

Neue Zugänge
zu enantioselektiven lipolytischen Enzymen
durch fluoreszenzbasierte Durchmusterung
kombinatorischer Bibliotheken

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Stefan Becker
aus Eschwege

Göttingen 2007

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1170 „*Directed Evolution to Optimize and Understand Molecular Biocatalysts*“ gefördert.

D7

Referent: Prof. Dr. Harald Kolmar

Korreferent: PD Dr. Wilfried Kramer

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2007

*The woods are lovely, dark and deep,
but I have promises to keep,
and miles to go before I sleep.*

(Robert Frost)

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Einleitung und Zielsetzung</i>	1
1.1	Struktur, Funktion und biotechnologische Anwendung lipolytischer Enzyme	2
1.2	Enzym <i>Engineering</i>	8
1.3	Bakterielle Zelloberflächenpräsentation	13
1.4	ESCAPED	18
1.5	Zielsetzung	21
2.	<i>Material</i>	22
2.1	Bakterienstämme	22
2.2	Plasmide	22
2.2.1	pBBX+	22
2.2.2	pBBR1MCS	23
2.2.3	pEst100	24
2.2.4	pET22lipA	24
2.2.5	pVSlipA	25
2.2.6	pMac5-8FSP	26
2.2.7	pRep4	26
2.2.8	053870pPCR-Script	26
2.3	DNA-Längenstandards	27
2.4	Oligodesoxyribonukleotide	28
2.5	Enzyme und Proteine	29
2.6	Chemikalien	29
2.7	Sonstige Materialien und Geräte	30
2.8	Nährmedien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	34
2.9	Lösungen und Puffer	34
3.	<i>Methoden</i>	37
3.1	Handhabung von Bakterien	37
3.1.1	Lagerung von <i>Escherichia coli</i>	37

3.1.2	Vermehrung von <i>Escherichia coli</i> _____	37
3.1.3	Bestimmung der Zelldichte _____	37
3.1.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Elektroporation _____	37
3.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden _____	38
3.2.1	Vorbereitung von Geräten und Lösungen _____	38
3.2.2	Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen _____	39
3.2.2.1	Präzipitation von DNA mit Ethanol _____	39
3.2.2.2	Präzipitation von DNA mit Isopropanol _____	39
3.2.3	Reinigung von DNA in wässrigen Lösungen durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln _____	39
3.2.3.1	Präparation einer Phenollösung nach Grinsted und Bennett _____	39
3.2.3.2	Reinigung von DNA durch Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform oder Chloroform _____	40
3.2.4	Agarosegelelektrophorese _____	40
3.2.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen _____	40
3.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> _____	41
3.2.7	Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen _____	41
3.2.8	Separation von DNA-Fragmenten mittels Sucrosedichtegradientenzentrifugation _____	41
3.3	Enzymatische Manipulation von DNA _____	42
3.3.1	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen _____	42
3.3.2	Ligation von DNA-Fragmenten _____	42
3.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) _____	42
3.4	Proteinchemische Arbeitsmethoden _____	44
3.4.1	Oxidation und Reinigung von Meerrettich-Peroxidase _____	44
3.5	Enzymatische Aktivitätstests _____	45
3.5.1	Herstellung von Tributyrinagar _____	45
3.5.2	Esterolytische Aktivitätsbestimmungen _____	45
3.5.2.1	Bestimmung der esterolytischen Aktivität oberflächenpräsentierter lipolytischer Enzyme _____	46
3.5.2.2	Bestimmung der esterolytischen Aktivität in Kulturüberständen _____	47
3.5.2.3	Bestimmung der esterolytischen Aktivität von Zelllysaten _____	47

3.5.2.4	Bestimmung der Enantioselektivität oberflächenpräsentierter lipolytischer Enzyme	48
3.6	Zellbiologische Arbeitsmethoden	48
3.6.1	Induktion plasmidkodierter Genexpression in <i>Escherichia coli</i> Zellen	48
3.6.2	Immunfluoreszenzmarkierung von <i>Escherichia coli</i> Zellen	49
3.6.3	Fluoreszenzmarkierung von <i>Escherichia coli</i> Zellen mit Tyramidestern	49
3.6.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von markierten <i>Escherichia coli</i> Zellen	50
3.6.5	Durchflußzytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von <i>Escherichia coli</i> Zellen	50
3.6.6	Bestimmung der Überlebensraten Expressions-induzierter <i>Escherichia coli</i> Zellen	51
4.	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	52
4.1	Aufbau und Untersuchung eines allgemeinen Verfahrens zur Präsentation lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von <i>E. coli</i> Zellen	52
4.1.1	Konstruktion von Expressionsvektoren zur Präsentation verschiedener lipolytischer Enzyme auf <i>E. coli</i> Zellen	53
4.1.2	Untersuchung der funktionalen Expression der erzeugten EstA*-Fusionsproteine	55
4.1.3	Untersuchung der Oberflächenexposition der erzeugten EstA*-Fusionsproteine	56
4.1.4	Untersuchung der esterolytischen Aktivität der erzeugten EstA*-Fusionsproteine	58
4.1.5	Zusammenfassung und Diskussion zur Zelloberflächenpräsentation verschiedener lipolytischer Enzyme	60
4.2	Isolierung von Esterase Varianten mit veränderter Substratspezifität mittels <i>E. coli</i> Zelloberflächenpräsentation und substratspezifischer zwei-Farben Markierung	62
4.2.1	Zwei-Farben Markierung von <i>E. coli</i> Zellen mit unterschiedlich detektierbaren Tyramidestern	65
4.2.1.1	Entwicklung unterschiedlich detektierbarer Tyramidester	65
4.2.1.2	Spezifische zwei-Farben Markierung von <i>E. coli</i> Zellen mit unterschiedlich detektierbaren Tyramidestern	66

4.2.1.3	Differentielle zwei-Farben Markierung von <i>E. coli</i> Zellen durch Einsatz unterschiedlicher Substratverhältnisse	70
4.2.2	Aufbau eines Modellanreicherungs-experiments	72
4.2.2.1	Auswahl eines geeigneten Enzym-Substratpaares	73
4.2.2.2	Untersuchung der Enantioselektivität lipolytischer Enzyme auf der <i>E. coli</i> Zelloberfläche gegenüber den Enantiomeren der 2-Methyldekan-säure	74
4.2.2.3	Erzeugung von EstA Enzymbibliotheken	77
4.2.2.4	Charakterisierung der erzeugten EstA Enzymbibliotheken	81
4.2.3	Isolierung und Charakterisierung von <i>SynEstA</i> Varianten mit veränderter Enantioselektivität	84
4.2.3.1	Vorversuche zur zwei-Farben Markierung mit enantiomeren Tyramidestern	84
4.2.3.2	Durchmusterung der mit 0,3 mM MnCl ₂ erzeugten <i>SynEstA</i> Bibliothek	88
4.2.3.3	Durchmusterung der mit 0,75 mM MnCl ₂ erzeugten <i>SynEstA</i> Bibliothek	92
4.2.3.4	Charakterisierung isolierter Einzelklone	96
4.2.4	Erzeugung und Charakterisierung von <i>SynEstA</i> Varianten mit veränderter Enantioselektivität durch ortsspezifische Zufallsmutagenese	104
4.2.4.1	Erzeugung und Untersuchung einer <i>SynEstA</i> Bibliothek mit Randomisierung an Position 185	105
4.2.4.2	Charakterisierung von Einzelklonen	108
4.2.5	Zusammenfassung und Diskussion zur Isolierung von Esterase Varianten mit veränderter Enantioselektivität	116
4.3	Indirekte Zelloberflächenpräsentation der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lipase LipA	128
4.3.1	Nachweis der Oberflächenpräsentation der <i>P. aeruginosa</i> Foldase LipH	130
4.3.2	Nachweis der indirekten Präsentation der <i>P. aeruginosa</i> Lipase LipA	131
4.3.3	Untersuchungen zur Aktivierung von LipA durch oberflächenpräsentiertes LipH	132
4.3.4	Anwendungsbeispiel für die indirekte Präsentation von LipA	133
4.3.5	Ergebnisse und Diskussion zur indirekten Zelloberflächenpräsentation von LipA	135

