ähnlich zur GPL ist, jedoch eine definierte Deckelstruktur besitzt, wurde dieses Argument widerlegt bzw. abgeschwächt. Es wird nun vielmehr angenommen, dass

Ergebnisse und Diskussion

nicht nur das Fehlen einer Deckelstruktur, sondern auch spezifische Aminosäure-Reste in der 3D-Struktur des jeweiligen Enzymes für eine Phospholipase-Aktivität wichtig sein könnten [268]. Darüber hinaus konnten, basierend auf Mutationsstudien an SAL, Aminosäure-Reste im C-Terminus des Enzymes identifiziert werden, die relevant für die Phospholipase-Aktivität des Enzymes sind [264, 269]. In letzter Zeit konnte mittels gerichteter Evolution in der C-terminalen Region der SAL ihre Phospholipase-Aktivität um circa das 12-fache erhöht werden [268]. Auch hier wird deutlich, dass die Abwesenheit eines Deckels im Enzym nicht einzig und allein für die Phospholipase-Aktivität des Enzymes verantwortlich sein kann.

Da Phospholipide polarer sind als normale Lipide, wurde erwartet, dass diese Enzyme auch mehr polare Aminosäuren im aktiven Zentrum besitzen [269]. Dieses Phänomen wurde z.B. für SHL beschreiben. SHL besitzt mehr polare Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums. Insbesondere ein polarer Serin-Rest (Ser356) spielt hierbei eine wichtige Rolle, da er in der Nähe des Histidins (His355) der katalytischen Triade liegt und für die Bindung des Substrates von Bedeutung ist [269]. Im Gegensatz dazu besitzt BSLA eher wenige polare Aminosäuren im aktiven Zentrum. Demzufolge ist diese vorher abgeleitete allgemeine Regel hier nicht anwendbar. Es ist jedoch z.B. denkbar, dass weit vom aktiven Zentrum entfernte Aminosäuren die Phospholipid-Substrat Bindung vermitteln.

3.2.2 Die LipaseB (BSLB) aus *B.subtilis* besitzt keine Phospholipase-Aktivität

Da die Phospholipase-Aktivität bisher noch unbekannt für die BSLA war, wurde auch die zu BSLA sehr ähnliche Lipase B aus *B. subtilis* (BSLB) untersucht. Dazu wurden *E. coli* BL21(DE3)-Klone, welche die Plasmide pET22lipA, pET19lipB und pET22lipB trugen, in allen Agarplatten-Tests auf eventuelle Aktivitäten geprüft (Ergebnisse nicht dargestellt). Außer der für das Protein beschriebenen Lipaseaktivität konnte keine andere Aktivität nachgewiesen werden.

Abb. 3.21 zeigt die Ergebnisse für Tributyrin (Lipase/ Esterase) und Phosphatidylcholin (Phospholipase), deutlich zu erkennen sind die Klärhöfe für BSLA und BSLB auf Tributyrin Platten, nur im Fall von BSLA kann zusätzlich Phospholipase-Aktivität auf Eigelb-Platten nachgewiesen werden.

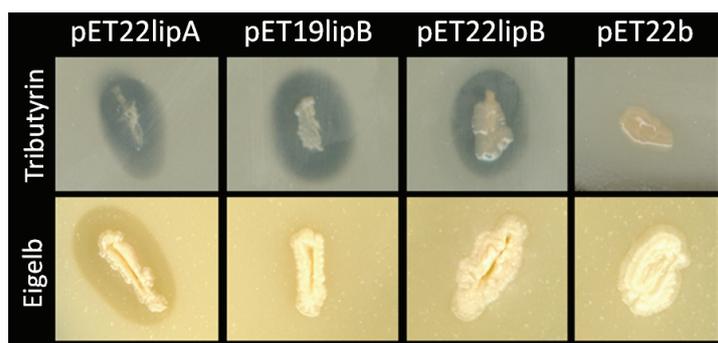


Abb. 3.21: Klärhofbildung auf Tributyrin-Platten und Eigelb-Platten durch die BSLA und die BSLB. Die *E. coli* BL21(DE3)-Klone tragen die Plasmide pET22lipA, pET19lipB und pET22lipB. pET22b ist der Kontrollversuch, für den der Bakterienstamm mit dem Leervektor transformiert wurde.

Da BSLB und BSLA zu 75% identisch auf Aminosäure-Ebene sind, wurde erwartet, dass auch das verwandte Enzym BSLB Phospholipase-Nebenaktivität besitzt. Dies war jedoch nicht der Fall. Eine Erklärung hierfür könnte in der geringeren Substratspezifität von BSLB im Vergleich zu BSLA zu suchen sein (s. 1.2.2.2), da eine geringere Substratspezifität ein weniger flexibles aktives Zentrum nahe legt. Dieses Ergebnis verdeutlicht weiterhin, dass nur wenige Aminosäureunterschiede nötig sind, um sowohl eine unterschiedliche Substratpräferenz (s.1.3.3) als auch promiskuitive Phospholipase-Nebenaktivität hervorzurufen (s. 3.2.1).

Eine Analyse der Aminosäuren, die sich in BSLA und BSLB unterscheiden, ist jedoch wenig aussagekräftig. So gibt es z.B. die gleiche Anzahl von polaren und unpolaren Aminosäure-Resten in beiden Enzymen. Es scheint also im Fall von BSLA und BSLB der Fall zu sein, dass die Anzahl und Position von polaren Aminosäure-Resten im Enzym keine Rolle für die Substratspezifität und Nebenaktivitäten spielt.

3.2.3 Screening einer Sättigungsmutagenesebank auf verschiedene Aktivitäten

Eine komplette Sättigungsmutagenese-Bank enthält alle Varianten eines Enzyms mit genau einem Aminosäureaustausch. Es werden dabei alle Aminosäure-Positionen der Enzymsequenz einzeln abgesättigt, d.h. gegen jede der 20 proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine solche Sättigungsmutagenesebank der BSLA auf katalytische Promiskuität hin untersucht. Die entsprechende Bank wurde in früheren Arbeiten erstellt (Funke, 2004^[156]). Die Variantenbank wurde mittels der in 3.1 vorgestellten Agarplattentests auf andere α/β -Hydrolase Aktivitäten hin untersucht. Alle Varianten wurden also auf neun

Ergebnisse und Diskussion

verschiedene Aktivitäten (Lipase, Esterase, Phospholipase, Protease, Peroxidase, Phosphatase, Amidase, Epoxidhydrolase, Dehalogenase) überprüft.

Ein Teil der 181 PCR-Produkte dieser Sättigungsbank, welche als Ligationsansatz mit dem Vektor pET22b(+) zur dauerhaften Aufbewahrung bei -20 °C gelagert wurden, wurden in dieser Arbeit erneut in Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Falls diese Strategie für einzelne Ligationsansätze keinen Erfolg zeigte, wurden 1-2 µl des entsprechenden Ligationansatzes in einer PCR-Reaktion erneut amplifiziert und das PCR-Produkt in den Vektor pET22b(+) kloniert und transformiert.

Um alle theoretisch möglichen Proteinvarianten durchmustern zu können, wurden pro Aminosäureposition bis zu 300 Proteinvarianten getestet. Dies bedeutet dass je 3 Platten pro Aminosäure-Position gepickt wurden, um eine mindestens zehnfache Überabtastung des Sequenzraumes zu erreichen. So sollte sichergestellt werden, dass jede Variante mindestens einmal getestet wurde. Insgesamt wurden zunächst 550 BSLA-Variantenplatten geprüft, dies entspricht ungefähr 50000 Varianten, die auf 9 verschiedene Aktivitäten (s. 3.1.1 und 3.1.2) gescreent wurden, was über 500000 einzelnen Tests entspricht (Abb. 3.22). In der gesamten gescreenten Sättigungsbank konnte jedoch keine Variante identifiziert werden, die eine neue Aktivität gegenüber dem Wildtypenzym gewonnen hatte.

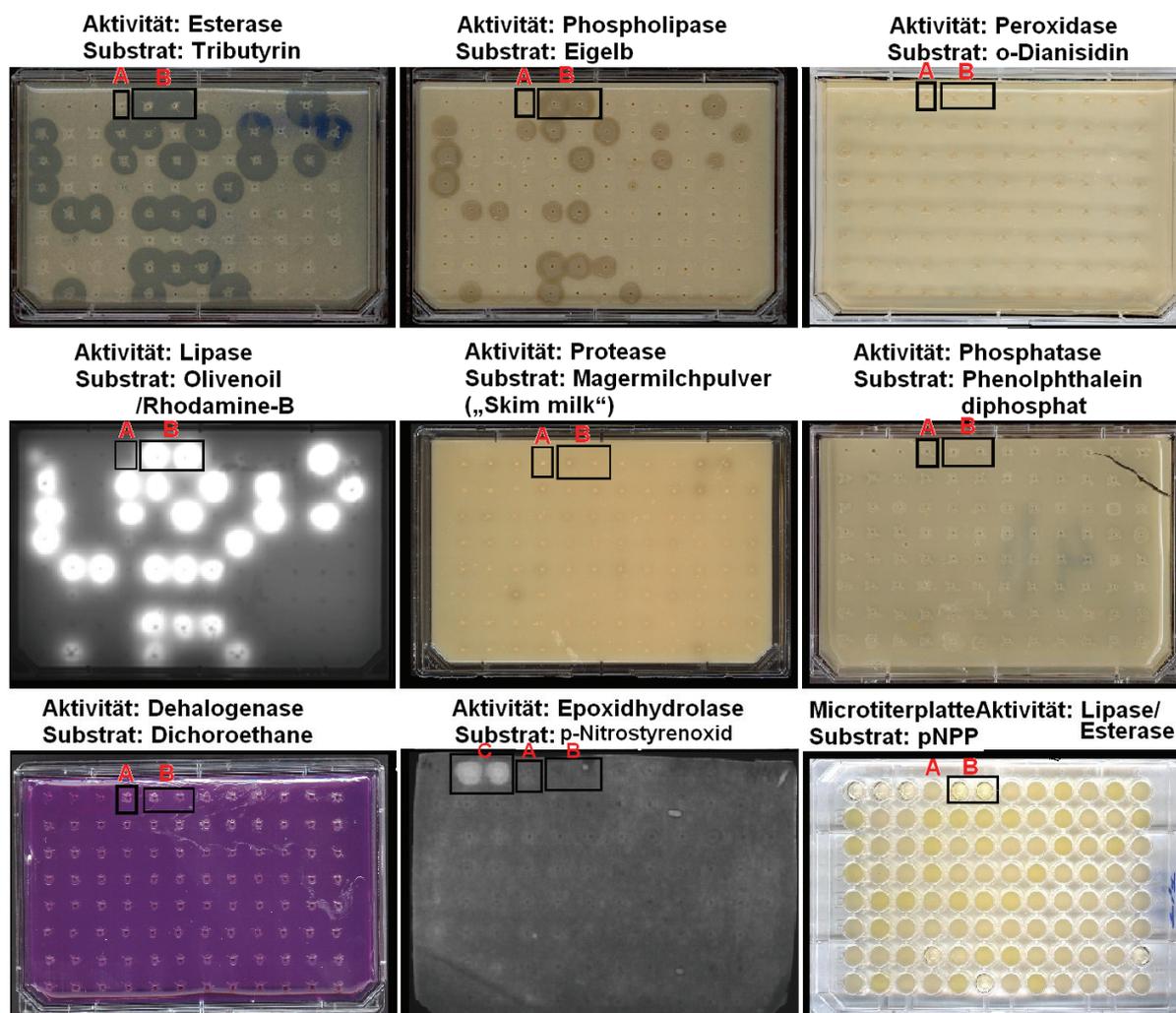


Abb. 3.22: Beispiele für die verschiedenen Agarplatten-Tests. A: Negativkontrolle (Leervektor), B: Positivkontrolle (BSLA) C: Positivkontrollen (EH)

Prinzipiell lassen sich mehrere Erklärungen finden, warum keine neue promiskuitive Aktivität für BSLA gefunden werden konnte: z.B. bietet die minimale α/β -Hydrolasestruktur der BSLA ^[26] wenig Basis, um Mutationen einzuführen. Eine solche minimale Struktur könnte sterisch und funktional im Laufe der Evolution stark „angepasst“ worden sein. Eine solche minimale und oftmals weniger flexible Struktur könnte auch weniger tolerant gegenüber Mutationen sein, die auf eine neue promiskuitive Aktivität ausgerichtet sind, da die Erzeugung einer solchen Nebenaktivität eine gewisse konformationelle Flexibilität des Enzyms voraussetzt [112].

Ein anderes Problem könnte im begrenzten Substratspektrum, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, zu suchen sein. So wurden in dieser Arbeit lediglich die Hauptsubstrate der jeweiligen Enzymklassen für das Screening eingesetzt.

Ergebnisse und Diskussion

Eventuell wäre es möglich gewesen unter Verwendung von anderen (spezielleren) Substraten für die gleiche Enzymreaktion, promiskuitive Aktivitäten gegenüber eben diesen speziellen Substraten zu finden, nicht aber im Hinblick auf das Hauptsubstrat. Dies hätte aber eine weitere Vervielfältigung des durchzuführenden Aktivitätstest bedeutet, was wahrscheinlich die Notwendigkeit nach sich gezogen hätte, die Anzahl der verschiedenen Aktivitätstest an anderer Stelle zu reduzieren. Eine weitere Ursache könnte in den verwendeten Testsystemen selbst liegen. Insbesondere ist es möglich, dass geringe Aktivitäten nur sehr schlecht oder gar nicht mittels der verwendeten Agarplatten-Testsysteme identifiziert werden können. Obwohl Agarplatten-Tests bezüglich Kosten und Zeitaufwand ideal als Screening-System geeignet sind, sind sie in der Regel nicht so sensibel wie z.B. spektrophotometrische oder chromatographische Detektionsmethoden, die wiederum aber nicht im Hochdurchsatzverfahren anwendbar sind.

Es wird generell diskutiert, dass ein evolutiver Prozess, der ausschließlich auf natürlicher Selektion im Sinne Darwins basiert, nicht sonderlich effektiv ist, um neue Proteine hervorzubringen. Eine Selektion bewahrt und verbessert tendenziell eine bereits vorhandene Funktion, ändert diese jedoch nicht ^[270].

So findet man in der Literatur viele Beispiele, wo Proteine mit verbesserten Aktivitäten, Selektivitäten und Stabilitäten erzeugt werden konnten. Seltener sind jedoch Beispiele, in denen komplett neue Aktivitäten mittels evolutiver Methoden erzeugt werden konnten. Computersimulationen haben gezeigt, dass der Austausch einzelner Aminosäuren nicht effektiv ist, um die Substratazeptanz eines Proteines und damit evtl. dessen Aktivität zu verändern ^[271].

Außerdem ist es generell fraglich, ob eine einzelne Punktmutation ausreichend ist um genügend strukturelle Veränderungen im Enzym hervorzurufen, damit eine völlig neue Aktivität generiert werden kann. Zu beachten ist hier insbesondere, dass diese unterschiedlichen Aktivitäten teilweise auf verschiedenen Reaktionsmechanismen basieren. Man weiß z.B., dass in der Natur neben Punktmutationen auch andere Mechanismen wie z.B. Deletionen und Insertionen größeren Strukturabschnitten zur Bildung neuer Enzymklassen wichtig sind.

Ein gutes Beispiel hierfür ist die Arbeit von Park *et al.* (2006) ^[272]. Der Startpunkt darin waren zwei Proteine aus unterschiedlichen Enzymklassen, welche unterschiedliche Reaktionsmechanismen und Substratspezifitäten zeigen, jedoch strukturell das gleiche Faltungsmotiv ($\alpha\beta/\beta\alpha$ Sandwich) besitzen. Der strukturelle

Unterschied zwischen den beiden Proteinen war hierbei hauptsächlich in zusätzlichen, jedoch für die jeweilige Enzymklasse spezifischen, Strukturelementen begründet. Mittels eines Austausches (Deletion und Insertion) der für die jeweiligen Proteine charakteristischen Strukturelemente, konnte ein Austausch der katalytischen Aktivität erreicht werden. Zusätzlich waren einige Punktmutationen notwendig, um eine Feinanpassung der in dieser Weise neu generierten Struktur vorzunehmen. Dieses Beispiel zeigt anschaulich, dass es im Labor prinzipiell möglich ist, die Mechanismen der Evolution nachzustellen, jedoch auch, dass oftmals einzelne Punktmutationen allein nicht zum gewünschten Ergebnis führen können und werden.

Die oben erwähnte Feinanpassung durch Zufallsmutagenese stellt eine zusätzliche Option dar, Enzyme an neue Aktivitäten anzupassen und wurde auch im Fall der BSLA angewendet (s. 3.2.4).

Obwohl keine neue Aktivität mittels des Sättigungsmutagenese-Ansatzes in die BSLA eingeführt werden konnten, wurden dennoch Veränderungen in den Haupt- und Nebenaktivitäten der BSLA beobachtet.