5.	<i>Zusammenfassung</i>	137
6.	<i>Literatur</i>	138
6.1	Literaturverzeichnis	138
6.2	Im Rahmen dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen	156
7.	<i>Anhang</i>	157
7.1	Aminosäuresequenz der <i>P. aeruginosa</i> Esterase EstA	157
7.2	Nukleotidsequenz des synthetischen DNA-Fragments zur Erzeugung von EstA Enzymbibliotheken mit <i>E. coli</i> -eigener Kodonhäufigkeit (<i>SynEstA</i>)	158
7.3	Abkürzungsverzeichnis	159
7.4	Danksagung	161
7.5	Lebenslauf	163

1. Einleitung und Zielsetzung

Enzyme sind in der belebten Natur die Katalysatoren zur Erzeugung der komplexen Molekülvielfalt auf welcher biologisches Leben basiert. Man kann sie als „molekulare Werkzeuge“ betrachten, die mit hoher Effizienz und Spezifität eine Vielzahl von komplexen chemischen Reaktionen katalysieren. Es ist es deshalb nicht ungewöhnlich, daß das Interesse an einer industriellen Nutzung von Enzymen in den letzten Jahren explosionsartig angestiegen ist. Der Einsatz von Enzymen in chemischen Prozessen bündelt eine Vielzahl von Vorteilen: Neue Reaktionsmöglichkeiten, kostengünstigere Herstellungsprozesse, weniger Energieverbrauch und Schadstoffe. Enzyme befinden sich heute in Form von Lipasen und Proteasen in Waschmitteln oder katalysieren die Synthese von Feinchemikalien wie Acrylamid, das mit Hilfe einer Nitrilhydratase jährlich im 100.000 Tonnen Maßstab produziert wird.^[1] Sie können Teil des Produktionsprozesses sein oder selbst das Produkt. Die Entwicklung neuer Strategien zum Ausbau des industriellen Anwendungsspektrums von Enzymen bildet heute den Kern der sogenannten „Weißen Biotechnologie“.^[2]

Durch die Entwicklung neuer Methoden konnten in den letzten Jahren große Fortschritte bei der Identifizierung und Modifikation biotechnologisch relevanter Enzyme erzielt werden.^[3,4] Einen der erfolgreichsten Ansätze stellt dabei die sogenannte gerichtete Evolution dar. Dieses Verfahren nutzt die zufällige Mutagenese des Gens von einem Enzym mit biotechnologischem Potential, gefolgt von der Identifizierung und Isolierung von Varianten mit gewünschten Eigenschaften.^[5-7] Von besonderer Bedeutung ist dabei die Entwicklung effizienter Durchmusterungsverfahren, da die Anzahl erzeugter Varianten oftmals mehrere Millionen umfassen kann.^[8,9]

Eine der bedeutendsten Gruppen biotechnologisch relevanter Enzyme bilden die zur Familie der Hydrolasen gehörigen lipolytischen Enzyme. Die zugehörigen Lipasen und Esterasen finden durch ihre hohe Aktivität und Selektivität Verwendung in einer Vielzahl chemischer Prozesse, in denen sie neben der selektiven Hydrolyse, aufgrund ihrer Stabilität in organischen Lösungsmitteln, auch in der Synthese komplexer Verbindungen zum Einsatz kommen.^[10-12]

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Erprobung einer effizienten Methode zur Hochdurchsatz-Durchmusterung von Bibliotheken lipolytischer Enzyme auf veränderte Substratspezifität. Darüber hinaus wird ein Verfahren vorgestellt, das die funktionale Präsentation eines breiten Spektrums unterschiedlicher Proteine auf der Oberfläche von Bakterienzellen ermöglicht. Diese Form der rekombinanten Produktion gestattet durch die Immobilisierung betreffender Proteine außerhalb der Zelle eine vereinfachte Funktionsabfrage und vermittelt eine effektive Genotyp-Phänotyp-Kopplung.

In dem folgenden Abschnitt wird zunächst auf die Struktur, Funktion und biotechnologische Anwendung lipolytischer Enzyme eingegangen. Abschnitt 1.2 befasst sich anhand von Beispielen mit Fokus auf lipolytischen Enzymen mit Methoden des rationalen und evolutiven Enzym *Designs*. Einen Überblick zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung durch

bakterielle Zelloberflächenpräsentation gewährt Abschnitt 1.3. Ein bereits bestehendes Verfahren zur spezifischen kovalenten Markierung und Isolierung Esterase präsentierender Zellen, auf dem diese Arbeit maßgeblich beruht, wird in Abschnitt 1.4 vorgestellt. Der letzte Abschnitt der Einleitung fasst schließlich noch einmal die Ziele dieser Arbeit zusammen.

1.1 Struktur, Funktion und biotechnologische Anwendung lipolytischer Enzyme

Unter dem Begriff lipolytische Enzyme werden Lipasen und Esterasen zusammengefasst. Sie gehören wie die Proteasen zur Familie der Hydrolasen, was bedeutet, daß sie in der Lage sind die Hydrolyse eines bestimmten chemischen Bindungstyps zu katalysieren. Im Falle der lipolytischen Enzyme ist dies die Carboxylesterbindung, die unter Verbrauch von Wasser in ihre Komponenten Carbonsäure und Ester gespalten wird. Dieser Prozess ist reversibel und führt in wasserfreien Systemen zur Ausbildung (Esterifikation) einer Carboxylesterbindung (Abb.1.1).

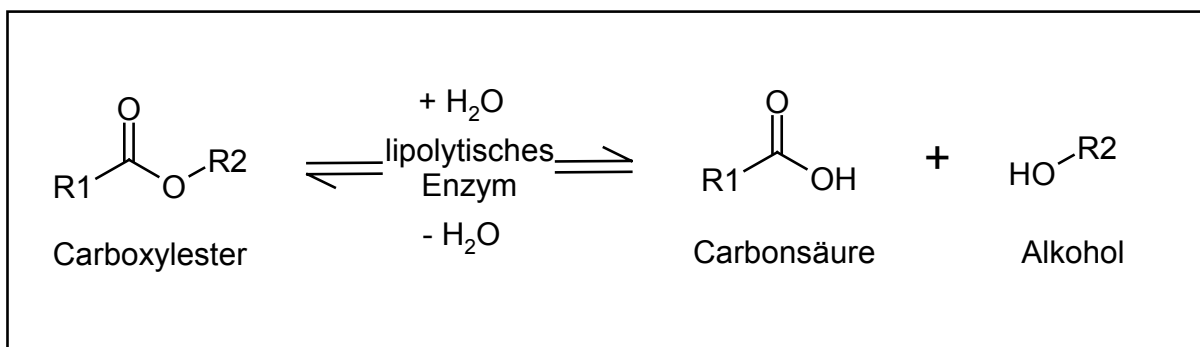


Abb. 1.1: Reversible Hydrolyse eines Carboxylesters durch ein lipolytisches Enzym.