Es wurde beobachtet, dass einige Aminosäure-Positionen (Positionen 11, 15, 21, 22, 27, 54, 57, 68, 74, 128, 164 und 149) zum kompletten Verlust der Haupt- und Nebenaktivitäten führten. Vermutlich sind diese Positionen für den strukturellen Faltungsprozess oder die strukturelle Integrität des Enzyms wichtig (Abb. 3.23).

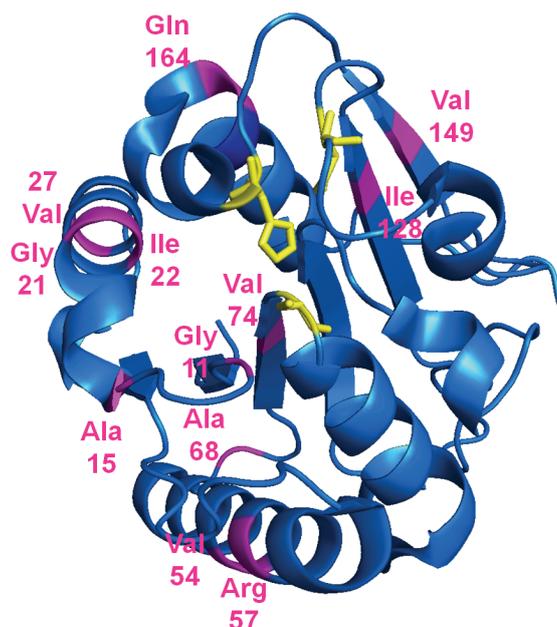


Abb. 3.23: Aminosäurepositionen, die zu einem völligen Aktivitätsverlust führen. Dabei sind die Aminosäure-Seitenketten der katalytischen Triade in gelb hervorgehoben. Die für die Aktivität letalen Mutationen sind in magenta hervorgehoben.

Ergebnisse und Diskussion

Interessant hierbei ist, dass die meisten Aminosäuren, deren Mutation für die Aktivität letal ist, unpolar und sehr klein sind. Außerdem sind diese letalen Mutationen Großtenteils innerhalb der konservierten Sekundärstrukturelemente (wie α -Helix oder β -Faltblatt) zu finden, was wiederum eine Bedeutung dieser Reste für die generelle Faltungsintegrität des Enzyms nahelegt.

Wie sich in Vorversuchen gezeigt hat, besitzt BSLA neben Lipase- zusätzlich Phospholipase-Nebenaktivität (siehe Kapitel 3.2.1). Einige Mutanten aus der Sättigungsmutagenese-Bank wiesen verringerte Phospholipase-Aktivität auf und 265 Varianten verloren diese vollständig. Dies ging jedoch nicht mit einem Verlust der Lipase-Aktivität gegenüber drei verschiedenen Lipase-Substraten einher (Abb. 3.24). Diese 265 Klone wurden erneut untersucht, um das Ergebnis zu verifizieren. Dazu wurden die entsprechenden Plasmide erneut transformiert und die so erzeugten Re-Transformanten erneut getestet.

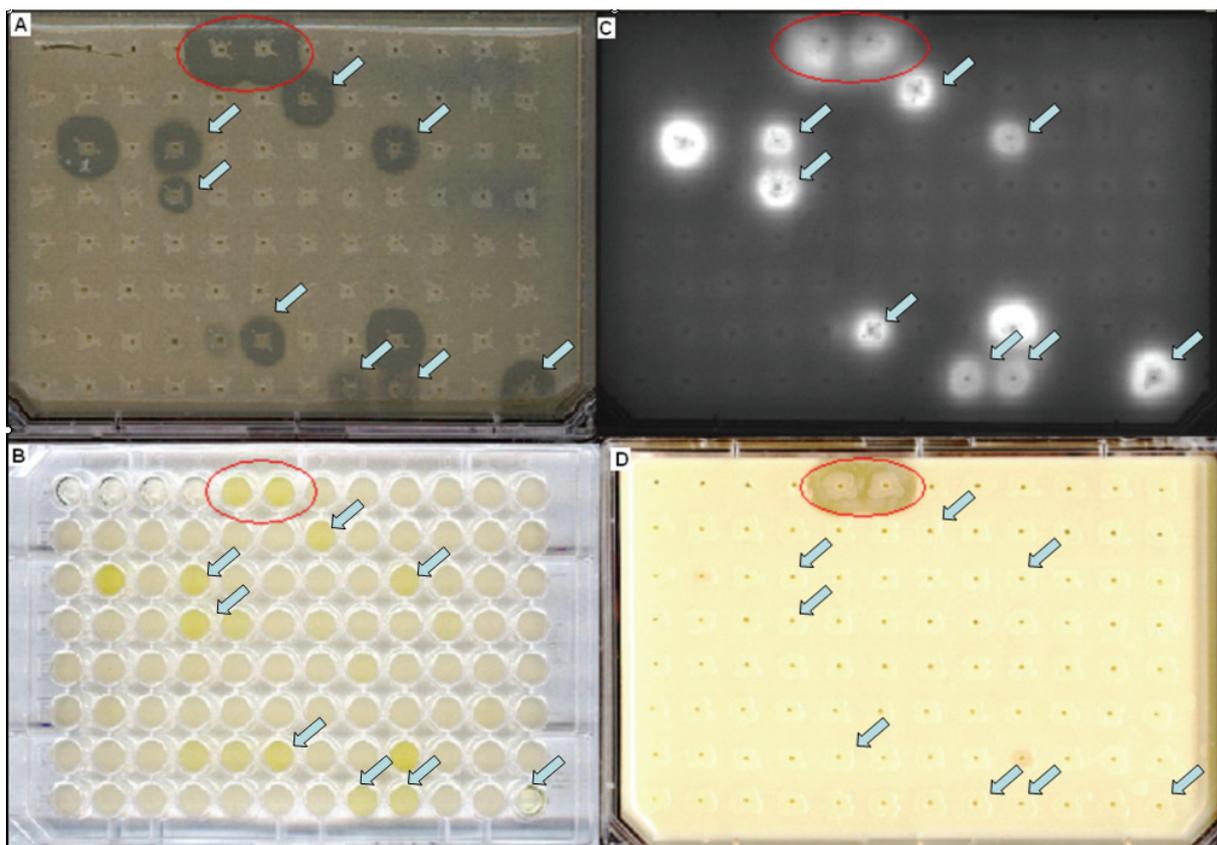


Abb. 3.24: Auswahl an Agarplatten-Tests für das Screening auf verschiedene α/β -Hydrolase Aktivitäten. (A) Esterase- und Lipasetest auf Tributyrin, (B) Lipasetest auf pNPP, (C) Lipasetest auf Rhodamine-B, (D) Phospholipasetest auf Phosphatidylcholin. Die Positivkontrollen sind mit roten Kreisen hervorgehoben. Die Pfeile zeigen Klone, welche die Phospholipase-Aktivität bei gleichzeitiger Erhaltung der Lipase-Aktivität verloren haben.

Die entsprechenden Varianten werden in Kapitel 3.2.5 ausführlicher charakterisiert und mögliche Gründe für den Verlust der Nebenaktivität diskutiert.

3.2.4 „Feintuning“: epPCR zur Erzeugung zusätzlicher Diversität in der BSLA Sättigungsmutagenese-Bank

Wie oben beschrieben kann es sinnvoll sein, nach dem ersten Verändern eines Enzyms (hier mittels der Sättigungsmutagenese) eine strukturelle Anpassung mit dem Einbringen zufälliger Mutationen herbeizuführen. Daher wurden im nächsten Schritt alle Sättigungsmutagenese-Varianten gepoolt und mittels epPCR einer weiteren Runde ungerichteter Mutagenese unterzogen. Dabei wurden drei verschiedene epPCR-Ansätze zur Erzeugung unterschiedlichen Fehlerraten verwendet. Die resultierenden Banken (EP1, EP2 und EP3) wiesen 2-3 Mutationen, 3-5 Mutationen bzw. 5-10 Mutationen pro 1000bp auf. Jeweils 5000 Klone jeder dieser drei Banken wurden auf jeweils neun verschiedene Aktivitäten hin untersucht. Es konnte jedoch auch mittels dieses Verfahrens keine Variante identifiziert werden, welche eine neue Aktivität im Vergleich zum Wildtypenzym entwickelt hatte.

Die geringe Größe des Enzyms wurde zu Projektbeginn als positiv angesehen, da aufgrund des ebenfalls kompakten Sequenzraums der Umfang der durch Zufallsmutagenesen angelegten Proteinbanken überschaubar bleiben sollte. Leider zeigte das Enzym nur eine geringe Toleranz gegenüber eingebrachten Mutationen. Mit der Anzahl der Mutationen nahm auch die Zahl der inaktiven Varianten pro Generation zu. Im diesem Zusammenhang wäre es interessant, diesen randomisierten Ansatz zur Erzeugung neuer Aktivitäten mit einem größeren Protein auszuprobieren, dessen Sequenz und Struktur Austausch vielleicht besser toleriert und prinzipiell mehr Spielraum bietet.

3.2.5. Wie lässt sich der Verlust der Phospholipase-Nebenaktivität begründen?

Wie in 3.2.3 beschrieben wurde, tauchten beim Screening der Sättigungsmutagenesebank nicht nur Varianten auf, die ihre komplette enzymatische Aktivität verloren hatten, sondern auch solche, die nur noch Lipaseaktivität aufwiesen und die Phospholipaseaktivität ganz oder zum Teil verloren hatten. Man kann direkt auf die mutierte Position zurückschließen, da die einzelnen Teile der

Ergebnisse und Diskussion

Sättigungsmutagenesebank (insgesamt 181 gesättigte Aminosäurepositionen) getrennt voneinander bearbeitet wurden. Daraus ergibt sich Abb. 3.25, in der die Häufigkeit der Fälle, in denen Phospholipase-Aktivität verloren wurde, für jede Aminosäure aufgetragen ist.

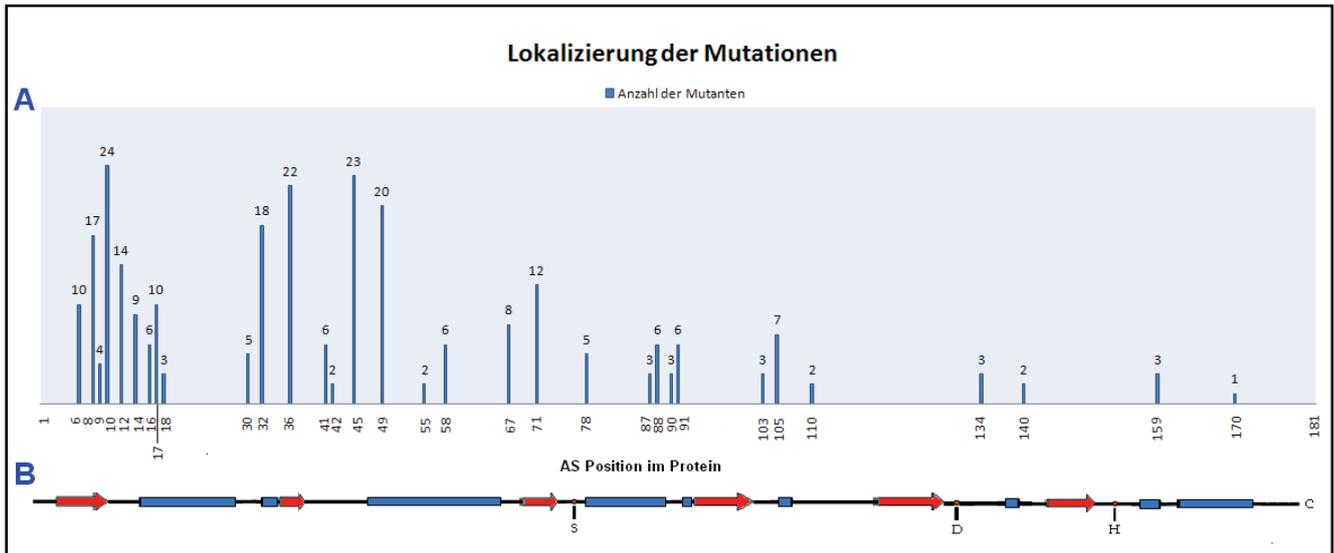


Abb. 3.25: Lokalisierung der Mutationen, die zum Verlust der Phospholipaseaktivität führen. A. Häufigkeit der gefundenen Mutationen in jeder Position, die verringerte Phospholipase-Aktivität hervorgerufen hat. B. schematische Darstellung der Sekundärstruktur der BSLA: rote Pfeile: β -Faltblatt, blaue Rechtecke α -Helix.

Die Mutationen sind über das gesamte Gen verteilt und nicht nur in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms lokalisiert, basierend auf der Häufigkeit konnten einige „hotspots“ identifiziert werden (vgl. Abb. 3.25). Die Positionen 8, 10, 12, 14, 18, 45, 71 und 105 wurden (Abb. 3.26) jeweils bei mehreren Klonen identifiziert. Mutationen an anderen Positionen verursachten lediglich eine Verringerung der Phospholipase-Aktivität, trotz der großen Zahl ihres Auftretens bei einigen Positionen wie 36 und 49. Die „hotspots“ sind hauptsächlich auf der Oberfläche des Proteins, dort auch in der Nähe des aktiven Zentrums zu finden, wie in Abb. 3.26 dargestellt ist. Drei Positionen sind im Innern des Proteins lokalisiert, Position 8, 10 und 71.

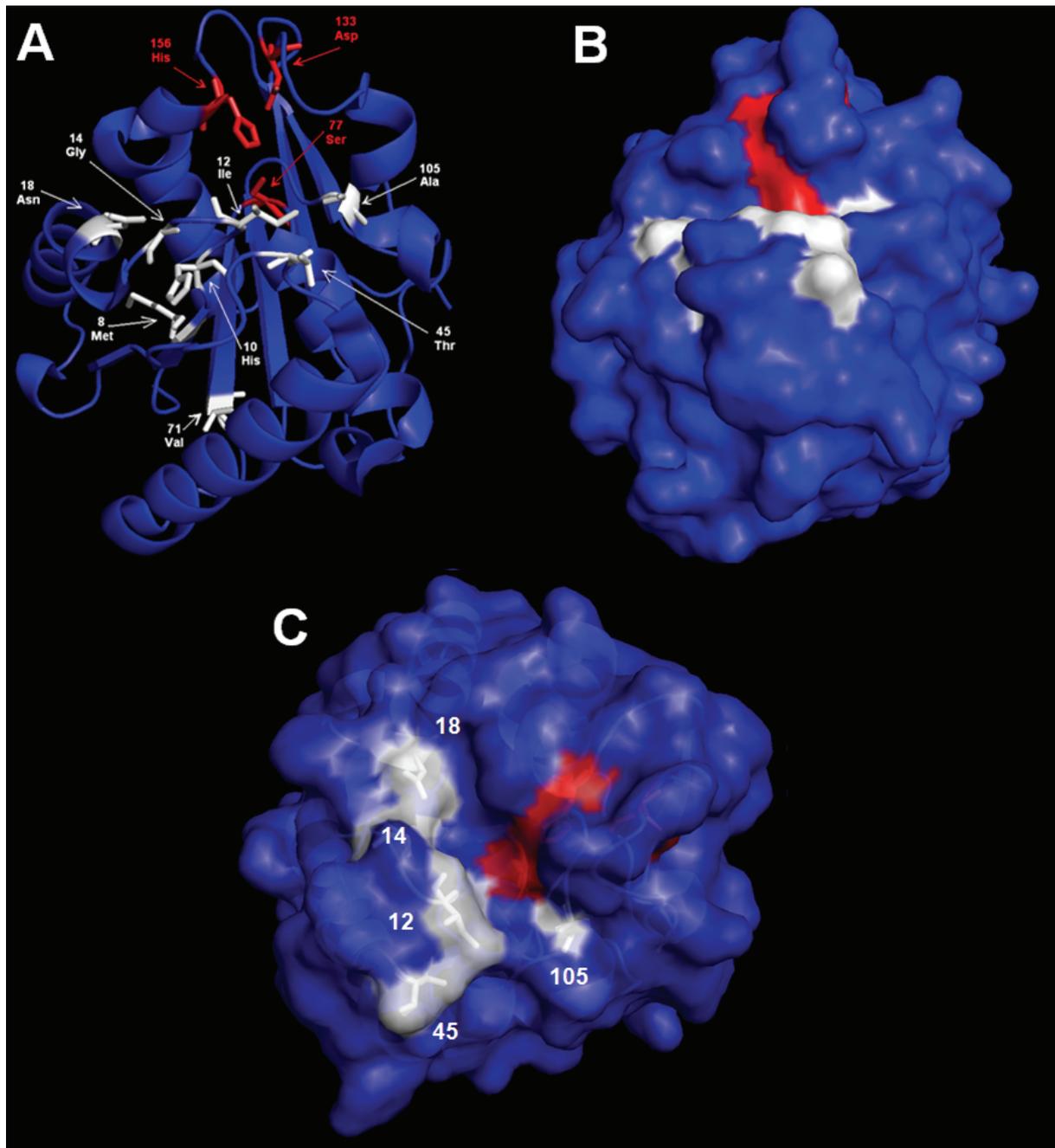


Abb. 3.26: Aminosäurepositionen deren Mutation häufig zu einem vollständigen Verlust der Phospholipase-Aktivität führt (hot-spots). A. Die Seitenketten der katalytischen Triade Ser77 (S), Asp133 (D) und His156 (H) sind in rot und die Mutantenpositionen in weiß dargestellt. B. Darstellung der BSLA Oberfläche. In weiß die Lokalisierung der Mutantenpositionen und rot die katalytischen Triade. C. Darstellung der BSLA Oberfläche (anderer Blickwinkel mit Transparenz).