Lipolytische Enzyme werden als zelluläre und extrazelluläre Enzyme in vielen Organismen gebildet und sind essentielle Bestandteile des Fettstoffwechsels.^[13] Ihre natürlichen Substrate sind in der Regel Triacylglyceride in Form von Lipiden (Fette, Öle), die neben den Kohlenhydraten zu den wichtigsten Speicherstoffen in der Natur zählen.

Man unterscheidet Esterasen (EC 3.1.1.1) und Lipasen (EC 3.1.1.3) anhand ihres Substratspektrums. Letztere sind in der Lage, auch langkettige Substrate mit einer Acylkettenlänge von > 9 Kohlenstoffatomen zu hydrolysieren.^[14,15] Eine Besonderheit der Lipasen bildet außerdem der als „Interphasenaktivierung“ bekannte Effekt. Dieser beschreibt die drastische Aktivitätssteigerung einer Lipase bei Überschreitung der kritischen Micellarkonzentration des Substrats.^[16] Erste Hinweise zur Erklärung dieses Phänomens lieferten die Röntgenkristallstrukturen der Lipase aus *Rhizomucor miehei* und der humanen Pankreaslipase. Beide zeigten eine amphiphile Peptidkette, die das aktive Zentrum der Enzyme wie eine Art „Deckel“ verschließt.^[17,18] Eine Reorientierung dieser „Deckel“-Struktur bei Kontakt mit einer Lipid-Wasser-Grenzschicht konnte schließlich als Erklärung der Interphasenaktivierung durch die Strukturanalyse beider Enzyme mit gebundenem

Inhibitor bestätigt werden.^[19-21] Es besitzen jedoch nicht alle Lipasen derartige „Deckel-domänen“. Beispiele dafür sind die Lipasen aus *Bacillus subtilis*, die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* und die Pankreaslipase des Meerschweinchens.^[22-27] Andere, wie die Lipasen aus *Pseudomonas aeruginosa* und *P. glumae*, Lipase B aus *Candida antarctica* oder die Pankreaslipase der Biberratte *Myocastor coypus* besitzen zwar „Deckeldomänen“, zeigen jedoch keine Interphasenaktivierung.^[15,28-31] Eine Besonderheit ist zudem die Substrat-abhängige Interphasenaktivierung, wie sie für die Lipase aus *Staphylococcus hyicus* beschrieben wurde.^[32]

Allen lipolytischen Enzymen gemeinsam ist der funktionelle Aufbau des aktiven Zentrums in Form einer katalytischen Triade, bestehend aus einem nukleophilen Serinrest, einer sauren Aminosäure (Aspartat oder Glutamat) und einem Histidinrest.^[33] Diese katalytische Triade befindet sich innerhalb eines konservierten Faltungsprinzips, dem sogenannte „ α/β -Hydrolasemotiv“, welches aus einem zentralen, weitgehend parallelen β -Faltblatt aus 8 β -Strängen besteht. Lediglich der zweite β -Strang ist antiparallel orientiert. Die parallelen β -Stränge 3 bis 8 sind dabei über flankierende α -Helices miteinander verbunden. Die Reste der katalytischen Triade befinden sich dabei zwischen β -Strang 5 und α -Helix C (Serin), zwischen β -Strang 7 und α -Helix E (Aspartat oder Glutamat) und zwischen β -Strang 8 und α -Helix F (Abb. 1.2).^[34]

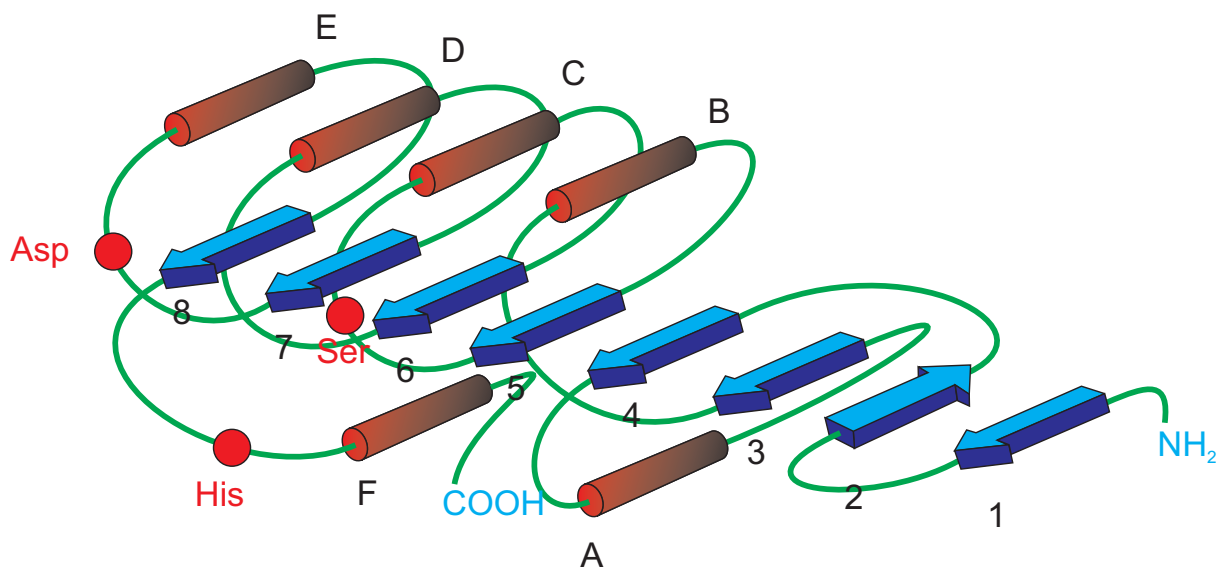


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des α/β -Hydrolasemotivs. β -Faltblätter (1-8) sind als blaue Pfeile, α -Helices (A-F) als rote Zylinder dargestellt. Die Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triade sind als rote Kreise angezeigt (Abbildung modifiziert nach [35]).

Das α/β -Hydrolasemotiv konnte als „Grundgerüst“ mittlerweile bei einer Vielzahl unterschiedlicher hydrolytischer Enzyme gefunden werden.^[36] Dazu gehören die Serincarboxypeptidase der Weizenkleie,^[37] die Haloalkan-Dehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus*,^[38] die Epoxid-Hydrolase aus *Aspergillus niger*,^[39] die Dienlactonhydrolase aus *Pseudomonas sp.* B13^[40] und die Acetylcholinesterase des Zitterrochen.^[41] Ein weiteres Charakteristikum lipolytischer Enzyme ist das hoch konservierte Gly-X-Ser-X-Gly Pentapeptid, in dem der katalytisch aktive Serinrest lokalisiert ist. Dieses Konsensusmotiv

bildet einen scharfen „ γ -turn“ zwischen dem β -Faltblatt 5 und der nachfolgenden α -Helix C aus. Dieses auch als „nukleophiler Ellenbogen“ bezeichnete Motiv aus β -Faltblatt, Nukleophil und α -Helix positioniert durch die ungünstigen ϕ - und φ -Torsionswinkel des Peptidrückgrats das nukleophile Serin in eine exponierte Lage im katalytischen Zentrum.^[34]

Der Mechanismus der Substrathydrolyse läuft in zwei Schritten ab: Der nukleophile Serinrest wird durch die Übertragung eines Protons auf den benachbarten Histidinrest aktiviert und kann somit das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats nukleophil angreifen. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines transienten tetraedrischen Übergangszustands, bei dem das negativ geladene Sauerstoffatom der Carbonylfunktion durch Wasserstoffbrücken mit zwei benachbarten NH-Gruppen des Peptid-Rückgrats stabilisiert wird. Letztere befinden sich im sogenannten „*Oxyanion hole*“ des Enzyms, direkt hinter dem aktiven Serinrest und am Ende des β -Faltblatts 3.^[42-44] Eine Übertragung des Protons vom katalytischen Histidinrest auf das Ester-Sauerstoffatom führt dann zur Freisetzung der Alkoholkomponente des Substrats und zu einem Acyl-Enzym-Intermediat, bei dem die Carbonsäurekomponente mit dem nukleophilen Serinrest des Enzyms kovalent verestert ist. Im zweiten Schritt der Hydrolyse erfolgt die Deacetylierung des Serinrests durch den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls auf das Intermediat. Das Wassermolekül wird dabei durch die Abgabe eines Protons an den katalytischen Histidinrest aktiviert. Das daraus resultierende OH⁻-Ion kann das Carbonyl-Kohlenstoffatom der kovalent an das Serin gebundenen Acylgruppe nukleophil angreifen, wodurch es erneut zur Ausbildung eines transienten tetraedrischen, negativ geladenen Übergangszustands kommt, welcher wiederum durch Interaktionen mit benachbarten NH-Gruppen stabilisiert wird. Abschließend erfolgt eine Übertragung des Protons vom katalytischen Histidinrest auf das Sauerstoffatom des aktiven Serinrests, wodurch die Acylkomponente als Carbonsäure freigesetzt wird. Der Aspartat- bzw. Glutamatrest der katalytischen Triade dient bei der kompletten Hydrolysereaktion der richtigen Ausrichtung des Imidazolrings des katalytischen Histidins (Abb. 1.3).^[45-49]

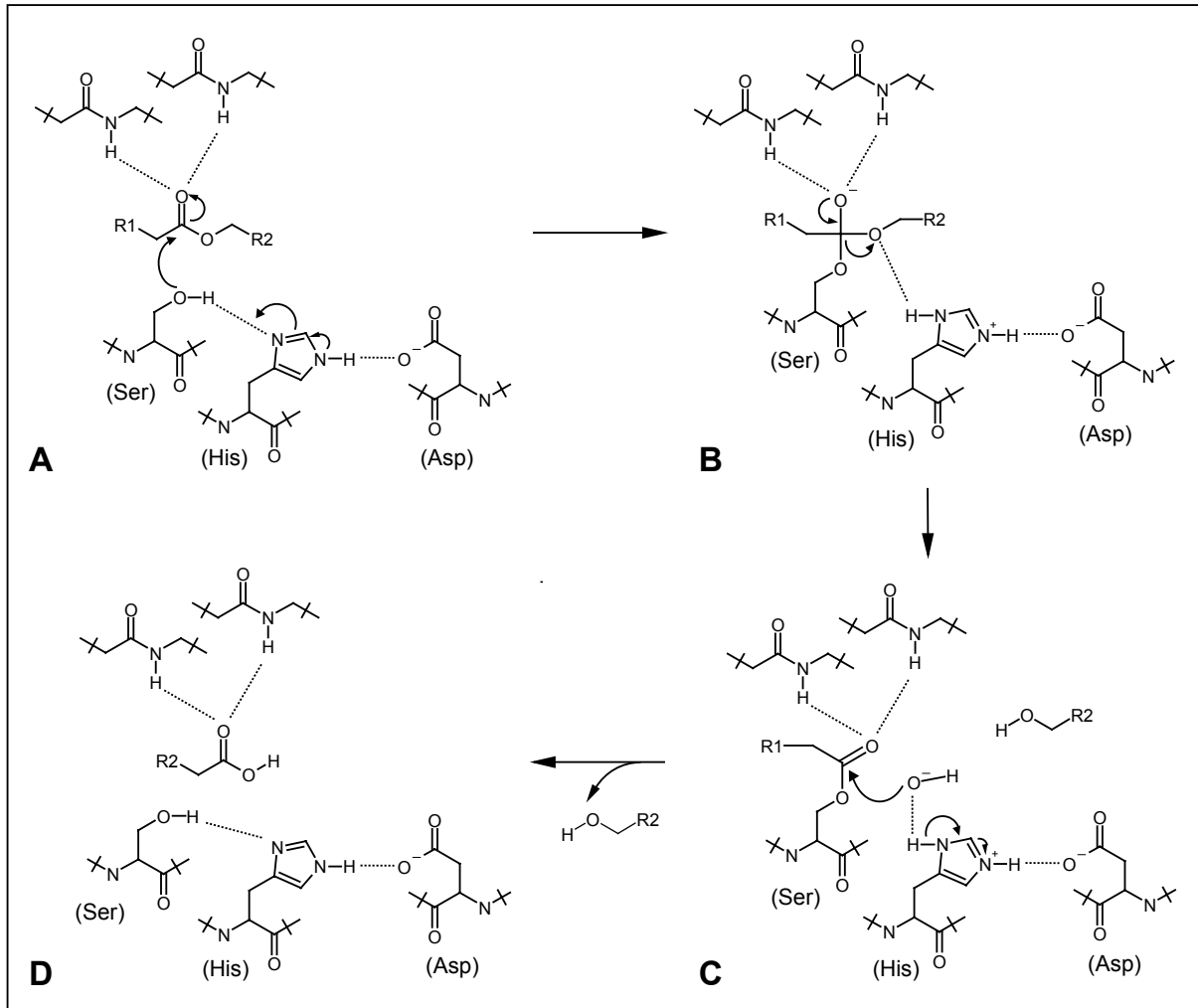


Abb. 1.3: Reaktionsmechanismus lipolytischer Enzyme. Schematische Darstellung der katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin (Ser) Aspartat (Asp) und Histidin (His) sowie der zur Stabilisierung des Übergangszustand wichtigen NH-Gruppen des Peptid-Rückgrats. **A:** Nukleophiler Angriff durch den Serinrest. **B:** Tetraedrisches Intermediat. Das negativ geladene Carbonyl-Sauerstoffatom wird durch die zwei benachbarten NH-Gruppen stabilisiert. Der Histidinrest gibt ein Proton an den austretenden Alkohol ab. **C:** Ein Wassermolekül wird durch den Histidinrest aktiviert. Das dabei entstehende OH⁻-Ion greift das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Esterintermediats nukleophil an. **D:** Der Histidinrest gibt ein Proton an den aktiven Serinrest ab. Die Carbonsäurekomponente wird frei (Abbildung modifiziert nach [50]).