In der Lipase aus *S. aureus* sind die für die Phospholipase-Aktivität wichtigen Aminosäurepositionen im C-terminalen Teil des Enzymes lokalisiert ^[237]. Im Gegensatz dazu findet man in BSLA solche Mutationen über das ganze Protein verteilt, jedoch konzentriert im N-terminalen Teil (Positionen 8, 10, 12, 14 und 18).

Ergebnisse und Diskussion

Es gibt viele Veröffentlichungen zur gerichteten Evolution, in denen beschrieben wurde, dass auch Aminosäuren, die an der Oberfläche des Enzyms liegen, verschiedene Enzymeigenschaften wie z.B. die Enantioselektivität, stark beeinflussen können [273-276]. Die in dieser Arbeit als „*hot-spot*“-Positionen identifizierten Reste (12, 14, 18, 45 und 105) liegen größtenteils auf der Oberfläche der BSLA. Die für Nebenaktivitäten verantwortlichen Struktur-/Funktionsbeziehungen sind jedoch noch weitestgehend unverstanden. Über die Funktionalität dieser Reste für eine Phospholipase-Nebenaktivität kann so nur spekuliert werden. Ihre Lokalisierung an der Oberfläche des Enzymes, bzw. am Ausgang des Substratkanals, legt jedoch eine funktionelle Rolle in der Bindung des polareren Phospholipid-Substrates nahe.

Mit der Identifizierung dieser „*hotspot*“ Positionen liegt eine erweiterte Datengrundlage zur Erklärung vor, weshalb die BSLB trotz der großen Ähnlichkeit keine Phospholipase-Nebenaktivität besitzt. Ein Vergleich der *hotspots* in BSLA mit den homologen Aminosäure-Positionen in BSLB ergab interessanterweise nur einen unterschiedlichen Aminosäurerest, d.h. zwischen BSLA und BSLB sind nahezu alle dieser in BSLA für die Phospholipase-Nebenaktivität identifizierten funktionellen „*hotspots*“ konserviert, lediglich in Position 8 findet man in BSLA ein Methionin, wohingegen in BSLB ein Leucin zu finden ist. Es wäre zu erwarten gewesen, dass sich BSLA und BSLB in mehr als nur einer dieser Aminosäurereste unterscheiden, weil BSLB gar keine Phospholipase-Aktivität besitzt. Für folgende Arbeiten wäre es interessant, diese Position in der BSLB zum Methionin zu mutieren, vielleicht kann so eine Phospholipaseaktivität in der BSLB induziert werden.

Ein anderer Grund für die Abwesenheit der Phospholipase-Nebenaktivität in BSLB kann in der geringeren Substratspezifität des Enzyms zu suchen sein, da BSLB, im Gegensatz zu BSLA lediglich kurz-kettige Triacylglyceride akzeptiert und damit eher zu den Esterasen zu rechnen ist. Diese geringere Flexibilität des aktiven Zentrums könnte die Bindung und Umsetzung der alternativen Substrate erschweren.

Sowohl das BSLA-Wildtyp Enzym als auch einige der BSLA-Mutanten, die Phospholipase-Aktivität verloren hatten, wurden spektrophotometrisch auf Phospholipase C-Aktivität mit *p*-Nitrophenylphosphorylcholin (*p*NPPC) als Substrat getestet. Weder für BSLA noch die hier untersuchten Mutanten zeigten jedoch Aktivität gegenüber diesem Substrat. Es sollte sich also bei BSLA um eine Phospholipase A1 oder A2 handeln (vgl. 1.2).

Nach Retransformation der Plasmide aller Klone und Reproduktion der Ergebnisse der Agarpattentests wurden von den identifizierten 265 Varianten ohne oder mit verringerter Phospholipase-Aktivität 20 zufällig ausgewählt und sequenziert, die Ergebnisse sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Tab. 3.1: Sequenzierung einiger BSLA-Varianten ohne Phospholipase-Aktivität.

Angegeben sind die von der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresubstitutionen und die Basenaustausche im entsprechen Triplet. Die ausgetauschten Basen sind rot hervorgehoben.

Positionen	Variante	Aminosäureaustausch	Basenaustausch
8	pETmut-P1C8	Met18Gly	ATG → GGG
	pETmut-P1D5	Met18Cys	ATG → TGC
10	pETmut-P1E6	His10Pro	CAC → CCC
	pETmut-P3A1	His10Pro	CAC → CCC
	pETmut-P3A11	His10Ala	CAC → GCC
	pETmut-P1D12	His10Ala	CAC → GCC
12	pETmut-P1F4	Iso12Thr	ATT → ACC
	pETmut-P1F8	Iso12Ala	ATT → GCG
	pETmut-P1F3	Iso12Ala	ATT → GCC
14	pETmut-P3C10	Gly14Glu	GGG → GAG
	pETmut-P3D3	Gly14Ser	GGG → TCG
18	pETmut-P2A12	Asp18Leu	ATT → TTG
	pETmut-P5B4	Asp18cys	AAT → TGC
45	pETmut-P2G9	Thr45Glu	ACA → CAG
	pETmut-P2H4	Thr45Glu	ACA → CAG
71	pETmut-P4A1	Val71Ser	GTG → TCG
	pETmut-P4A2	Val71Ser	GTG → TCG
	pETmut-P4A8	Val71Ser	GTG → TCG
105	pETmut-P5G1	Ala105Arg	GCG → CGC
	pETmut-P5G3	Ala105Iso	GCG → ATC

Im Folgenden werden potenzielle Effekte der verschiedenen Mutationen, die als Phospholipase-Aktivitäts hotspot identifiziert wurden, diskutiert. Das Methionin in **Position 8** der BSLA-Sequenz wurde in zwei der sequenzierten Mutanten zu Cystein oder Glycin ausgetauscht. Diese Aminosäuren sind kleiner als das Methionin des BSLA Wildtyp-Enzymes. Es könnte somit sein, dass eine kleine Aminosäure in dieser Position die Struktur der BSLA ändert und die Bindung der großen polaren Phosphatgruppe des Phospholipids nicht mehr stabilisieren kann und somit das Phospholipase-Substrat nicht mehr umgesetzt werden kann. Eine Analyse der

Ergebnisse und Diskussion

Interaktionen, die die Seitenkette des Methionins in Proteinen eingehen kann, ergab, dass das Methionin-Schwefelatom nahezu nie in Wasserstoffbrückebindungen anzutreffen ist, und daher ein schlechter Wasserstoffbrücken-Akzeptor ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Methionin-Schwefelatom oftmals in direkte nichtkovalente Wechselwirkung mit Sauerstoffatom-Nukleophilen (Sauerstoffatomen mit ungepaarten Elektronenpaaren) treten kann ^[277].

Eben dieser Effekt könnte also die Phosphatgruppe (welche Sauerstoff mit ungepaarten Elektronenpaaren besitzt) in BSLA stabilisieren. Eine Mutation zu Glycin (ohne Schwefelatom) oder Cystein (mit einer Thiolgruppe, S-H) sollte jedoch diese Art der nichtkovalenten Interaktion nicht ermöglichen. In BSLB findet man ein Leucin anstelle des Methionins und damit einen Rest gleicher Größe, der ebenfalls unpolar ist. Jedoch besitzt das Leucin eine aliphatische Seitenkette (ohne Schwefelatom) und sollte die oben beschriebene Interaktion zur Phospholipid-Phosphatgruppe nicht eingehen können.

In **Position 10** der BSLA-Aminosäuresequenz ist ein polares Histidin zu finden. Bei den Phospholipase-Verlust-Mutanten wurden zwei verschiedene Substitutionen identifiziert. So wurde das Histidin gegen die kleineren unpolaren Aminosäuren Prolin und Alanin ausgetauscht. Diese Position ist besonders interessant, da sie sich sehr nah am aktiven Zentrum des Enzyms befindet. Wie für andere Lipasen mit Phospholipase-Nebenaktivitäten gezeigt wurde ^[269], spielen oftmals polare Reste eine wichtige Rolle bei der Bindung des polaren Phospholipid-Substrates. So könnte das polare Histidin in BSLA eben diese Funktion erfüllen. Ein Austausch zu unpolaren Aminosäuren (Prolin und Alanin) könnte somit diese Bindung schwächen oder verhindern.

Auch in **Position 18** (Aspartat) und **Position 45** (Threonin) sind polare Aminosäuren zu finden, welche in den entsprechenden Mutanten zu unpolaren Aminosäuren ausgetauscht wurden (Tab. 3.1). Es liegt also auch hier ein Phospholipid-Bindungs- oder Stabilisierungseffekt nahe, welcher durch die polaren Reste in BSLA vermittelt, in den Mutanten hingegen verhindert oder attenuiert wird.

Des Weiteren konnte in einer anderen Arbeit ^[156] bereits gezeigt werden, dass eine Mutation in Position 18 eine Umkehrung der Enantioselektivität bei der Hydrolyse des Substrats *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten zur Folge hat. So scheint diese Position nicht nur für die Enantioselektivität der BSLA, sondern auch für die Phospholipase-Aktivität wichtig zu sein.

Auch die anderen Mutationen, haben vermutlich eine ähnliche Wirkung, kleine Veränderungen der Struktur, bzw. der Oberflächenbeschaffenheit in der Nähe des aktiven Zentrums behindern die Bindung des Phospholipase-Substrates oder führen zu veränderten Substratpräferenzen (^[156, 178] vgl. Abb. 3.26 C).

3.2.6. Ist gerichtete Evolution zur Generierung von promiskuitiven Aktivitäten geeignet?

Das Ziel der oben beschriebenen Versuche war es, neue Aktivitäten in die BSLA einzuführen. Obwohl dies nicht erfolgreich war, wurden jedoch wertvolle Erkenntnisse für weitere Versuche gewonnen. So scheint es, wie oben (s. 3.2.5) bereits angesprochen, nicht unbedingt sinnvoll zu sein, ein kleines Protein wie die BSLA als Startpunkt auszuwählen, da die Struktur nicht genug Raum und Flexibilität für die notwendigen Änderungen bietet. Auch sieht es so aus, dass die mit den beschriebenen Methoden eingebrachte Menge an Mutationen (in der Sättigungsbank nur jeweils eine ausgetauschte Aminosäure im Protein) nicht für eine komplette Änderung der Aktivität (welche zudem noch mit einem anderen Reaktionsmechanismus einhergeht), ausreicht. Das Problem ist, dass beim Einbringen von deutlich mehr Mutationen, wie in 3.2.4 beschrieben, die Zahl der komplett inaktiven Varianten deutlich ansteigt. Daraus resultiert, dass eine weit größere Anzahl an Varianten gescreent werden müsste, um diesen erweiterten Sequenzraum abzudecken. Dies erfordert noch bessere Selektions- und Screeningsysteme. Darüber hinaus wäre ein Ansatz, mit der Einschränkung der zu untersuchenden Aktivitäten, die Menge an einzelnen Versuchen zu reduzieren.

Ähnliche Erfahrungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht, die sich mit gerichteter Evolution befassen. Der Trend geht immer weiter dahin, dass eine Verbesserung oder Veränderung von Enzymen durch eine Kombination von rationalen und randomisierten Methoden, erfolgreicher durchführbar ist.

Im nächsten Kapitel geht es um die Generierung anderer Aktivitäten mittels eines rationalen Ansatzes und anschließender epPCR zur Anpassung der Struktur an die potenzielle neue Funktion.

Ergebnisse und Diskussion

3.3 Entwicklungen neuer Aktivitäten mittels rationalem Design

Neben den Versuchen zur zufälligen Einführung einer neuen promiskutiven Aktivität in BSLA wurde ein weiteres Zielprotein mit alpha/beta-Hydrolasefaltung sowie eine komplementäre Methodik zur Erzeugung katalytischer Promiskuität angewendet.

Die Epoxidhydrolase aus *A. niger* (AnEH) wurde durch eine Kombination aus rationalem Design und gerichteter Evolution verändert und auf katalytische Promiskuität hin untersucht. In Vergleich zu BSLA ist AnEH ein relativ komplexes Protein (s. 1.2.2.2), mit 398 Aminosäuren ist es mehr als doppelt so groß wie die BSLA, es weist eine zusätzliche N-terminale Struktur sowie einen definierten Deckel auf (s. Abb. 1.7). Mit der Auswahl dieses Protein sollte das Problem, dass die Struktur sehr kompakt ist und/ oder nicht genug Raum und Toleranz für Einführung von Mutationen bietet, umgangen werden. Die angewandte Methode sollte direkter zum Ziel führen, durch rationales Design soll eine andere Aktivität direkt generiert werden, die auf das Potenzial des entsprechenden aktiven Zentrums abgestimmt ist. Mittels dieser Methode wurde z.B. eine promiskuitive Glutathion-Transferase in eine selektive Thiolester-Hydrolase umgewandelt, wozu nur eine Mutation erforderlich war [278]. Zahlreiche biochemische Analysen haben gezeigt, dass Proteine die Fähigkeit besitzen, neue oder geänderte Funktionen mit einer kleinen Anzahl von Aminosäuresubstitutionen zu erlangen (Plastizität) [279-283].

3.3.1. Die AnEH besitzt keine nachweisbaren promiskuitiven Aktivitäten.

Vor Durchführung der zielgerichteten Mutagenese zur Einführung katalytischer Promiskuität wurde das Wildtypenzym (AnEH) auf etwaige Nebenaktivitäten hin untersucht (Abb. 3.27). Im Rahmen der durchgeführten Tests zeigte sich keine Nebenaktivität. Dies stimmt mit der Literatur überein. Bisher ist keine andere Aktivität für dieses Enzym beschrieben worden, obwohl die AnEH eine hohe Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit mit Haloalkan-Dehalogenasen hat (s. 1.2.3.2).

Für eine andere Epoxid-Hydrolase (lösliche humane EH) wurde eine Phosphatase-Nebenaktivität beschrieben [284] und intensiv charakterisiert [285]. Diese Nebenaktivität basiert auf verschiedenen Bindestellen und nicht auf katalytischer Promiskuität, bei der das gleiche aktive Zentrum benutzt wird (s. 1.3.2). Auch dieses Enzym zeigt Sequenz-Ähnlichkeiten zu Dehalogenasen [286], es konnte aber keine

Dehalogenierung beobachtet werden, nur die oben erwähnte Phosphatase-Aktivität. Hierbei ist zu erwähnen, dass Phosphatasen und einige Dehalogenasen vergleichbare strukturelle Domänen (Sequenzmotive, welche eine konservierte Struktur und oftmals identische oder ähnliche Funktionen besitzen) aufweisen.

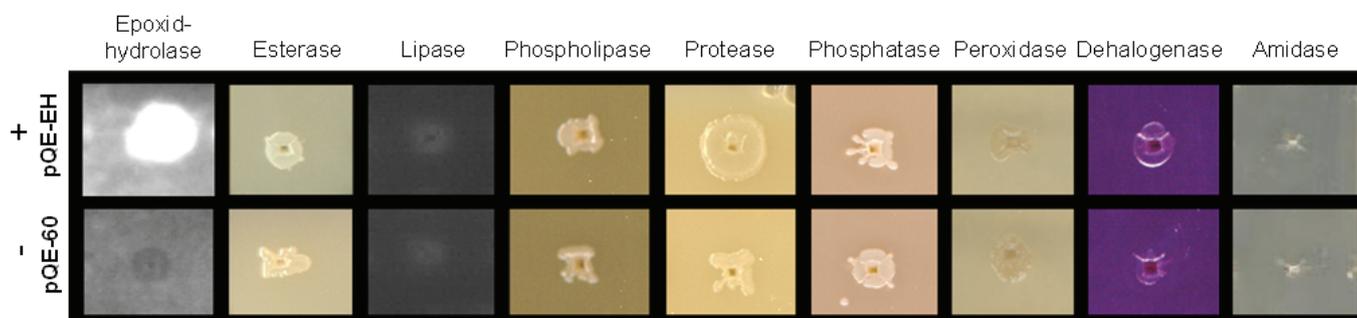


Abb. 3.27: Screening der AnEH auf verschiedene Aktivitäten. AnEH zeigt keine Nebenaktivität, sondern nur deutliche Epoxidhydrolaseaktivität.

3.3.2 Vergleich und Analyse der AnEH 3D-Struktur

Der Schlüssel zum Verständnis der biologischen und funktionellen Eigenschaften von Proteinen liegt letztendlich in dreidimensionalen Struktur (Konformation) begründet ^[287]. In dieser Arbeit wurde die 3D-Struktur der AnEH (PDB Code: 1QO7) mit homologen Strukturen aus der „Molecular Modeling DataBase“ (MMDB) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/MMDB/mmdb.shtml>) ^[288] verglichen. Diese Datenbank enthält Teile der Proteindatenbank (PDB) (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>). Zum Strukturvergleich wurde das „*Vector Alignment Search Tool*“ (VAST) ^[58] benutzt, welches über die NCBI Homepage zugänglich ist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vast.shtml>). Der VAST-Algorithmus identifiziert dabei strukturhomologe Proteine aus der MMDB und liefert eine Übersicht der homologen Bereiche sowie die entsprechenden PDB-Datenbanknummern (Abb. 3.28). In Tabelle 1.2 sind die auf diese Weise identifizierten strukturhomologen Enzyme sowie weitere relevante Informationen angegeben. Mittels dieser strukturbasierten Vergleichsmethode kann das zu analysierende Spektrum an Enzymaktivitäten eingeschränkt werden. Da die Struktur der aktiven Zentren für die jeweilige Aktivität charakteristisch ist, gibt es mehr oder weniger verwandte Strukturen. So gleichen sich z.B. die strukturelle Anordnung der aktiven Zentren von Dehalogenasen und Phosphatasen, eine Dehalogenasedomäne

Ergebnisse und Diskussion

kann sowohl eine Dehalogenierung als auch eine Dephosphorylierung katalysieren [289].



Abb. 3.28: Strukturvergleich mittels VAST zur Identifizierung AnEH strukturhomologer Proteine. Insgesamt wurden auf diese Weise 350 verschiedene AnEH homologe Strukturen identifiziert. Der obere Bereich der Abbildung zeigt die Domänen-Analyse für die „Input“-Struktur. Blau (MhpC): konservierte α/β -Hydrolasefaltung. Rot (EHN): EH-typische Domäne am N-Terminus des Proteins. Im unteren Teil der Abbildung ist eine Liste der mittels VAST erhaltenen strukturhomologen Proteine dargestellt. Die verschiedenen PDB-Nummern sind in blau angegeben. In rot sind die homologen Strukturbereiche zwischen dem Zielprotein und dem jeweiligen Datenbank-Eintrag gezeigt. Die Zahlen am rechten Rand der Abbildung geben an, wie viele Aminosäuren im Datenbank-Eintrag mit denen im Zielprotein übereinstimmen.

Mittlerweile sind 3D-Strukturen für viele Proteine gelöst (die PDB-Datenbank besitzt zur Zeit (Dezember 2007) über 47000 Einträge), doch im Vergleich zur der Menge sequenzierten Genen und annotierten Proteinen in Sequenzdatenbanken ist diese Zahl verschwindend gering. Allein die UniProt/TrEMBL Proteindatenbank besitzt zurzeit (Dezember 2007) über 5 Millionen Einträge.

Dies muss bei der Interpretation solcher Daten beachtet werden, es ist nicht davon auszugehen, dass man das gesamte Spektrum verwandter Sequenzen abdecken kann, sondern nur die, deren Struktur aufgeklärt wurde.

Bei der Betrachtung der gefundenen Treffer fällt direkt auf, dass die strukturelle Konservierung der einzelnen Enzyme im Vordergrund steht. Neben Epoxidhydrolasen finden sich andere Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung wie Dehalogenasen, Lipasen oder Hydroxynitril-Lyasen (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Zu AnEH Strukturhomologe Enzyme.

PDB Code	Aktivität	Organismus	Aktive Zentrum [‡]	Aminosäuren
1QO7	Epoxide Hydrolase	<i>A. niger</i>	Asp (192) Asp (348) His (374)	396
1B6G	Haloalkane Dehalogenase	<i>X. autotrophicus</i>	Asp (124) Asp (260) His (289)	310
1CQW	Haloalkane Dehalogenase	<i>A. Rhodococcus</i>	Glu (141) Asp (117) His (283)	295
1K8Q	Lipase	<i>C. familiaris</i>	Ser (153) Asp (324) His (353)	377
1AZW	Proline iminopeptidase	<i>X. campestris</i>	Ser (110) Asp (266) His (294)	313
1JJI	Carboxylesterase	<i>A. Fulgidus</i>	Ser (160) Asp (255) His (285)	311
1BRT	Bromoperoxidase	<i>S. aureofaciens</i>	Ser (98) Asp (228) His (257)	277
1ORV	Dipeptidyl peptidase IV	<i>S. scrofa</i>	Ser (630) Asp (708) His (740)	728
1A88	Chloroperoxidase	<i>S. lividans</i>	Ser (96) Asp (226) His (255)	275
1EB9	Hydroxynitrile lyase	<i>M. esculenta</i>	Ser (80) Asp (208) -His (236)	262
1YB6	Hydroxynitrile lyase	<i>H. Brasiliensis</i>	Ser (80) Asp (207) His (235)	256

[‡] Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind im 3-Buchstaben-Code abgekürzt: Aspartat (Asp); Serin (Ser); Histidin (His); Glutamat (Glu).

Ergebnisse und Diskussion

Nach diesem ersten relativ groben Vergleich wurden die jeweiligen Strukturdaten ausgewählter Enzyme heruntergeladen und mittels PyMOL (www.pymol.org) mit der Struktur der AnEH verglichen und detailliert analysiert. Dazu wurden die Proteine zueinander an ihren aktiven Zentren ausgerichtet. Darüber hinaus wurden Oberflächeneigenschaften sowie die Region des aktiven Zentrums und der Substratkanal verglichen. Außerdem wurde die AnEH mit weiteren nicht in Tabelle 3.2 dargestellten Enzymen, wie der BSLA (PDB Code 1I6W) und der *Candida antarctica* Lipase B (CalB) (PDB Code 1TCA) verglichen.

Zwei Beispiele einer solchen Untersuchung sind in Abb. 2.29 (Haloalkan Dehalogenase aus *X. autotrophicus* (PDB Code 2HAD) und Abb. 3.30 (BSLA) (PDB Code 1L6W) dargestellt.

Allgemein erkennt man, dass sich die aktiven Zentren der verschiedenen Proteine gut überlagern lassen, d.h. die dreidimensionale Anordnung der katalytischen Triade ist in den hier verglichenen, α/β -Hydrolasen sehr ähnlich. Selbst wenn die katalytische Triade aus verschiedenen Aminosäuren besteht (z.B. Aspartat statt Serin als Nucleophil), ist deren Orientierung im Protein sehr ähnlich. Die größten Unterschiede finden sich in der Ausbildung zusätzlicher katalytisch wichtiger Strukturen, wie z.B. von Deckelementen (vgl. 1.2.2).

Ausgehend von diesen Überlagerungen wurden nun Punktmutanten geplant, mit denen das aktive Zentrum sowie der Zugang des Substratkanals in der AnEH verändert werden sollte. Die Mutationen, wurden wie im Folgenden beschrieben so geplant, dass die AnEH prinzipiell eine andere α/β -Hydrolase Aktivität erhalten könnte.

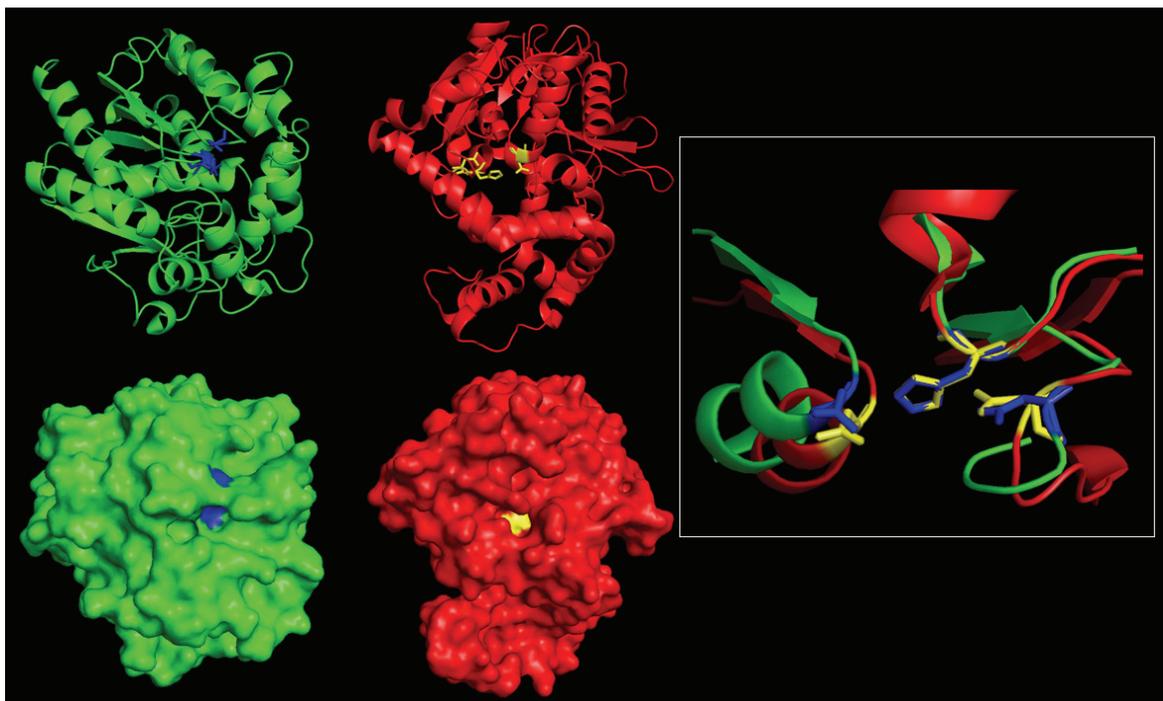


Abb. 3.29: Strukturvergleich der Haloalkane Dehalogenase aus *X. autotrophicus* mit AnEH. Grün: Haloalkan-Dehalogenase aus *X. autotrophicus* (XaDh), rot: AnEH. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL erzeugt. Im oberen Teil der Abbildung ist die Struktur der AnEH (rot) mit der XaDh (grün) verglichen. Außerdem ist der zugehörige Oberflächenbereich in der Nähe des aktiven Zentrums des jeweiligen Enzyms hervorgehoben. Die größere Abb. zeigt eine Überlagerung der aktiven Zentren beider Enzyme Die katalytische Triade der Dehalogenase ist in blau (Asp124/Asp260/His289) die der Epoxid-Hydrolase ist in gelb (Asp192/Asp348/His374) dargestellt.

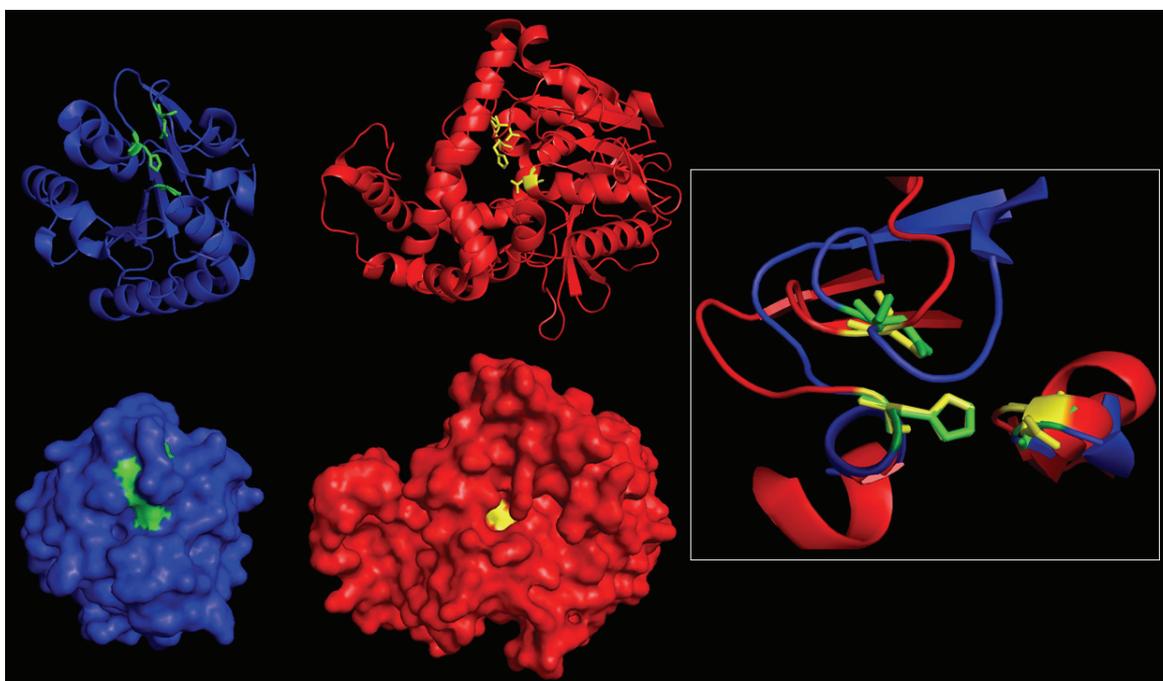


Abb. 3.30: Strukturvergleich BSLA mit AnEH. Im oberen Teil der Abbildung ist die Struktur der AnEH (rot) mit der BSLA (blau) verglichen. Außerdem ist der zugehörige Oberflächenbereich in der Nähe des aktiven Zentrums des jeweiligen Enzyms hervorgehoben. Die größere Abb. zeigt eine Überlagerung der aktiven Zentren beider Enzyme Die katalytischen Triade der Epoxid-Hydrolase ist in gelb, die der BSLA in grün, dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Mutationen an der Proteinoberfläche: Der Strukturvergleich von AnEH mit anderen Proteinen der α/β -Hydrolase Familie ergab, dass in AnEH eine Aminosäure der Deckelstruktur (Arginin in Position 219) direkt über der Substratbindetasche liegt und so nur ein enger Zugang zum Eintritt der Substrate in das aktive Zentrum besteht. In allen anderen Strukturen, die hier untersucht wurden, lag das aktive Zentrum entweder frei oder aber die Struktur war in dieser Position flexibler als in der AnEH (Abb. 3.29 und 3.30). Um neue Aktivitäten bei Erhaltung der generellen Faltung zu generieren, wurde versucht, mittels ortsgerichteter Mutagenese im AnEH-Gen, den Zugang zum aktiven Zentrum im Enzym zu vergrößern.

Im Einzelnen sollte der Argininrest in Position 219 sowie das Phenylalanin in Position 196 gegen Alanin ausgetauscht werden (R219A, F196A). (Abb.3.31). Für das Arginin 219 ist bekannt, dass der Austausch gegen eine kleine Aminosäure die EH-Aktivität verbessert, es wurde aber bisher keine Nebenaktivität beschrieben^[84]. Mit anderen Mutationen sollte die Oberfläche des aktiven Zentrums vergrößert werden. Das könnte zur Akzeptanz anderer, z.B. halogenhaltige Substrate und/oder Triacylglycerole mit lang- und mittelkettigen Fettsäuren führen.

Mutationen im aktiven Zentrum: Desweiteren wurde basierend auf einem Vergleich der katalytischen Triaden verschiedener α/β -Hydrolasen (vgl. Tab. 3.2.) eine Anpassung des aktiven Zentrums der AnEH (katalytische Triade: Asp-Asp-His) an die katalytische Triade anderer α/β -Hydrolasen (Ser-Asp-His) vorgenommen. Haloalkan- Dehalogenasen (PDB Code 1B6G) sind die einzigen α/β -Hydrolasen, die dieselbe katalytische Triade (Asp-Asp-His) wie Epoxidhydrolasen besitzen (Tab. 3.2). Hierzu wurde das Aspartat in Position 192 im aktiven Zentrum der AnEH gegen Serin ausgetauscht. In dieser Weise sollte das Enzym stärkere Ähnlichkeiten mit Lipasen, Esterasen oder Peroxidasen erhalten. Darüber hinaus wurden Doppel- und Dreifach- Mutanten zur Kombination der einzelnen Effekte erzeugt.

Mittels des Programmes „PredictProtein“ (<http://swift.cmbi.kun.nl/WIWWWI/>)^[8] wurden Modelle der AnEH-Varianten erstellt und mit der Struktur der Wildtyp-AnEH verglichen. In Abb. 6 sind die sieben erzeugten Struktur-Modelle (alle Kombinationsmöglichkeiten der drei Mutationen), der Struktur der Wildtyp-AnEH gegenübergestellt.