Die biotechnologische Nutzung lipolytischer Enzyme ist mittlerweile zu einem Milliardengeschäft geworden und umfasst viele unterschiedliche Anwendungen. Allein im Bereich der Detergenzien werden jedes Jahr mehr als 1000 Tonnen Lipasen produziert.^[51] Lipolytische Enzyme spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Produktion von Lebensmitteln.^[52] Ein Beispiel dafür ist die Transesterifikation von Palmöl, welches hauptsächlich aus 1,3-Dipalmitoyl-2-Oleoylglycerin besteht, mit Stearinsäure. Die durch die Lipase aus *Rhizomucor miehei* katalysierte Reaktion liefert ein 1,3-Distearoyl-2-Oleoylglycerin, das einen idealen Schmelzpunkt für die Verwendung als Fett in Schokolade aufweist.^[53] Ein weiterer Prozess von großem wirtschaftlichen Interesse besteht in der Hydrolyse von Fetten und Ölen. Das nicht-enzymatische Verfahren benötigt Drücke von ca. 50 atm und Temperaturen von mehr als 250 °C über mehrere Stunden. Lipase-katalysierte

Reaktionen können dagegen bei normalem Druck am Temperaturoptimum des Enzyms durchgeführt werden.^[54]

Abgesehen davon wächst die Bedeutung lipolytischer Enzyme aufgrund ihrer hohen Selektivität und katalytischen Aktivität in der synthetischen organischen Chemie stetig an.^[10] Ihre Fähigkeit, im wässrigen Medium unter milden Reaktionsbedingungen (Druck, Temperatur, pH) aktiv zu sein reduziert Produktionskosten und anfallende Schadstoffe, da auf organische Lösungsmittel als Reaktionsmedien oftmals verzichtet werden kann.^[55-59] Ein wichtiges Beispiel ist die Nutzung von Carboxylesterasen bei der Freisetzung von Ferulasäure aus Polysacchariden pflanzlicher Zellwände wie Pektin oder Xylan. Ferulasäure ist ein Ausgangsstoff zur Synthese von Vanillin.^[60-62] Feruloyl-esterasen konnten mittlerweile aus einem breiten Spektrum von Mikroorganismen isoliert werden.^[63-67] Von ebenfalls großer biotechnologischer Bedeutung ist die milde enzymatische Entfernung von Schutzgruppen. So wird die p-Nitrobenzylesterase aus *Bacillus subtilis* zur spezifischen Entfernung der p-Nitrobenzyl-Schutzgruppe von dem Antibiotikum Loracarbef verwendet.^[68]

Neben der Anwendung lipolytischer Enzyme als Katalysatoren regioselektiver Hydrolysen oder Esterifikationen hat die Lipase-katalysierte kinetische Spaltung racemischer Gemische zur Produktion optisch reiner Verbindungen in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen.^[56,57,69-72] Durch die Produktion enantiomerenreiner Wirkstoffe können Zell-Rezeptoren und Stoffwechsellzyme, die meist selbst eine chirale Struktur aufweisen, gezielt adressiert und potentielle schädliche Nebenwirkungen eines anderen Enantiomers vermieden werden. In diesem Zusammenhang sei an die Substanz Thalidomid erinnert, die als Wirkstoffkomponente im Sedativum Contergan[®] enthalten war. Während das (*S*)-Enantiomer dieser Substanz die gewünschte physiologische Wirkung vermittelte, zeigte das (*R*)-Enantiomer als unerwünschte Nebenwirkung stark teratogene Eigenschaften.^[73] Ein Beispiel für die Applikation eines lipolytischen Enzyms zur Produktion optisch reiner Substanzen findet sich bei der Synthese von Diltiazem, einem Standard-Pharmazeutikum zur Behandlung von Bluthochdruck. Ein entscheidender Schritt ist dabei die kinetische Spaltung einer racemischen Mischung eines chiralen Epoxyesters. Dies geschieht durch die Verwendung einer bakteriellen Lipase aus *Serratia marcescens*, welche spezifisch die Hydrolyse des (*2S*, *3R*)-Enantiomers des Methyl-p-methoxyphenylglycidats katalysiert. Dieses läßt sich dadurch leicht von dem erwünschten (*2R*, *3S*)-Enantiomer abtrennen, was als Edukt für die weitere Synthese eingesetzt wird (Abb. 1.4).^[74] Mehr als 50 Tonnen Diltiazem werden jährlich durch dieses Verfahren produziert.^[50]

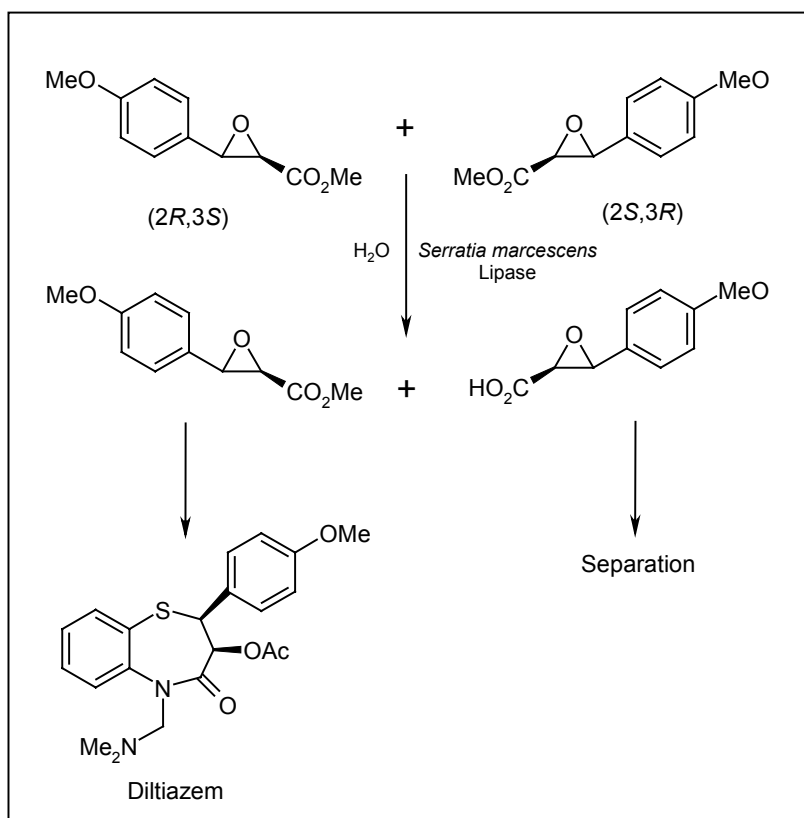


Abb. 1.4: Kinetische Racematspaltung von Methyl-p-methoxyphenylglycidat durch die Lipase aus *Serratia marcescens* für die Synthese von Diltiazem. Das Enzym katalysiert spezifisch die Hydrolyse des 2*S*, 3*R*-Enantiomers. Dieses läßt sich dadurch leicht von dem erwünschten 2*R*, 3*S*-Enantiomer abtrennen (Abbildung modifiziert nach [50]).

Ein weiteres Beispiel eines lipolytischen Enzyms im industriellen Einsatz zur Racematspaltung ist die Carboxylesterase NP. NP steht in diesem Fall für Naproxen, ein nicht-steroidales Antiphlogistikum, das mit Hilfe dieses Enzyms aus *Bacillus subtilis* synthetisiert wird. Die Hydrolyse des Edukts (*R,S*)-Naproxen-Methylester erfolgt dafür in Gegenwart von Tween 80 zur Erhöhung der Substratlöslichkeit. Die (*S*)-Säure wird dann vom verbleibenden (*R*)-Methylester separiert, welcher durch Umsatz mit einer organischen Base wieder racemisiert wird. Dieses Verfahren produziert (*S*)-Naproxen in exzellenter optischer Reinheit (99 % Enantiomerenüberschuss (*ee*)) mit einer Gesamtausbeute von 95 %.^[75] Abgesehen von Naproxen können jedoch noch diverse andere 2-Arylpropionsäuren durch die Carboxylesterase NP mit hoher Enantioselektivität produziert werden.^[76,77] Auch bei der Produktion von Ibuprofen, einem weiteren nicht-steroidalen Antiphlogistikum wird ein lipolytisches Enzym zur Produktion der enantiomerenreinen Substanz verwendet. Der selektive Umsatz des Edukts, bei dem es sich wieder um einen (*R,S*)-Methylester handelt, geschieht hierbei durch die Lipase aus *Candida rugosa*.^[78] Ein weiteres Beispiel ist die kinetische Resolution bei der Synthese von (+)-*trans*-(1*R*,3*R*)-Chrysanthemumsäure, einem wichtigen Vorläufer der Pyrethrin-Insektizide. Hierbei katalysiert eine Esterase aus *Arthobacter globiformis* die stereoselektive Produktion des gewünschten Enantiomers mit >99 % *ee* bei 77 % Umsatz.^[79] Die Hydrolyse wird dazu bei pH 9,5 und 50°C durchgeführt und die produzierte Säure über eine Hohlfasermembran separiert. Die Esterase bleibt dabei über vier Zyklen von je 48 Stunden stabil.^[80]