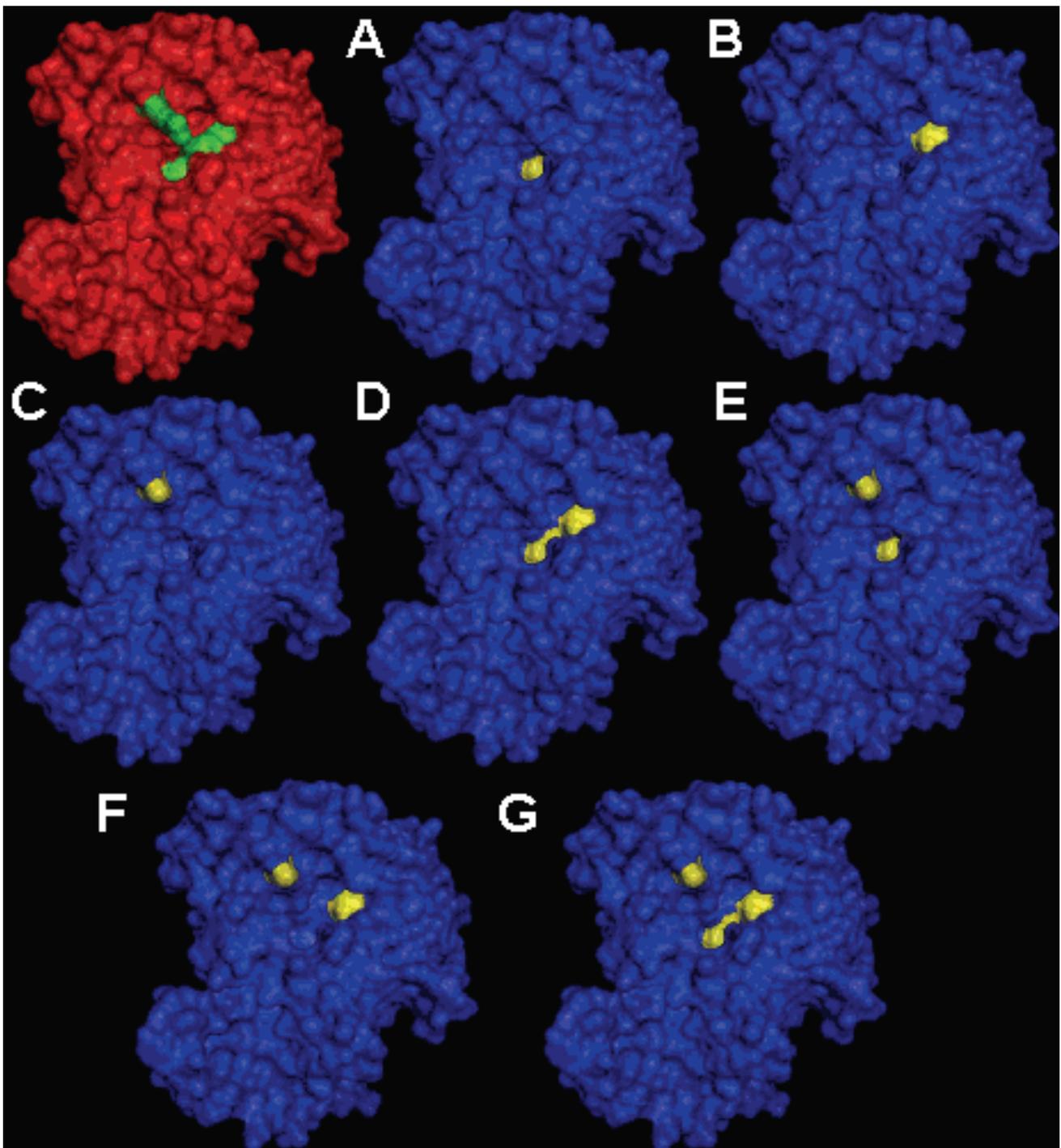


Abb. 3.31: Strukturvergleich der AnEH-Varianten mit der Wildtyp-AnEH. Mit den Programmen PyMOL und Predictprotein wurden die verschiedenen Kombinationen der drei Mutationen modelliert und visualisiert. In rot ist die Struktur der Wildtyp AnEH dargestellt, wobei die Positionen der drei mutierten Aminosäuren in grün hervorgehoben sind. In blau sind die Modell-Strukturen der AnEH-Varianten-Proteine dargestellt. Die ausgetauschten Aminosäuren sind hier gelb markiert. **A.** pQE_Mut1; **B.** pQE_Mut2; **C.** pQE_Mut3; **D.** pQE_Mut4; **E.** pQE_Mut5; **F.** pQE_Mut6; **G.** pQE_Mut7 (s. Tab. 3.3)

Ergebnisse und Diskussion

Im Vergleich zum Wildtypenzym zeigen die modellierten Strukturen größere Ähnlichkeiten zu anderen α/β -Hydrolasen. Diese Berechnungen und Vorhersagen müssen nun experimentell überprüft werden. Es gibt allerdings schon Beispiele dafür, dass solche Berechnungen erfolgreich waren und sich in den nachfolgenden Experimenten die erwarteten Resultate einstellten ^[171, 290].

3.3.3 Erzeugung der Punktmutation in der AnEH

Für die ortsspezifische Mutagenese wurde das QuikChange™ (Stratagene) Verfahren verwendet (s. 2.10.3). Als PCR-Template diente hierbei das Plasmid mit dem zu mutierenden Gen (pQE-EH). Zur Erzeugung der Mutationen wurden vier verschiedene Primerpaare benutzt (Abb. 3.32)

Position	→	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	
Wildtyp EhAn	→	GGT	TAT	ATT	ATT	CAG	GGA	GGT	GAT	ATT	GGT	AGC	TTT	GTT	GGA	CGA	CTG	TTG	GGC	GTG	GGT	
		G	Y	I	I	Q	G	G	D	I	G	S	F	V	G	R	L	L	G	V	G	
Primer 1	→	GT	TAT	ATT	ATT	CAG	GGA	GGT	AGC	ATT	GGT	AGC	TTT	GTT	GG							
									S													
Primer 2	→	GGA	GGT	GAT	ATT	GGT	AGC	GCT	GTT	GGA	CGA	CTG	TTG	G								
								A														
Primer 3	→	GA	GGT	AGC	ATT	GGT	AGC	GCT	GTT	GGA	CGA	CTG	TTG	G								
				S				A														
Position	→	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	220	221	222	223	224
Wildtyp EhAn	→	TTC	GAC	GCC	TGC	AAA	GCG	GTT	CAT	TTG	AAC	CTG	TGC	GCA	ATG	AGG	GCT	CCC	CCT	GAG	GGC	CCG
		F	D	A	C	K	A	V	H	L	N	L	C	A	M	R	A	P	P	E	G	P
Primer 4	→	C	CTG	TGC	GCA	ATG	GCG	GCT	CCC	CCT	GAG	G										
							A															

Abb. 3.32: Mutagenese-Strategie zur Erzeugung der AnEH Punktmutanten. Ausschnitt aus den Aminosäure (rot)- und Nucleotidsequenzen (schwarz) der Wildtyp-AnEH (oben) und die Primer-Sequenzen (unten) mit den modifizierten Nucleotiden (rote Rechteck) und Aminosäuren (Violet). Die Zahlen (obere Zeile) entsprechen der Position der Aminosäuresequenz.

Zu erst wurden die Primerpaare 1, 2 und 3 benutzt, um die jeweiligen Einzelmutanten zu erzeugen. Nach der Klonierung und Sequenzierung dieser Varianten, wurden mittels einer weiteren Runde Quikchange-PCR alle möglichen kombinatorischen Varianten dieser drei Aminosäure Positionen aus den Einzelmutanten generiert. Dadurch erhielt man 7 verschiedene Mutanten mit 1-3 Mutationen im Protein (kombinatorische Einzel-, Doppel-, und Tripelmutanten) (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: AnEH Mutanten

Variante	Mutationen
pQE_Mut1	D192S
pQE_Mut2	F196A
pQE_Mut3	R219A
pQE_Mut4	D192S/F196A
pQE_Mut5	D192S/R219A
pQE_Mut6	F196A/R219A
pQE_Mut7	D192S/F196A/R219A

Die in dieser Weise erzeugten Varianten wurden sequenziert, wobei sich zeigte, dass in allen Fällen die gewünschten Mutationen eingeführt werden konnten. Die jeweiligen Expressionsvektoren wurden in *E. coli* DH5 α transformiert, und die Genexpression mittels SDS-PAGE überprüft. Im SDS-Gel konnten jedoch weder für das Wildtyp-Protein noch für die 7 Varianten deutliche Überexpressionsbanden identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Dies kann darauf beruhen, dass der verwendete Vektor in Kombination mit *E. coli* DH5 α als Expressionswirt, nur eine konstitutive (und daher relativ schwache) Expression der plasmidkodierten Gene ermöglicht. Dies erklärt, warum selbst für den Wildtyp-AnEH exprimierenden Stamm, für den mittels Agarplatten und einem spektrophotometrischen Assay (s.3.3.4) klar EH Aktivität nachweisbar war, keine Überexpressionsbande im SDS-Gel sichtbar war.

3.3.4 Mittels der Kombination dreier Punktmutationen allein kann keine katalytische Promiskuität erzeugt werden.

Nach Überprüfung aller Varianten, wurde getestet ob eine oder mehrere der AnEH-Varianten eine Nebenaktivität besaßen. Alle Varianten wurden hierbei mittels verschiedenen Agarplattentests auf promiskutive Aktivitäten hin überprüft. Außerdem wurden drei verschiedene kolorimetrische Assays mit verschiedenen Substraten durchgeführt, um eine von der jeweiligen Hauptaktivität (welche auf den Agarplattentests überprüft wurde) abweichende Substratpräferenz der Varianten festzustellen (Abb. 3.33).

Ergebnisse und Diskussion

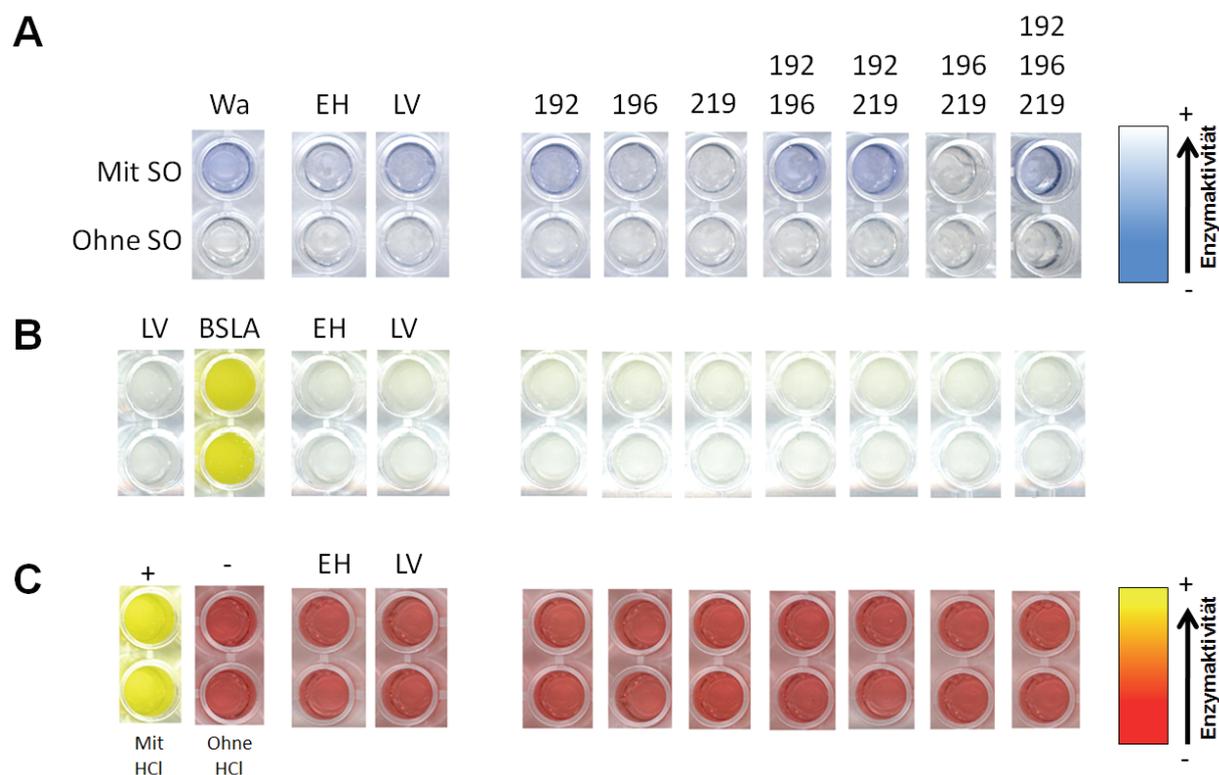


Abb. 3.33: Spektrophotometrischer Test der EH Einzel- Doppel- und Tripelmutaten auf verschiedene Aktivitäten. A. EH-Assay (NBP) mit Styroloxid (SO) als Substrat. B. Lipase-Assay (pNPP). C. Dehalogenase- Assay (Phenol rot). Wa – Medium; EH – Epoxid-Hydrolase aus *A. niger*; LV – Leervektor (negative Kontrolle); BSLA – *B. subtilis* Lipase A.

Im kolorimetrischen Assay auf Epoxidhydrolase-Aktivität (Abb. 3.33, A) wurde festgestellt, dass die Mutanten pQE_Mut1, pQE_Mut4, pQE_Mut5 und pQE_Mut7 ihre EH-Aktivität verloren hatten. Interessanterweise konnte für die anderen Mutanten eine Erhöhung der Aktivität, nachgewiesen werden. Relativ zur Wildtyp-AnEH (100%) ergaben sich für die 3 Mutanten die folgenden Werte: pMut1 (F196A) 110%, für pMut3 (R219A) 130% und für pMut6 (F196A, R219A) 130%. Die hier angegebenen Werte wurden aus den jeweiligen Endpunktabsorptionswerten der Mutanten im Verhältnis zur Wildtyp-AnEH Endpunktabsorption abgeleitet. Wiederholte Messungen ergaben nahezu identische Werte.

Es ist hierbei nicht verwunderlich, dass die Mutation D192S (sowie alle Doppel- und Tripelmutanten, die diesen Austausch enthielten) zum Verlust der EH-Aktivität des Enzyms führten, da dieser Aspartat-Rest zur katalytischen Triade der AnEH gehört. Interessanter ist hingegen, dass die Mutationen, welche zusätzlich in der Nähe des aktiven Zentrums eingefügt wurden, zu einer (wenn auch geringen) Erhöhung der Aktivität führten.

In einer anderen Arbeit wurde das Arginin in Position 219 bereits als relevant für die Enantioselektivität des Enzyms gegenüber Glycidyl-Phenylether beschrieben ^[85].

Das Arginin wurde jedoch in dieser Arbeit gegen Glycin und nicht wie hier beschrieben gegen Alanin ausgetauscht. Es wurde spekuliert, dass die Faltung der Deckelregion des Enzyms sowie in der Region des aktiven Zentrums begünstigt wird. Prinzipiell könnten damit sowohl die bereits in der Literatur beschriebene Mutation R219G als auch die in dieser Arbeit eingeführte Mutation R219A strukturell dieselben Auswirkungen haben. In beiden Fällen wurde die große geladene Seitenkette des Arginins gegen eine kleine unpolare Seitenkette (Alanin) bzw. gegen einen Rest ohne Seitenkette (Glycin) ausgetauscht.

Sowohl im Lipase-Aktivitätstest (Abb.3.33 B) als auch im Dehalogenasetest (Abb. 3.33 C) konnte für keine der erzeugten Mutanten Aktivität nachgewiesen werden. Die Mutanten wurden zusätzlich auf Dehalogenaseaktivität gegenüber drei weiteren Substraten untersucht, jedoch ohne nachweisbare Aktivität (nicht gezeigt).

Das alleinige Einbringen der geplanten Mutationen führte also noch nicht dazu, dass die Varianten die vorhergesagten Aktivitäten bekommen. Dies war allerdings auch nicht unbedingt zu erwarten, da solche strukturellen Änderungen auch nicht vorhersehbare Einflüsse auf andere Bereiche des Enzyms haben können. Daher wird im nächsten Schritt eine Fein Anpassung der Enzymstruktur durchgeführt.

3.3.5 Fehlerhafte PCR (epPCR) zur Erzeugung zusätzlicher genetischer Diversität

Da wie im vorherigen Kapitel beschrieben, mittels Einzel- Doppel und Tripelmutanten, d.h. durch Anpassung der katalytischen Triade und des aktiven Zentrums des Enzymes, keine neuen promiskuitiven Aktivität in der AnEH erzeugt werden konnte, wurde versucht mittels ungerichteter Mutagenese an den diesen im letzten Kapitel beschriebenen Mutanten, ein Fein Anpassung der Struktur vorzunehmen und zusätzliche genetische Diversität zu erzeugen. So wurden in einem ersten Ansatz zunächst die Einzelmutanten D192S und R219A sowie die Doppelmutante D192S/R219A ausgewählt und einer Runde epPCR unterzogen. Die in dieser Weise generierten Banken wurden in *E. coli* DH5 α transformiert. Es wurden hierbei drei verschiedene Mutantenbanken erzeugt. Zur Bestimmung der epPCR Fehlerrate wurden einige Klone aus den beiden Banken ausgewählt und sequenziert. Dabei ergab sich eine mittlere Fehlerrate von 7 bis 10 Basensubstitutionen pro 1000 Basenpaare. Für jede der beiden Banken wurden über

Ergebnisse und Diskussion

1000 Klone mittels Agarplatten-Assays auf neun verschiedene Aktivitäten getestet. Allerdings konnte auch mittels dieses Ansatzes keine katalytische Promiskuität in der AnEH erzeugt werden. Ein generelles Problem gerichteter Evolutionsstrategien zur Optimierung und Anpassung enzymatischer Aktivitäten besteht darin, dass oftmals mit steigender Fehlerrate im Gen die Anzahl inaktiver Enzym-Varianten drastisch zunimmt. Außerdem nimmt mit steigender Anzahl der ausgetauschten Basen bzw. Aminosäuren der Screeningaufwand, d.h. die Anzahl der zu untersuchenden Varianten exponentiell zu. Es ist also wichtig einen optimalen Mittelweg zwischen maximaler genetischer Diversität und Screeningaufwand zu finden. Ein Ansatz zur Verringerung des Screeningaufwandes ist es, die Fehlerrate zu verringern, was im Gegenzug die erreichbare funktionelle Diversität schnell begrenzt.

So war wahrscheinlich die Fehlerrate in diesem ersten Test-Screening zu hoch und gleichzeitig die Anzahl der gescreenten Varianten zu gering, um statistisch gesehen Erfolg erwarten zu können.

Deshalb wurde ausgehend von denselben Varianten mit Einzel- und Doppelmutationen insgesamt 21 Mutanten-Bibliotheken (7 kombinatorische Varianten mit 3 verschiedenen epPCR-Protokollen) mittels epPCR erzeugt. Dabei wurden die Bedingungen so gewählt, dass verschiedene Fehlerraten erzielt werden konnten (siehe Tab. 2.7). Diese EH-Varianten wurden mittels Agarplatten-Assays auf die Aktivitäten Dehalogenase und Amidase, so wie Esterase und Peroxidase getestet. Auch bei diesem Ansatz wurde keine neue Aktivität gefunden, obwohl ca. 50.000 klonen getestet wurden.

3.3.6. Ist der rationale Ansatz sinnvoller als randomisierte Methoden zur Erzeugung von neuen Aktivitäten?

Das hier vorgestellte Verfahren, also eine Kombination aus rationalem Design mit nachfolgender gerichteter Evolution zur Feinanpassung der Struktur stellt sicherlich eine vielversprechende Strategie zu Erzeugung promiskuitiver Aktivitäten dar. Insbesondere, wenn diese Strategie mit einem hocheffektiven Selektionssystem kombiniert werden kann, um sicherzustellen, dass genügend Varianten untersucht werden können. Der rationale Ansatz allein reicht jedoch oftmals nicht aus, da trotz bekannter dreidimensionaler Strukturen nicht alle relevanten Struktur-Funktionsbeziehungen vorhergesagt werden können.

4. Ausblick

Wie ausführlich in der Aufgabenstellung beschrieben war das Ziel dieser Arbeit, einen Teil zum Verständnis vom Zusammenhang zwischen Sequenz, Struktur und Mechanismus von Enzymen beizutragen. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen können nun weitere Experimente auf diesem Weg geplant werden. Generell hat sich herausgestellt, dass die Menge an eingeführten Mutationen bzw. an untersuchten Varianten erhöht werden muss, um gänzlich neue Aktivitäten in ein Enzym einzuführen, selbst wenn die grundlegende dreidimensionale Struktur (wie im Fall der α/β -Hydrolasen) die gleiche ist. Weiter wurde jedoch auch festgestellt, dass mit zunehmender Menge an eingebrachten Mutationen die Anzahl der komplett inaktiven Varianten stark ansteigt. Dies hat wiederum zur Folge, dass es nötig ist, mehr und mehr Varianten zu screenen, um die mit den „richtigen“ Kombinationen zu finden. Daraus ergibt sich weiterhin die Notwendigkeit, leistungsfähigere Selektionssysteme zu entwickeln, denn allein mit solchen lassen sich diese Mengen an Varianten handhaben. In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung von Selektionssystemen, die unterschiedlich substituierten Substrate verwenden, ein interessantes Ziel. Dies ist allerdings nur dann möglich, wenn das entsprechende Screeningsystem nicht auf der Toxizität der Substrate beruht. Zudem kann es sinnvoll sein, sich zunächst auf relativ nahe verwandte Enzymklassen zu konzentrieren, wie dies schon im dritten Teil der Arbeit verfolgt wurde, da hierbei theoretisch weniger Mutationen notwendig sind.

Die Kombination zufälliger mit zielgerichteten Methoden ist sicherlich eine vielversprechende Strategie, doch auch in diesem Fall müssen beim abschließenden Feintuning wahrscheinlich deutlich mehr Varianten mit einem leistungsfähigen Selektionssystem untersucht werden. Eine Alternative zu diesem Ansatz sind randomisierte rekombinante Methoden wie das *Shuffling*.

Ein weiterer interessanter Teilaspekt für zukünftige Arbeiten ist sicherlich die weitergehende Charakterisierung der Phospholipase-Nebenaktivität der BSLA. So kann z.B. versucht werden, die gewonnenen Erkenntnisse, was die kritischen Aminosäurepositionen betrifft, auf andere Lipasen mit bzw. ohne Phospholipase-Nebenaktivität zu übertragen. Hier wäre das erste Versuchsobjekt zweifellos die BSLB, in der vielleicht durch einen einzigen Aminosäureaustausch eine Phospholipase-Nebenaktivität generiert werden könnte.



5. Zusammenfassung

Das α/β -Hydrolase Faltungsmotiv ist ein hoch konserviertes strukturelles Gerüst, durch das eine Vielzahl verschiedener enzymatischer Reaktionen katalysiert werden können. Zu dieser Familie gehören z.B. Lipasen und Epoxidhydrolasen. In einigen Fällen überlappen diese unterschiedlichen Aktivitäten, man spricht dann von katalytischer Promiskuität. Bisher ist es nicht möglich, ausgehend von Sequenz oder Struktur des Enzyms auf seine Aktivität zu schließen.

Das Hauptziel dieser Arbeit war, zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen Sequenz, Struktur und Aktivität beizutragen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde versucht, eine Enzymfunktion in eine andere umzuwandeln. Zur Identifizierung der verschiedenen Enzymfunktionen wurde eine Vielzahl an Testsystemen etabliert bzw. neu entwickelt (A). Die Generierung neuer Enzymaktivitäten wurden sowohl mittels einer randomisierten Strategie (B) als auch mit rationalem Design (C) angegangen.

(A) Testsysteme

Bereits beschriebene Tests für Lipase-, Esterase-, Protease-, Phosphatase-, Peroxidase-, Amidase-, Dehalogenase-, Phospholipase- und Epoxidhydrolaseaktivität wurden auf ihre Effizienz getestet und bei Bedarf modifiziert. Einige Enzymaktivitäten konnte mit den vorhandenen Systemen nicht befriedigend analysiert werden, in diesen Fällen wurden neue Systeme entwickelt.

Zum Nachweis der Epoxidhydrolaseaktivität wurde ein neuer Hochdurchsatzaktivitätstest entwickelt, der auf der Fluoreszenz des Reaktionsproduktes beruht. Weiter wird ein Hochdurchsatz-Testsystem für die Lipase-katalysierte enantioselektive Esterhydrolyse beschrieben. Damit können die entstandenen chiralen Alkohole direkt bezüglich der Verteilung ihrer Enantiomere abgeschätzt werden. Der Nachweis der Produkte findet in diesem Fall mittels einer gekoppelten Reaktion mit zwei enantiokomplementären Alkoholdehydrogenasen statt. Die Anwendbarkeit beider neu entwickelten Systeme wird mit dem Durchmustern ausgewählter Variantenbanken gezeigt.

(B) Randomisierter Ansatz zur Entwicklung neuer Enzymaktivitäten

Die Lipase A aus *Bacillus subtilis* wurde als Modellprotein für diesen Ansatz gewählt. Dieses Protein ist eine der kleinsten bekannten Lipasen. Als Grundlage für die

Zusammenfassung

Untersuchungen diente eine komplette Sättigungsmutagenesebank dieses Enzyms. Bei der Untersuchung des Wildtyps stellte sich heraus, dass dieses Protein über eine bisher noch nicht beschriebene Phospholipase-Nebenaktivität verfügt, die im homologen Enzym (Lipase B) nicht detektierbar ist. In den durchmusterten Variantenbanken wurden Varianten identifiziert, die diese Nebenaktivität nicht mehr aufweisen. Diese wurden bezüglich ihrer Austausche charakterisiert. Aufgrund dieser Daten konnte ein Modell für die molekulare Grundlage dieser Nebenaktivität entwickelt werden.

Gänzlich neue Enzymaktivitäten wurden mit diesem Ansatz nicht gefunden, was vermutlich auf die geringe Toleranz der Enzymstruktur gegenüber Aminosäureaustauschen und die relativ wenigen eingebrachten Mutationen zurückzuführen ist.

(C) Rationales Design

Mittels der Analyse von Kristallstrukturen der Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* wurden Enzymvarianten mit geänderten aktiven Zentren bzw. anderen Oberflächenstrukturen geplant, die andere Eigenschaften aufweisen, die für Dehalogenasen und Lipasen typisch sind.

Obwohl keine der entsprechenden Varianten die vorhergesagte Aktivität aufwies, konnten Varianten identifiziert werden, die erhöhte Epoxidhydrolaseaktivität aufwiesen. Um zusätzliche Diversität in die Struktur einzubringen und eine Feinanpassung an die neuen Verhältnisse vorzunehmen, wurden mittels fehlerhafter PCR zusätzliche Mutationen eingebracht, allerdings konnten auch hier die vorhergesagten Aktivitäten nicht induziert werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse werden abschließend Strategien abgeleitet, um die Chancen, erfolgreich neue Aktivitäten zu generieren, zu erhöhen. Hierzu scheint es vor allem nötig zu sein, mehr Mutationen einzubringen, wodurch allerdings auch mehr Varianten gescreent werden müssen. Dies zieht die Notwendigkeit nach sich, bessere Selektionssysteme zu entwickeln. Weiterhin ist die Verknüpfung von rationalem Design mit randomisierten Methoden zur Feinanpassung der Struktur eine aussichtsreiche Perspektive.

6. Summary

The α/β -hydrolase fold is a highly conserved protein-scaffold that constitutes the structural basis of the α/β -hydrolase family of proteins, whose members can catalyze a multitude of reactions. Members of this family include for example lipases and epoxide hydrolases. In some cases certain catalytic activities are overlapping, meaning that one enzyme can catalyze more than one reaction. Under those circumstances such enzymes are considered as catalytically promiscuous. Currently it is still impossible to gain insight into the catalytic function of an enzyme by solely relying on amino acid sequence information. Even structural information at the atomic level is sometimes not sufficient to reliably predict the catalytic capabilities/ functions of a given enzyme/ protein.

The main goal of this thesis was to contribute to the understanding of the relationship between sequence, structure and catalytic-activity. To promote this understanding the ultimate goal was to transform a certain enzyme and thus catalytic-activity into another one to generate altered enzymatic functions or catalytic promiscuity. To identify changes in the catalytic activities, various assay-systems were successfully established or newly developed (A). To generate catalytic promiscuity or change the catalytic function of an enzyme a randomized (B) - as well as a rational-design based approach (C) were employed.

(A) Assay-systems: To test for lipase-, esterase-, protease-, phosphatase-, peroxidase-, amidase-, dehalogenase-, phospholipase- and epoxide hydrolase-activity, already described assay-systems were tested with regard to their efficiency and were modified if necessary. In case the described assay-system did not prove to be applicable, a new system was developed.

In order to test for epoxide hydrolase-activity a novel high-throughput (HTP) assay was developed that is based on the intrinsic fluorescence of the epoxide hydrolase reaction product. Furthermore, a HTP-assay-system was developed to assay for lipase-catalyzed enantioselective ester-hydrolysis. This assay-system allows to easily estimate the enantiomeric excess (ee) of the chiral alcohols produced in the enzymatic reaction. The detection of the chiral reaction products relies on a coupled enzymatic reaction by employing two enantioselective alcohol dehydrogenases.

Both newly developed assay-systems were furthermore employed in the screening of several enzyme-libraries.

Summary

(B) Randomized approach for the generation of promiscuous activities: *Bacillus subtilis* Lipase A (BSLA) was chosen as the model-protein for this approach. This protein is the smallest known lipase. As a starting point for this study a complete saturation-mutagenesis library for this enzyme was used. In preliminary tests, using the respective wildtype enzyme, it became apparent that BSLA already possesses a phospholipase side-activity that has not been described so far. Interestingly this side-activity is not detectable in the highly homologous Lipase B of *B. subtilis*. In the screened BSLA-libraries several variants could be identified that lost the phospholipase side-activity. Those variants were further characterized regarding the amino-acid substitutions they carry. Based on this information a model for the molecular basis of this side-activity of BSLA could be proposed. However, using the randomized approach, variants with a completely changed (or novel) catalytic-activity could not be identified. This might be linked to the low mutational-tolerance of this particular enzyme-structure and the relatively small amount of introduced mutations and thus genetic diversity.

(C) Rational-Design: Based on structural information on the epoxide hydrolase of *Aspergillus niger*, several enzyme variants with changed active-site- or surface-properties were predicted to mimic those of structural-homologous enzymes like dehalogenases and lipases. Despite the fact that the predicted variants did not yield the desired novel activities, several variants with an increased epoxide hydrolase-activity could be identified. To generate additional genetic diversity in the epoxide hydrolase structure and to fine-tune the fold of the variants, additional mutations were introduced by employing error-prone-PCR. Unfortunately, also this approach did not result in variant-enzymes with novel (desired) activities.

Based on the results of this thesis, concluding strategies were developed that might overcome the identified obstacles and thus increase the chances to successfully generate promiscuous activities in a given protein-fold. Apparently it is of utmost importance to generate large libraries with a high degree of genetic diversity which concomitantly results in the necessity to screen larger amounts of variants. Thus, this strategy is ultimately dependent on efficient selection-systems that decrease the time required for the screening of such large and diverse libraries. Furthermore, the combination of rational design with the randomized approach seems a promising strategy for future attempts.

7. Literaturverzeichnis

- [1] R. Wolfenden, M. J. Snider, *Acc Chem Res* **2001**, *34*, 938.
- [2] L. C. James, D. S. Tawfik, *Protein Sci* **2001**, *10*, 2600.
- [3] U. T. Bornscheuer, K. Buchholz, *Engineering in Life Sciences* **2005**, *5*, 309
- [4] W. Dubbert, T. Heine, Berlin, **2006**, pp. Dokumentation der Bundesministerium für Umwelt.
- [5] C. Dlugy, A. Wolfson, *Bioprocess Biosyst Eng* **2007**, *30*, 327.
- [6] K. Tipton, S. Boyce, *Bioinformatics* **2000**, *16*, 34.
- [7] P. Gegenheimer, *RNA* **2000**, *6*, 1695.
- [8] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res* **2000**, *28*, 235.
- [9] A. G. Murzin, S. E. Brenner, T. Hubbard, C. Chothia, *J Mol Biol* **1995**, *247*, 536.
- [10] A. Andreeva, D. Howorth, J. M. Chandonia, S. E. Brenner, T. J. Hubbard, C. Chothia, A. G. Murzin, *Nucleic Acids Res* **2007**.
- [11] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, et al., *Protein Eng* **1992**, *5*, 197.
- [12] D. Pathak, D. Ollis, *J Mol Biol* **1990**, *214*, 497.
- [13] S. M. Franken, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, B. W. Dijkstra, *EMBO J.* **1991**, *10*, 1297.
- [14] D. I. Liao, S. J. Remington, *J Biol Chem* **1990**, *265*, 6528.
- [15] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **1991**, *253*, 872.
- [16] J. D. Schrag, Y. G. Li, S. Wu, M. Cygler, *Nature* **1991**, *351*, 761.
- [17] A. R. Slabas, J. Windust, C. M. Sidebottom, *Biochem J* **1990**, *269*, 279.
- [18] P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Chem Biol* **1999**, *6*, R91.
- [19] M. Holmquist, *Curr Protein Pept Sci* **2000**, *1*, 209.
- [20] J. Kraut, *Annu Rev Biochem* **1977**, *46*, 331.
- [21] F. Ferrato, F. Carriere, L. Sarda, R. Verger, *Methods Enzymol* **1997**, *286*, 327.
- [22] A. M. Brzozowski, U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Hüge-Jensen, S. A. Patkar, L. Thim, *Nature* **1991**, *351*, 491.
- [23] L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Hüge-Jensen, L. Norskov, et al., *Nature* **1990**, *343*, 767.
- [24] R. Verger, *Trends Biotechnol* **1997**, *15*, 32.
- [25] K. E. Jaeger, S. Ransac, H. B. Koch, F. Ferrato, B. W. Dijkstra, *FEBS Lett* **1993**, *332*, 143.
- [26] G. van Pouderoyen, T. Eggert, K. E. Jaeger, B. W. Dijkstra, *J Mol Biol* **2001**, *309*, 215.
- [27] R. D. V. Schmid, *Robert Angew. Chem.* **1998**, *37*, 1608.
- [28] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis:*