Trotz der zahlreichen Vorteile, welche die Verwendung lipolytischer Enzyme in der organischen Synthese mit sich bringt, sind nicht alle Reaktionen für enzymatische Katalysen zugänglich. Limitierende Faktoren sind oftmals mangelnde Stabilität unter den gegebenen Reaktionsbedingungen, begrenzte Substratspektren, Beschränkung auf wässrige Systeme oder Substrat- bzw. Produktinhibition.^[81-83] Die Alternative zur permanenten Durchmusterung natürlicher Habitate nach vorhandenen Enzymen mit gewünschten Eigenschaften^[84-86] ist die Adaption bereits charakterisierter Enzyme an eine betreffende Reaktion. Diese unter dem Begriff „Enzym *Engineering*“ bekannte Herangehensweise ist Gegenstand des nächsten Abschnitts.

1.2 *Enzym Engineering*

Der Begriff „Enzym *Engineering*“ beinhaltet verschiedene Verfahren zur gezielten Adaption von Enzymen an vorgegebene Ansprüche um sie einer biotechnologischen Verwendung als Katalysatoren industriell relevanter Prozesse zugänglich zu machen.^[87-89] Es läßt sich dabei konzeptionell zwischen rationalem und evolutivem Enzym *Engineering* unterscheiden.^[90-93]

Die auch als „rationales *Design*“ bezeichnete Strategie nutzt zur Erzeugung von Varianten mit gewünschten Eigenschaften bereits vorhandene Kenntnisse über Struktur und Reaktionsmechanismen eines Enzyms, um mit Hilfe computergestützter Modelle Prognosen über die Art der einzuführenden Veränderungen zu treffen. Diese müssen dann durch gezielte Mutagenese und biochemische Charakterisierung experimentell überprüft werden.^[94,95] Eines der ersten Beispiele für die erfolgreiche experimentelle Verifizierung einer computergestützten Vorhersage ist die Erhöhung der Substratspezifität der Serin-Protease Trypsin durch den Austausch einer einzigen Aminosäure.^[96] Im Falle der Protease Subtilisin E aus *Bacillus subtilis* konnten zudem durch eine prognostizierte Veränderung der Oberflächenladung Substratspezifität und katalytische Aktivität verändert werden.^[97] Bei anderen Beispielen konnten durch vorhergesagte Austausche auch gänzliche neue enzymatische Aktivitäten in bestehende Proteine eingebracht werden. So führte z. B. der strukturbasierte Entwurf einer katalytischen Triade bei einem Cyklophilin aus *E. coli* zu einer Prolin-spezifischen Endoproteaseaktivität.^[98] Auch „Reprogrammierungen“ von vorhandenen katalytischen Mechanismen durch rationales *Design* sind mittlerweile beschrieben. So konnte beispielsweise die humane Glutathion-Transferase A2-2 in eine effiziente Steroid-Isomerase umgewandelt werden.^[99] Der Lipase B aus *Candida antarctica* konnte eine Aldolase-Aktivität „beigebracht“ werden, die in organischen Lösungsmitteln Aldoladditionsreaktionen möglich machte.^[100] Auch für Modifikationen an Stereoselektivitäten sind bereits erfolgreiche rationale Ansätze beschrieben worden. CHEN-GOODSPEED und Mitarbeiter konnten durch gezielte Modifikationen an der Substratbindetasche die Enantioselektivität einer Phosphotriesterase erfolgreich invertieren.^[101] Modifikationen der Enantioselektivität durch rationales *Design* wurden auch bei lipolytischen Enzymen bereits durchgeführt: Bei der Lipase aus *Candida rugosa* konnten so Varianten erzeugt werden, deren natürliche Selektivität in einem

Falle verdoppelt, in einem anderen gänzlich aufgehoben war.^[102] Eine Modifikation der Enantioselektivität durch rationales *Design* ist zudem auch für die *Rhizopus oryzae* Lipase beschrieben.^[103] Das hohe Maß an strukturellen und mechanistischen Kenntnissen, das für ein rationales *Design* eines bestimmten Enzyms notwendig ist, limitiert diese Strategie jedoch auf eine überschaubare Anzahl an Kandidaten.^[104-106]

Eine andere Strategie zur Erzeugung von Enzymvarianten mit gewünschten Eigenschaften bildet das sogenannte „evolutive *Engineering*“.^[107] Hierbei sind im Gegensatz zum rationalen *Design* keine Vorkenntnisse über Struktur und Reaktionsmechanismus des zu optimierenden Enzyms notwendig. Wie bei der natürlichen Evolution basiert das auch als „gerichtete Evolution“ bekannte Verfahren auf der zufälligen Erzeugung einer möglichst großen Anzahl an Varianten, einer sogenannten Bibliothek, die dann auf die gewünschte Funktion hin durchmustert wird. Eine isolierte Variante kann dann als Matrize für weitere Mutagenese- und Selektionsrunden verwendet werden, bis die gesuchte Eigenschaft in gewünschtem Maße ausgeprägt ist.^[91,108-112] Eine schematische Darstellung des Verfahrens ist in Abbildung 1.5 gezeigt.

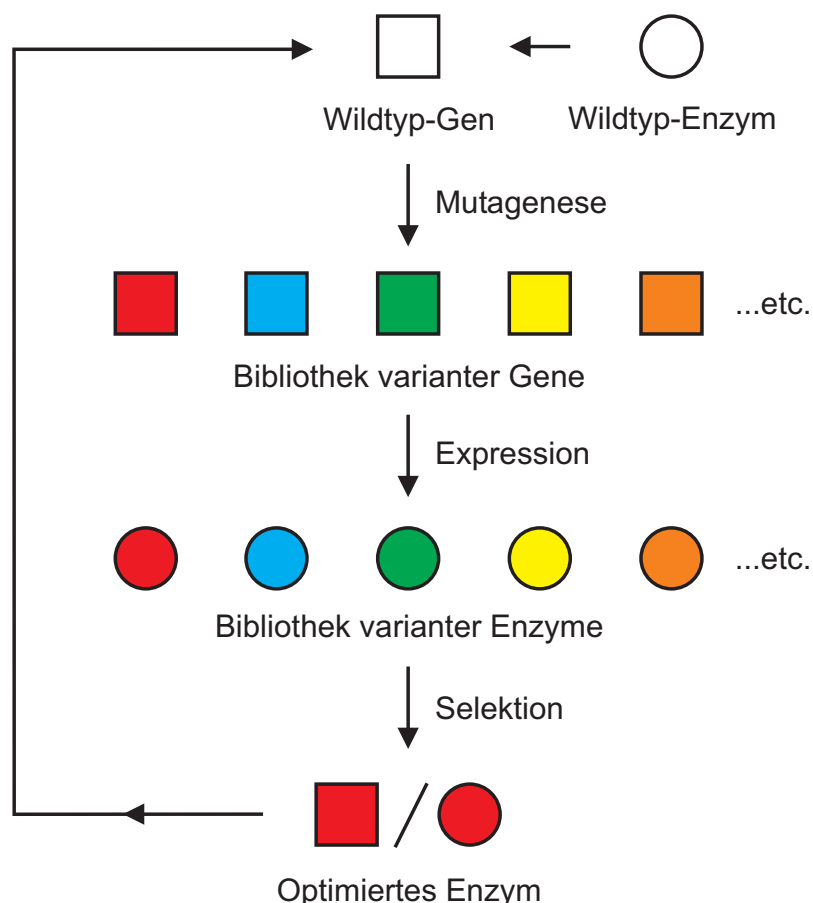


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des „directed evolution“-Zyklus. Von einem Kandidatenenzym wird das Gen identifiziert und isoliert. Durch Mutagenese-Methoden erfolgt die Erzeugung einer Bibliothek varianter Gene. Nach Produktion der varianten Enzyme in einem passenden Wirt erfolgt die Identifizierung von Varianten gewünschter Eigenschaften. Diese werden als Matrize für eine weitere Runde gerichteter Evolution verwendet (Abbildung modifiziert nach [110]).

Mit dieser Strategie ist es zumindest theoretisch möglich, den natürlichen Evolutionsprozess im Labormaßstab zu imitieren und durch entsprechende selektive „Drücke“ Varianten jeglicher gewünschter Eigenschaft zu generieren. Erstmals vorgestellt wurde das Prinzip der gerichteten Evolution von MILLS und Kollegen anhand selbstreplizierender RNA-Moleküle.^[113] ROBERTS und Mitarbeiter nutzten das Verfahren dann erstmals zur Isolierung eines Proteins mit adaptierten Eigenschaften.^[114] Heute existieren zahllose Beispiele für erfolgreiche Anwendungen der gerichteten Evolution. Bei den am häufigsten optimierten Eigenschaften handelt es sich aus Gründen der biotechnologischen Applizierbarkeit um Substratspezifität und Thermo- bzw. Lösungsmittelstabilität.^[106,115,116]

Eines der ersten Beispiele für die Erzeugung und Isolierung eines Enzyms mit optimierten Eigenschaften durch gerichtete Evolution ist somit auch die Identifizierung einer Variante der Protease Subtilisin E mit erhöhter Stabilität in organischen Lösungsmitteln.^[117,118] Optimierte Lösungsmittelstabilität mittels gerichteter Evolution ist auch für die Phospholipase A(1) aus *Serratia sp.*^[119] und die p-Nitrobenzylesterase aus *Bacillus subtilis* beschrieben worden.^[120,121] Bei letzterem Enzym konnte in einem anderen Ansatz außerdem die Thermostabilität mittels gerichteter Evolution um mehr als 14°C erhöht werden, ohne daß im Vergleich zum Wildtyp messbare Aktivitätseinbußen zu verzeichnen waren.^[122]

Für die Optimierung von Thermostabilität sind außerdem zahlreiche weitere Beispiele beschrieben. Bei der Protease Subtilisin E konnte durch fünf evolutive Selektionsrunden eine Variante isoliert werden, deren Temperaturoptimum mit 76°C identisch war zu dem der homologen Protease aus *Thermoactinomyces vulgaris*.^[123] KIM und Mitarbeiter konnten eine Variante der *Thermus sp.* Amylase mit einem um 15°C erhöhten Temperaturoptimum isolieren.^[124] Thermostabilitätsoptimierungen mittels gerichteter Evolution sind außerdem beschrieben für die Phospholipase A(1) aus *Serratia sp.*,^[125] die Cytochrom P450 Peroxygenase^[126] und die Lipase B aus *Candida antarctica*.^[127]

Auch für Modifikationen von Substratspezifitäten mittels gerichteter Evolution gibt es mittlerweile zahlreiche Beispiele: ZHANG und Mitarbeiter konnten so die β -Galactosidase aus *E. coli* zu einer β -Fucosidase umwandeln.^[128] TAKATO und Mitarbeiter isolierten nach nur fünf Mutagenese- und Selektionsrunden eine Variante einer Aspartat-Aminotransferase mit einer um den Faktor 10^5 erhöhten Aktivität gegenüber β -verzweigten und 2-Oxo-Aminosäuren.^[129] Eine Modifikation der Aktivität gegenüber nicht-natürlichen Substraten mittels gerichteter Evolution ist ebenfalls für die Cytochrom C Peroxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Isolierte Varianten zeigten eine 20-fach erhöhte Aktivität gegenüber ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)).^[130] OTTEN und Mitarbeiter nutzten einen evolutiven Ansatz zur Modifikation der Substratspezifität der Cephalosporin Acylase aus *Pseudomonas SY-77*.^[131] REETZ und Mitarbeiter konnten indes durch eine Mischung aus strukturbasiertem *Design* und gerichteter Evolution Varianten der *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Lipase isolieren, die signifikant erhöhte Aktivitäten gegenüber einer Reihe sterisch anspruchsvoller Substrate zeigten.^[132] Weitere Beispiele für Enzyme, deren Substratspezifität erfolgreich durch gerichtete Evolution verändert werden

konnte sind die Thymidin-Kinase des *Herpes simplex* Virus Typ 1 (HSV1)^[133] und die β -Lactamase aus *E. coli*.^[134]

Eine spezielle und besonders häufig beschriebene Form der Modifikation von Substratspezifitäten durch gerichtete Evolution findet sich bei der Optimierung von Enantioselektivitäten, was vermutlich auf die steigende Nachfrage für optisch reine Verbindungen zurückzuführen ist.^[71,109] In den letzten Jahren wurden zahlreiche verschiedene Enzyme hinsichtlich dieser Eigenschaft evolviert. Dazu gehören Aldolasen,^[135-137] Amin-Oxidasen,^[138] Transaminasen,^[139] Cyclohexanon-Monooxygenasen,^[140] Epoxid-Hydro-lasen,^[141,142] Hydantoinasen^[143] und Nirilasen.^[144]

Ein besonderer Focus liegt dabei auf Lipasen und Esterasen, da sie unabhängig von Kofaktoren ein breites Spektrum an Substraten akzeptieren und dabei oftmals *per se* hohe Enantioselektivitäten aufweisen.^[10,52,58,145] Ein Beispiel dafür ist die Optimierung der Enantioselektivität der *Pseudomonas fluorescens* Esterase (PFE). In einer Runde gerichteter Evolution konnte die Enantioselektivität gegenüber den enantiomeren Estern der 3-Phenylbutansäure von $E = 3,5$ auf 5,2-6,6 erhöht werden.^[146] REETZ und Mitarbeiter konnten in vier Runden gerichteter Evolution die Enantioselektivität der *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Lipase gegenüber p-Nitrophenylestern der 2-Methyldekansäure von $E = 1,1$ für das (S)-Enantiomer auf $E_S = 11,3$ erhöhen. Durchmustert wurden dafür insgesamt ca. 8000 Klone aus Bibliotheken von ca. zwei Aminosäuresubstitutionen pro Variante.^[147] Dieser Wert konnte durch gesättigte Mutagenese an den Positionen der Aminosäureaustausche der identifizierten Variante weiter auf $E_S = 25,8$ erhöht werden.^[148] In einem folgenden Durchmusterungsexperiment mit einer Bibliothek höherer Fehlerraten (ca. 3 Substitutionen pro Variante) konnten unter 15.000 analysierten Klonen erneut einige Varianten mit erhöhter Präferenz für das (S)-Enantiomer identifiziert werden. Eine genetische Kombination zweier dieser Varianten ($E_S = 3$ & $E_S = 7$) mit der bis *dato* besten Variante ($E_S = 25,8$) mittels DNA-*shuffling*^[149] führte zu einer weiteren Erhöhung des E_S -Werts auf 32. Eine genauere Analyse der Wirkungen der verschiedenen Aminosäureaustausche unterschiedlicher Varianten mittels kombinierter multipler Kassettenmutagenese (CMCM)^[150] brachte letztlich von ca. 5000 analysierten Klonen eine Variante mit einem E_S -Wert von >51 hervor.^[151]