Literaturverzeichnis

- Regio- and Stereoselective Biotransformations*, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2005**
- [29] J. Thiem, *FEMS Microbiol Rev* **1995**, 16, 193.
- [30] P. Adlercreutz, *Biotechnol Genet Eng Rev* **1994**, 12, 231.
- [31] M. Nardini, B. W. Dijkstra, *Curr Opin Struct Biol* **1999**, 9, 732.
- [32] L. Polgar, *Cell Mol Life Sci* **2005**, 62, 2161.
- [33] U. Derewenda, L. Swenson, R. Green, Y. Wei, S. Yamaguchi, R. Joerger, M. J. Haas, Z. S. Derewenda, *Protein Eng* **1994**, 7, 551.
- [34] Z. S. Derewenda, *Adv Protein Chem* **1994**, 45, 1.
- [35] U. Derewenda, A. M. Brzozowski, D. M. Lawson, Z. S. Derewenda, *Biochemistry* **1992**, 31, 1532.
- [36] P. Carter, J. A. Wells, *Nature* **1988**, 332, 564.
- [37] R. J. Kazlauskas, *Trends Biotechnol* **1994**, 12, 464.
- [38] J. D. Schrag, Y. Li, M. Cygler, D. Lang, T. Burgdorf, H. J. Hecht, R. Schmid, D. Schomburg, T. J. Rydel, J. D. Oliver, L. C. Strickland, C. M. Dunaway, S. B. Larson, J. Day, A. McPherson, *Structure* **1997**, 5, 187.
- [39] C. Cambillau, H. van Tilbeurgh, *Current Opinion in Structural Biology* **1993**, 3, 885.
- [40] H. D. Beer, G. Wohlfahrt, J. E. McCarthy, D. Schomburg, R. D. Schmid, *Protein Eng* **1996**, 9, 507.
- [41] P. Graumann, eds., *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*, Caister Academic Press, **2007**.
- [42] F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin, et al., *Nature* **1997**, 390, 249.
- [43] V. Nagarajan, *Methods Enzymol* **1990**, 185, 214.
- [44] R. Gupta, Q. K. Beg, P. Lorenz, *Appl Microbiol Biotechnol* **2002**, 59, 15.
- [45] E. Ferrari, A. S. Jarnagin, B. F. Schmidt, *Commercial production of extracellular enzymes. In: Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics*, American Society for Microbiology, Washington, DC, **1993**.
- [46] V. Dartois, A. Baulard, K. Schanck, C. Colson, *Biochim Biophys Acta* **1992**, 1131, 253.
- [47] T. Eggert, G. van Pouderoyen, B. W. Dijkstra, K. E. Jaeger, *FEBS Lett* **2001**, 502, 89.
- [48] T. Eggert, G. Pencreac'h, I. Douchet, R. Verger, K. E. Jaeger, *Eur J Biochem* **2000**, 267, 6459.
- [49] S. A. Funke, N. Otte, T. Eggert, M. Bocola, K. E. Jaeger, W. Thiel, *Protein Eng Des Sel* **2005**, 18, 509.
- [50] T. Eggert, U. Brockmeier, M. J. Droge, W. J. Quax, K. E. Jaeger, *FEMS Microbiol Lett* **2003**, 225, 319.
- [51] K. E. Jaeger, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, *Annu Rev Microbiol* **1999**, 53, 315.
- [52] K. E. Jaeger, T. Eggert, *Curr Opin Biotechnol* **2002**, 13, 390.
- [53] H. Yamamoto, S. Uchiyama, J. Sekiguchi, *Gene* **1996**, 181, 147.

- [54] T. Eggert, Ph.D. Thesis, Ruhr-Universität Bochum **2001**.
- [55] C. Martinez, P. De Geus, M. Lauwereys, G. Matthyssens, C. Cambillau, *Nature* **1992**, *356*, 615.
- [56] S. Longhi, M. Mannesse, H. M. Verheij, G. H. De Haas, M. Egmond, E. Knoop-Mouthuy, C. Cambillau, *Protein Sci* **1997**, *6*, 275.
- [57] J. Chen, J. B. Anderson, C. DeWeese-Scott, N. D. Fedorova, L. Y. Geer, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, T. Madej, A. Marchler-Bauer, G. H. Marchler, R. Mazumder, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, A. R. Panchenko, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, S. Vasudevan, Y. Wang, R. A. Yamashita, J. J. Yin, S. H. Bryant, *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 474.
- [58] J. F. Gibrat, T. Madej, S. H. Bryant, *Curr Opin Struct Biol* **1996**, *6*, 377.
- [59] A. R. Panchenko, T. Madej, *Proteins* **2004**, *57*, 539.
- [60] T. Madej, A. R. Panchenko, J. Chen, S. H. Bryant, *BMC Struct Biol* **2007**, *7*, 23.
- [61] M. Arand, A. Cronin, M. Adamska, F. Oesch, *Methods Enzymol* **2005**, *400*, 569.
- [62] C. A. Weijers, A. de Haan, J. A. de Bont, *Microbiol Sci* **1988**, *5*, 156.
- [63] M. Nardini, I. S. Ridder, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, R. Rink, D. B. Janssen, B. W. Dijkstra, *J Biol Chem* **1999**, *274*, 14579.
- [64] A. Archelas, R. Furstoss, *Curr Opin Chem Biol* **2001**, *5*, 112.
- [65] S. Barth, M. Fischer, R. D. Schmid, J. Pleiss, *Bioinformatics* **2004**, *20*, 2845.
- [66] T. Yamada, C. Morisseau, J. E. Maxwell, M. A. Argiriadi, D. W. Christianson, B. D. Hammock, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 23082.
- [67] B. Borhan, A. D. Jones, F. Pinot, D. F. Grant, M. J. Kurth, B. D. Hammock, *J Biol Chem* **1995**, *270*, 26923.
- [68] R. Rink, D. B. Janssen, *Biochem* **1998**, *37*, 18119.
- [69] R. N. Armstrong, C. S. Cassidy, *Drug Metab Rev* **2000**, *32*, 327.
- [70] M. Arand, F. Muller, A. Mecky, W. Hinz, P. Urban, D. Pompon, R. Kellner, F. Oesch, *Biochem J* **1999**, *337 (Pt 1)*, 37.
- [71] M. Arand, H. Hemmer, H. Durk, J. Baratti, A. Archelas, R. Furstoss, F. Oesch, *Biochem J* **1999**, *344 Pt 1*, 273.
- [72] M. Arand, D. F. Grant, J. K. Beetham, T. Friedberg, F. Oesch, B. D. Hammock, *FEBS Lett* **1994**, *338*, 251.
- [73] K. H. Verschueren, J. Kingma, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, D. B. Janssen, B. W. Dijkstra, *Biochemistry* **1993**, *32*, 9031.
- [74] J. Zou, B. M. Hallberg, T. Bergfors, F. Oesch, M. Arand, S. L. Mowbray, T. A. Jones, *Structure* **2000**, *8*, 111.
- [75] R. Furstoss, S. Pedragosa-Moreau, A. Archelas, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 4593.
- [76] R. Furstoss, S. Pedragosa-Moreau, A. Archelas, *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 3319.
- [77] S. Pedragosa-Moreau, C. Morisseau, J. Zylber, A. Archelas, J. Baratti, R. Furstoss, *J Org Chem* **1996**, *61*, 7402.
- [78] C. Morisseau, A. Archelas, C. Guilton, D. Faucher, R. Furstoss, J. C. Baratti, *Eur J Biochem* **1999**, *263*, 386.
- [79] M. S. Smit, *Trends Biotechnol* **2004**, *22*, 123.

Literaturverzeichnis

- [80] A. Archelas, R. Furstoss, *Trends Biotechnol* **1998**, *16*, 108.
- [81] R. Furstoss, C. Chen, A. Archelas, *J. Am. Soc* **1993**, *58*, 5528.
- [82] G. M. Lacourciere, R. N. Armstrong, *Chem Res Toxicol* **1994**, *7*, 121.
- [83] F. Cedrone, S. Niel, S. Roca, T. Bhatnagar, N. Ait-abdelkader, C. Torre, H. Krumm, A. Maichele, M. T. Reetz, J. Baratti, *Biocatal Biotransform.* **2003**, *21*, 357.
- [84] M. T. Reetz, C. Torre, A. Eipper, R. Lohmer, M. Hermes, B. Brunner, A. Maichele, M. Bocola, M. Arand, A. Cronin, Y. Genzel, A. Archelas, R. Furstoss, *Org Lett* **2004**, *6*, 177.
- [85] C. Torre, Ph.D. Thesis, Ruhr-Universität Bochum (Mülheim an der Ruhr), **2003**.
- [86] P. F. Gherardini, M. N. Wass, M. Helmer-Citterich, M. J. Sternberg, *J Mol Biol* **2007**, *372*, 817.
- [87] H. Wajant, K. Pfizenmaier, *J Biol Chem* **1996**, *271*, 25830.
- [88] G. Gartler, C. Kratky, K. Gruber, *J Biotechnol* **2007**, *129*, 87.
- [89] K. Gruber, G. Gartler, B. Krammer, H. Schwab, C. Kratky, *J Biol Chem* **2004**, *279*, 20501.
- [90] B. Krammer, K. Rumbold, M. Tschemmernegg, P. Pochlauer, H. Schwab, *J Biotechnol* **2007**, *129*, 151.
- [91] W. R. Taylor, C. A. Orengo, *J Mol Biol* **1989**, *208*, 1.
- [92] R. B. Russell, P. D. Sasieni, M. J. Sternberg, *J Mol Biol* **1998**, *282*, 903.
- [93] M. S. Fornasari, G. Parisi, J. Echave, *Mol Biol Evol* **2007**, *24*, 349.
- [94] Y. Yoshikuni, T. E. Ferrin, J. D. Keasling, *Nature* **2006**, *440*, 1078.
- [95] Y. Yoshikuni, J. D. Keasling, *Curr Opin Chem Biol* **2007**, *11*, 233.
- [96] D. Reardon, G. K. Farber, *FASEB J* **1995**, *9*, 497.
- [97] G. K. Farber, G. A. Petsko, *Trends Biochem Sci* **1990**, *15*, 228.
- [98] C. J. Jeffery, *Trends Genet* **2003**, *19*, 415.
- [99] C. J. Jeffery, *Trends Biochem Sci* **1999**, *24*, 8.
- [100] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 6032.
- [101] K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol* **2007**, *25*, 231.
- [102] W. Y. Choy, J. D. Forman-Kay, *J Mol Biol* **2001**, *308*, 1011.
- [103] C. P. Macol, H. Tsuruta, B. Stec, E. R. Kantrowitz, *Nat Struct Biol* **2001**, *8*, 423.
- [104] N. Leksawasdi, Y. Y. Chow, M. Breuer, B. Hauer, B. Rosche, P. L. Rogers, *J Biotechnol* **2004**, *111*, 179.
- [105] B. Ma, M. Shatsky, H. J. Wolfson, R. Nussinov, *Protein Sci* **2002**, *11*, 184.
- [106] D. E. Koshland, *Angew. Chem* **1994**, *106*, 2468.
- [107] L. C. James, D. S. Tawfik, *Trends Biochem Sci* **2003**, *28*, 361.
- [108] K. A. Dill, H. S. Chan, *Nat Struct Biol* **1997**, *4*, 10.
- [109] J. K. Myers, T. G. Oas, *Annu Rev Biochem* **2002**, *71*, 783.
- [110] A. O. Magnusson, M. Takwa, A. Hamberg, K. Hult, *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 4582.
- [111] I. Kauffmann, C. Schmidt-Dannert, *Protein Eng* **2001**, *14*, 919.
- [112] C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 874.
- [113] M. Svedendahl, K. Hult, P. Berglund, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 17988.

- [114] P. Carlqvist, M. Svedendahl, C. Branneby, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *Chembiochem* **2005**, *6*, 331.
- [115] T. Kitazume, T. Ikeya, K. Murata, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1331.
- [116] H. I. Park, L. J. Ming, *Angew Chem Int Ed Engl* **1999**, *38*, 2914.
- [117] C. Ying, S. Xiao-Feng, W. Na, L. Xian-Fu, *Synthesis* **2004**, *5*, 671.
- [118] Y. Cai, S. P. Yao, Q. Wu, X. F. Lin, *Biotechnol Lett* **2004**, *26*, 525.
- [119] T. C. Cheng, S. P. Harvey, G. L. Chen, *Appl Environ Microbiol* **1996**, *62*, 1636.
- [120] A. Ercan, H. I. Park, L. J. Ming, *Biochemistry* **2006**, *45*, 13779.
- [121] F. Hollfelder, A. J. Kirby, D. S. Tawfik, *Nature* **1996**, *383*, 60.
- [122] G. Klein, J. L. Reymond, *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8*, 1113.
- [123] D. R. Palmer, J. B. Garrett, V. Sharma, R. Meganathan, P. C. Babbitt, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4252.
- [124] J. B. Thoden, E. A. Taylor Ringia, J. B. Garrett, J. A. Gerlt, H. M. Holden, I. Rayment, *Biochemistry* **2004**, *43*, 5716.
- [125] F. Henot, R. M. Pollack, *Biochemistry* **2000**, *39*, 3351.
- [126] C. Darwin, *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*, London **1859**.
- [127] L. D. Unsworth, J. van der Oost, S. Koutsopoulos, *FEBS J* **2007**, *274*, 4044.
- [128] T. W. Johannes, H. Zhao, *Curr Opin Microbiol* **2006**, *9*, 261.
- [129] V. G. Eijsink, A. Bjork, S. Gaseidnes, R. Sirevag, B. Synstad, B. van den Burg, G. Vriend, *J Biotechnol* **2004**, *113*, 105.
- [130] V. G. Eijsink, S. Gaseidnes, T. V. Borchert, B. van den Burg, *Biomol Eng* **2005**, *22*, 21.
- [131] S. B. Rubin-Pitel, H. Zhao, *Comb Chem High Throughput Screen* **2006**, *9*, 247.
- [132] E. G. Hibbert, P. A. Dalby, *Microb Cell Fact* **2005**, *4*, 29.
- [133] H. Zhao, K. Chockalingam, Z. Chen, *Curr Opin Biotechnol* **2002**, *13*, 104.
- [134] N. M. Antikainen, S. F. Martin, *Bioorg Med Chem* **2005**, *13*, 2701.
- [135] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, Vol. 7, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1992**.
- [136] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1986**, *51 Pt 1*, 263.
- [137] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, *230*, 1350.
- [138] K. B. Mullis, F. A. Faloona, *Methods Enzymol* **1987**, *155*, 335.
- [139] G. F. J. R. C. Cadwell, *PCR primer: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour, **1995**.
- [140] A. Bichet, M. Bureik, N. Lenz, R. Bernhardt, *Appl Biochem Biotechnol* **2004**, *117*, 115.
- [141] D. W. C. Leung, E.; Goeddel, D.V., *Technique* **1989**, *1*, 11.
- [142] K. A. Eckert, T. A. Kunkel, *PCR Methods Appl* **1991**, *1*, 17.
- [143] R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl* **1992**, *2*, 28.
- [144] M. Zaccolo, D. M. Williams, D. M. Brown, E. Gherardi, *J Mol Biol* **1996**, *255*, 589.
- [145] C. Fenton, H. Xu, E. I. Petersen, S. B. Petersen, M. R. el-Gewely, *Methods Mol Biol* **2002**, *182*, 231.
- [146] R. Feistel, W. Ebeling, *Biosystems* **1982**, *15*, 291.

Literaturverzeichnis

- [147] M. Eigen, R. Winkler-Oswatitsch, *Methods Enzymol* **1990**, 183, 505.
- [148] M. Eigen, R. Winkler-Oswatitsch, A. Dress, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, 85, 5913.
- [149] F. H. Arnold, *Chemical Engineering Science* **1996** 51, 5091.
- [150] S. V. Taylor, P. Kast, D. Hilvert, *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, 40, 3310.
- [151] Y. L. Boersma, M. J. Droge, W. J. Quax, *FEBS J* **2007**.
- [152] J. F. Reidhaar-Olson, R. T. Sauer, *Science* **1988**, 241, 53.
- [153] A. Crameri, W. P. Stemmer, *Biotechniques* **1995**, 18, 194.
- [154] J. D. Hermes, S. C. Blacklow, J. R. Knowles, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, 87, 696.
- [155] A. P. Arkin, D. C. Youvan, *Biotechnology (N Y)* **1992**, 10, 297.
- [156] S. A. Funke, Ph.D. Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2004**.
- [157] A. Aharoni, A. D. Griffiths, D. S. Tawfik, *Curr Opin Chem Biol* **2005**, 9, 210.
- [158] M. Olsen, B. Iverson, G. Georgiou, *Curr Opin Biotechnol* **2000**, 11, 331.
- [159] D. C. Demirjian, P. C. Shah, F. Moris-Varas, *Screening for novel enzymes, Vol. 200*, **1999**.
- [160] T. Vorderwülbecke, K. Kieslich, H. Erdmann, *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, 14, 631.
- [161] B. J. Battersby, M. Trau, *Trends Biotechnol* **2002**, 20, 167.
- [162] L. You, F. H. Arnold, *Protein Eng* **1996**, 9, 77.
- [163] B. C. Saha, Demirjian, D.C., *Acs Symp Ser* **2001**, 776.
- [164] J. D. Sutherland, *Curr Opin Chem Biol* **2000**, 4, 263.
- [165] U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3285.
- [166] M. J. Olsen, D. Stephens, D. Griffiths, P. Daugherty, G. Georgiou, B. L. Iverson, *Nat Biotechnol* **2000**, 18, 1071.
- [167] F. Moris-Varas, A. Shah, J. Aikens, N. P. Nadkarni, J. D. Rozzell, D. C. Demirjian, *Bioorg Med Chem* **1999**, 7, 2183.
- [168] U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, H. H. Meyer, *Bioorg Med Chem* **1999**, 7, 2169.
- [169] F. H. Arnold, G. Georgiou, *Directed enzyme evolution: Screening and selection methods., Vol. 230*, Humana Press, **2003**.
- [170] M. Baumann, Ph.D. Thesis, Universität Stuttgart **2002**.
- [171] U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Curr Opin Chem Biol* **2001**, 5, 137.
- [172] C. Khosla, P. B. Harbury, *Nature* **2001**, 409, 247.
- [173] D. N. Bolon, C. A. Voigt, S. L. Mayo, *Curr Opin Chem Biol* **2002**, 6, 125.
- [174] F. H. Arnold, *Nature* **2001**, 409, 253.
- [175] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J Mol Biol* **1986**, 189, 113.
- [176] W. O. Bullock, J. M. Fernandez, J. M. Short, *Biotechniques* **1987** 5, 376.
- [177] D. Hanahan, *J Mol Biol* **1983**, 166, 557.
- [178] S. A. Funke, A. Eipper, M. T. Reetz, N. Otte, W. Thiel, G. van Pouderoyen, B. W. Dijkstra, K. E. Jaeger, T. Eggert, *Biocatal Biotransform.* **2003**, 21, 67.
- [179] T. Rosenbaum, Fachhochschule Aachen **2003**.
- [180] H. C. Birnboim, J. Doly, *Nucleic Acids Res* **1979**, 7, 1513.
- [181] J. Sambrook, Fritsch, E.F. & Maniatis, T., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. ed., Cold Spring

- Habor Laboratory Press., New York, **1989**.
- [182] W. J. Dower, J. F. Miller, C. W. Ragsdale, *Nucleic Acids Res* **1988**, *16*, 6127.
- [183] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680.
- [184] G. L. Peterson, *Anal Biochem* **1977**, *83*, 346.
- [185] R. G. Kok, V. M. Christoffels, B. Vosman, K. J. Hellingwerf, *J Gen Microbiol* **1993**, *139*, 2329.
- [186] F. Beisson, A. Tiss, C. Riviere, R. Verger, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *133*.
- [187] G. Kouker, K. E. Jaeger, *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 211.
- [188] P. A. Sokol, D. E. Ohman, B. H. Iglewski, *J Clin Microbiol* **1979**, *9*, 538.
- [189] M. R. Brown, J. H. Foster, *J Clin Pathol* **1970**, *23*, 172.
- [190] M. F. Price, I. D. Wilkinson, L. O. Gentry, *Sabouraudia* **1982**, *20*, 7.
- [191] M. G. Macfarlane, B. C. Knight, *Biochem J* **1941**, *35*, 884.
- [192] M. K. Kim, J. S. Rhee, *Biotechnology Techniques* **1994**, *8*.
- [193] E. Brickman, J. Beckwith, *J Mol Biol* **1975**, *96*, 307.
- [194] G. Satta, G. Grazi, P. E. Varaldo, R. Fontana, *J Clin Pathol* **1979**, *32*, 391.
- [195] R. Burioni, P. Plaisant, M. L. Riccio, G. M. Rossolini, G. Satta, *New Microbiol* **1995**, *18*, 201.
- [196] M. B. Mayfield, K. Kishi, M. Alic, M. H. Gold, *Appl Environ Microbiol* **1994**, *60*, 4303.
- [197] B. van Loo, J. H. Spelberg, J. Kingma, T. Sonke, M. G. Wubbolts, D. B. Janssen, *Chem Biol* **2004**, *11*, 981.
- [198] D. B. Janssen, F. Pries, J. R. van der Ploeg, *Annu Rev Microbiol* **1994**, *48*, 163.
- [199] C. H. Chang, J. F. Schindler, C. J. Unkefer, L. A. Vanderberg, J. R. Brainard, T. C. Terwilliger, *Bioorg Med Chem* **1999**, *7*, 2175.
- [200] P. Holloway, J. T. Trevors, H. Lee, *Journal of Microbiological Methods* **1998**, *32*, 31.
- [201] T. Bosma, J. Damborsky, G. Stucki, D. B. Janssen, *Appl Environ Microbiol* **2002**, *68*, 3582.
- [202] M. T. Reetz, L. W. Wang, *Comb Chem High Throughput Screen* **2006**, *9*, 295.
- [203] U. K. Winkler, M. Stuckmann, *J Bacteriol* **1979**, *138*, 663.
- [204] F. Cedrone, T. Bhatnagar, J. C. Baratti, *Biotechnol Lett* **2005**, *27*, 1921.
- [205] A. Flieger, S. Gong, M. Faigle, M. Deeg, P. Bartmann, B. Neumeister, *J Bacteriol* **2000**, *182*, 1321.
- [206] S. Kurioka, M. Matsuda, *Anal Biochem* **1976**, *75*, 281.
- [207] W. B. Baine, *J Gen Microbiol* **1988**, *134*, 489.
- [208] D. E. Bennett, C. E. McCreary, D. C. Coleman, *Microbiology* **1998**, *144* (Pt 1), 55.
- [209] A. Weckbecker, W. Hummel, *Biotechnol Lett* **2004**, *26*, 1739.
- [210] K. Abokitse, W. Hummel, *Appl Microbiol Biotechnol* **2003**, *62*, 380.
- [211] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res* **1997**, *25*, 3389.
- [212] R. Chenna, H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, J. D. Thompson, *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 3497.

Literaturverzeichnis

- [213] R. A. Sayle, E. J. Milner-White, *Trends Biochem Sci* **1995**, *20*, 374.
- [214] W. R. Streit, R. A. Schmitz, *Curr Opin Microbiol* **2004**, *7*, 492.
- [215] K. S. Hong, H. K. Lim, E. J. Chung, E. J. Park, M. H. Lee, J. C. Kim, G. J. Choi, K. Y. Cho, S. W. Lee, *J Microbiol Biotechnol* **2007**, *17*, 1655.
- [216] C. Schmeisser, H. Steele, W. R. Streit, *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, *75*, 955.
- [217] C. Elend, C. Schmeisser, H. Hoebenreich, H. L. Steele, W. R. Streit, *J Biotechnol* **2007**, *130*, 370.
- [218] D. G. Lee, J. H. Jeon, M. K. Jang, N. Y. Kim, J. H. Lee, J. H. Lee, S. J. Kim, G. D. Kim, S. H. Lee, *Biotechnol Lett* **2007**, *29*, 465.
- [219] J. Miedzobrodzki, P. Kaszycki, A. Bialecka, A. Kasproicz, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2002**, *21*, 269.
- [220] S. Aoki, S. Ito-Kuwa, K. Nakamura, J. Kato, K. Ninomiya, V. Vidotto, *Mycopathologia* **1994**, *128*, 143.
- [221] G. Bourgeau, H. Lapointe, P. Peloquin, D. Mayrand, *Infect Immun* **1992**, *60*, 3186.
- [222] K. Lämmle, Ph.D. Thesis, Universität Stuttgart **2004**.
- [223] T. Waschkowitz, Ph.D. Thesis, Georg-August-Universität Göttingen **2006**.
- [224] K. Lämmle, H. Zipper, M. Breuer, B. Hauer, C. Buta, H. Brunner, S. Rupp, *J Biotechnol* **2007**, *127*, 575.
- [225] J. E. Coleman, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1992**, *21*, 441.
- [226] F. Beato Gonzalez, *Med Esp* **1956**, *35*, 501.
- [227] M. L. Riccio, G. M. Rossolini, G. Lombardi, A. Chiesurin, G. Satta, *J Appl Microbiol* **1997**, *82*, 177.
- [228] G. L. Chrisope, C. W. Fox, R. T. Marshall, *Appl Environ Microbiol* **1976**, *31*, 784.
- [229] A. Flieger, B. Neumeister, N. P. Cianciotto, *Infect Immun* **2002**, *70*, 6094.
- [230] Y. H. Samaranayake, R. S. Dassanayake, J. A. Jayatilake, B. P. Cheung, J. Y. Yau, K. W. Yeung, L. P. Samaranayake, *J Med Microbiol* **2005**, *54*, 583.
- [231] T. Hotelier, L. Renault, X. Cousin, V. Negre, P. Marchot, A. Chatonnet, *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, D145.
- [232] I. Watanabe, R. Koishi, Y. Yao, T. Tsuji, N. Serizawa, *Biosci Biotechnol Biochem* **1999**, *63*, 820.
- [233] H. Tanaka, R. Takeya, H. Sumimoto, *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *272*, 320.
- [234] D. J. Mancuso, C. M. Jenkins, R. W. Gross, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 9937.
- [235] A. Hjorth, F. Carriere, C. Cudrey, H. Woldike, E. Boel, D. M. Lawson, F. Ferrato, C. Cambillau, G. G. Dodson, L. Thim, R. Verger, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4702.
- [236] J. J. Tiesinga, G. van Pouderoyen, M. Nardini, S. Ransac, B. W. Dijkstra, *J Mol Biol* **2007**, *371*, 447.
- [237] K. Nikoleit, R. Rosenstein, H. M. Verheij, F. Gotz, *Eur J Biochem* **1995**, *228*, 732.
- [238] J. W. Simons, M. D. van Kampen, I. Ubarretxena-Belandia, R. C. Cox, C. M. Alves dos Santos, M. R. Egmond, H. M. Verheij, *Biochemistry* **1999**, *38*, 2.
- [239] A. Claiborne, I. Fridovich, *J Biol Chem* **1979**, *254*, 4245.
- [240] L. M. Bordeleau, R. Bartha, *Appl Microbiol* **1969**, *18*, 274.

- [241] O. Kirk, L. S. Conrad, *Angew Chem Int Ed Engl* **1999**, *38*, 977.
- [242] I. Pelletier, J. Altenbuchner, *Microbiology* **1995**, *141 (Pt 2)*, 459.
- [243] Y. V. Preobrazhenskaya, A. I. Voskoboev, V. N. Burd, *FEBS Lett* **2003**, *536*, 41.
- [244] I. Pelletier, J. Altenbuchner, R. Mattes, *Biochim Biophys Acta* **1995**, *1250*, 149.
- [245] D. B. Janssen, I. J. Dinkla, G. J. Poelarends, P. Terpstra, *Environ Microbiol* **2005**, *7*, 1868.
- [246] S. Keuning, D. B. Janssen, B. Witholt, *J Bacteriol* **1985**, *163*, 635.
- [247] P. J. Sallis, S. J. Armfield, A. T. Bull, D. J. Hardman, *J Gen Microbiol* **1990**, *136*, 115.
- [248] H. Curragh, O. Flynn, M. J. Larkin, T. M. Stafford, J. T. Hamilton, D. B. Harper, *Microbiology* **1994**, *140 (Pt 6)*, 1433.
- [249] A. J. Fretland, C. J. Omiecinski, *Chem Biol Interact* **2000**, *129*, 41.
- [250] J. Seidegard, J. W. DePierre, *Biochim Biophys Acta* **1983**, *695*, 251.
- [251] C. Leggewie, Ph.D. Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2005**.
- [252] J. P. Doran, P. Duggan, M. Masterson, P. D. Turner, C. O'Reilly, *Protein Expr Purif* **2005**, *40*, 190.
- [253] J. Y. Wang, D. X. Wang, J. Pan, Z. T. Huang, M. X. Wang, *J Org Chem* **2007**, *72*, 9391.
- [254] B. Hirrlinger, A. Stolz, *Appl Environ Microbiol* **1997**, *63*, 3390.
- [255] B. Hirrlinger, A. Stolz, H. J. Knackmuss, *J Bacteriol* **1996**, *178*, 3501.
- [256] M. T. Reetz, M. H. Becker, H.-W. Klein, D. Stöckigt, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1872.
- [257] M. T. Reetz, K. M. Kuhling, H. Hinrichs, A. Deege, *Chirality* **2000**, *12*, 479.
- [258] P. Tielmann, M. Boese, M. Luft, M. T. Reetz, *Chemistry* **2003**, *9*, 3882.
- [259] C. W. Bradshaw, W. Hummel, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532.
- [260] I. Bustos-Jaimes, T. Eggert, E. Bogo, M. Puls, A. Weckbecker, W. Hummel, K. E. Jaeger, *Manuskript eingreicht*.
- [261] M. G. van Oort, A. M. Deveer, R. Dijkman, M. L. Tjeenk, H. M. Verheij, G. H. de Haas, E. Wenzig, F. Gotz, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9278.
- [262] J. W. Simons, F. Gotz, M. R. Egmond, H. M. Verheij, *Chem Phys Lipids* **1998**, *93*, 27.
- [263] J. L. Arpigny, K. E. Jaeger, *Biochem J* **1999**, *343 Pt 1*, 177.
- [264] M. D. van Kampen, N. Dekker, M. R. Egmond, H. M. Verheij, *Biochemistry* **1998**, *37*, 3459.
- [265] A. Hjorth, F. Carriere, C. Cudrey, H. Woldike, E. Boel, D. M. Lawson, F. Ferrato, C. Cambillau, G. G. Dodson, L. Thim, et al., *Biochemistry* **1993**, *32*, 4702.
- [266] F. Carriere, K. Thirstrup, S. Hjorth, F. Ferrato, P. F. Nielsen, C. Withers-Martinez, C. Cambillau, E. Boel, L. Thim, R. Verger, *Biochemistry* **1997**, *36*, 239.
- [267] C. Withers-Martinez, F. Carriere, R. Verger, D. Bourgeois, C. Cambillau, *Structure* **1996**, *4*, 1363.
- [268] M. D. van Kampen, M. R. Egmond, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*, 717.
- [269] M. D. van Kampen, J. W. Simons, N. Dekker, M. R. Egmond, H. M. Verheij, *Chem Phys Lipids* **1998**, *93*, 39.
- [270] J. McFadden, G. Knowles, *J Theor Biol* **1997**, *186*, 441.
- [271] L. D. Bogarad, M. W. Deem, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 2591.

Literaturverzeichnis

- [272] H. S. Park, S. H. Nam, J. K. Lee, C. N. Yoon, B. Mannervik, S. J. Benkovic, H. S. Kim, *Science* **2006**, *311*, 535.
- [273] K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, K. E. Jaeger, *Chem Biol* **2000**, *7*, 709.
- [274] M. T. Reetz, S. Wilensek, D. Zha, K. E. Jaeger, *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*, 3589.
- [275] G. P. Horsman, A. M. Liu, E. Henke, U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Chemistry* **2003**, *9*, 1933.
- [276] O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nat Biotechnol* **2000**, *18*, 317.
- [277] D. Pal, P. Chakrabarti, *J Biomol Struct Dyn* **2001**, *19*, 115.
- [278] S. Hederos, L. Tegler, J. Carlsson, B. Persson, J. Viljanen, K. S. Broo, *Org Biomol Chem* **2006**, *4*, 90.
- [279] J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, I. Rayment, *Arch Biochem Biophys* **2005**, *433*, 59.
- [280] J. E. Vick, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2007**, *46*, 14589.
- [281] A. Aharoni, L. Gaidukov, O. Khersonsky, Q. G. S. Mc, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Nat Genet* **2005**, *37*, 73.
- [282] R. Bone, J. L. Silen, D. A. Agard, *Nature* **1989**, *339*, 191.
- [283] A. Aharoni, L. Gaidukov, S. Yagur, L. Toker, I. Silman, D. S. Tawfik, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 482.
- [284] N. Chacos, J. Capdevila, J. R. Falck, S. Manna, C. Martin-Wixtrom, S. S. Gill, B. D. Hammock, R. W. Estabrook, *Arch Biochem Biophys* **1983**, *223*, 639.
- [285] J. W. Newman, C. Morisseau, T. R. Harris, B. D. Hammock, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 1558.
- [286] M. A. Argiriadi, C. Morisseau, B. D. Hammock, D. W. Christianson, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 10637.
- [287] H. Zhao, *Biotechnol Bioeng* **2007**, *98*, 313.
- [288] Y. Wang, K. J. Address, J. Chen, L. Y. Geer, J. He, S. He, S. Lu, T. Madej, A. Marchler-Bauer, P. A. Thiessen, N. Zhang, S. H. Bryant, *Nucleic Acids Res* **2007**, *35*, D298.
- [289] E. Kuznetsova, M. Proudfoot, C. F. Gonzalez, G. Brown, M. V. Omelchenko, I. Borozan, L. Carmel, Y. I. Wolf, H. Mori, A. V. Savchenko, C. H. Arrowsmith, E. V. Koonin, A. M. Edwards, A. F. Yakunin, *J Biol Chem* **2006**, *281*, 36149.
- [290] U. T. Bornscheuer, C. Bessler, R. Srinivas, S. H. Krishna, *Trends Biotechnol* **2002**, *20*, 433.

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.

Eliane Bogo

Düsseldorf, den 16.01.2008