Auch Inversionen der Enantioselektivität sind anhand der *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Lipase und den p-Nitrophenylestern der 2-Methyldekansäure durch REETZ und Mitarbeiter beschrieben. Von 15.000 durchmusterten Klonen einer Bibliothek mit durchschnittlich 2-3 Substitutionen pro Enzym konnten zwei Varianten mit invertierter Enantioselektivität ($E_R = 1,1$ & $E_R = 2,1$) identifiziert werden. Weitere Runden gerichteter Evolution mittels Zufallsmutagenese und DNA-*shuffling* führten letztlich zur Isolierung einer Variante mit $E_R = 30$.^[152] Ein weiteres erfolgreiches Beispiel für die Inversion einer natürlichen Enantioselektivität wurde durch KOGA und Mitarbeiter beschrieben. Die Lipase aus *Burkholderia cepacia* zeigt eine verhältnismäßig hohe Selektivität für das (S)-Enantiomer des 3-Phenylbutyrats ($E_S = 33$). Durch die Struktur-basierte Mutagenese von 4 Aminosäuren in der hydrophoben Substratbindetasche und eine anschließende Durchmusterung von ca. 12.000 Klonen konnten letztlich zwei Varianten mit invertierter Enantioselektivität ($E_R = 33$

& $E_R = 38$) identifiziert werden.^[153] IVANCIC und Mitarbeiter konnten zudem eine Variante der Esterase EstB aus *Burkholderia gladioli* mit veränderter Enantioselektivität isolieren: Die Durchmusterung von ca. 75.000 Varianten mit bis zu 4 Aminosäureaustauschen pro Enzym brachte 3 Varianten mit erniedrigter Enantioselektivität für das (S)-Enantiomer des Modells substrats Methyl- β -hydroxyisobutyrat hervor. Alle Varianten hatten einen Aminosäureaustausch an einer gemeinsamen Position. Eine Sättigungsmutagenese an dieser Position führte zur Identifizierung einer Variante mit invertierter Enantioselektivität und einem E_R -Wert von 1,5. Auf Basis dieser Variante konnte durch strukturbasierte Mutagenese von 19 Aminosäuren in der Umgebung des katalytischen Serins, gefolgt von Sättigungsmutagenese weiterer identifizierter „hot spots“ letztlich eine Variante mit invertierter Enantioselektivität und einem E_R -Wert von 28,9 isoliert werden.^[154]

Der Nachteil der „gerichteten Evolution“ liegt zweifelsfrei in der hohen Anzahl an zu durchmusternden Varianten. Für ein Enzym mit X Aminosäuren und M Substitutionen berechnet sich die Anzahl möglicher Varianten (N) durch Gleichung 1.1.^[155]

$$N = \frac{19^M X!}{(X - M)! M!} \quad (1.1)$$

Für ein Modell-Enzym mit 300 Aminosäuren und 2 Substitutionen entspricht das bereits einer Anzahl von 16.190.850 möglicher Varianten. Bei drei Substitutionen erhöht sich diese Zahl bereits auf mehr als 30 Milliarden.

Bisherige Durchmusterungsmethoden basieren jedoch in der Regel auf Einzelklonanalysen, bei denen jede Variante separat mit den betreffenden Substraten analysiert wird. Eine schematische Darstellung eines Standard-Durchmusterungsverfahrens für die Identifizierung von Varianten mit veränderter Enantioselektivität ist in Abbildung 1.6 wiedergegeben.

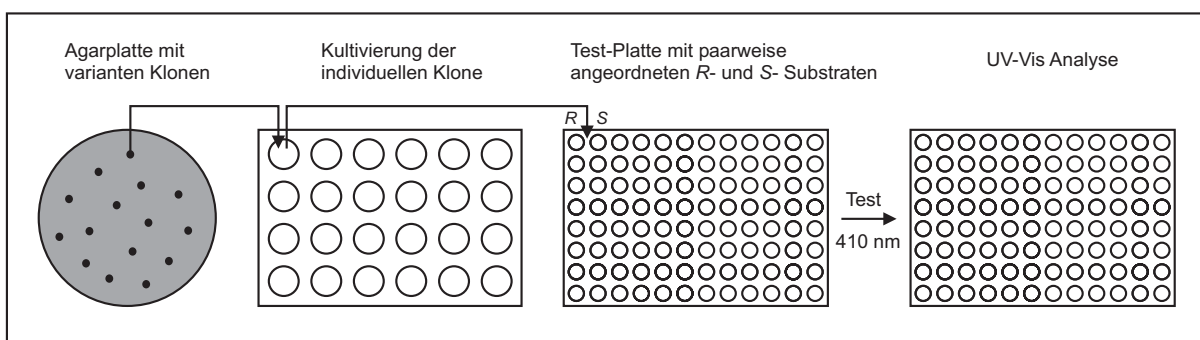


Abb. 1.6: Schematische Darstellung eines Standard-Verfahrens zur Identifizierung von Enzymvarianten mit veränderter Enantioselektivität. Variante Einzelklone werden separat kultiviert, Enzymvarianten werden produziert und in das extrazelluläre Medium sekretiert. Der enzymhaltige Überstand wird in Mikrotiterplatten mit den Substratenantimern als p-Nitrophenylester überführt. Diese sind in Reihen paarweise nebeneinander angeordnet. Die Substrathydrolyse kann durch die Messung der Absorption bei 410 nm verfolgt werden (Abbildung modifiziert nach [50]).

Eine Durchmusterung von 15.000 Klonen erfordert im Falle von zwei Enantiomeren also bereits 30.000 Einzelanalysen. Bei einem Enzym von 300 Aminosäuren und einer Bibliothek von durchschnittlich zwei Austauschungen pro Enzym müssten jedoch bereits über 16 Millionen Klone durchmustert werden, um alle statistisch möglichen Varianten zu erfassen. Da die meisten zufällig eingeführten Mutationen außerdem schädliche Auswirkungen für die Aktivität haben, steigt der Anteil inaktiver Varianten in einer Bibliothek mit der Anzahl der Mutationen.^[156,157] Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, daß ebenso der Anteil von Varianten mit veränderten Eigenschaften in Bibliotheken mit hohen Fehlerraten angereichert ist, da mit der Anzahl der eingeführten Mutationen auch der betrachtete Sequenzraum erweitert wird.^[158] Die Wahrscheinlichkeit zur Identifizierung von Varianten mit gewünschten Eigenschaften erhöht sich also mit der Anzahl durchmusterter Klone. Eine Durchmusterung von Enzymlbibliotheken mit $>10^6$ Klonen ist jedoch auch mit automatisierten Analysemethoden nur schwer zu bewerkstelligen.

Für eine effektivere simultane Analyse einer großen Anzahl von Varianten bedarf es zwei Voraussetzungen: (i) Ein leistungsstarkes Durchmusterungsverfahren, daß es ermöglicht Varianten einer bestimmten Eigenschaft von anderen gezielt zu isolieren und (ii) eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung, also die physikalische Verknüpfung einer Variante und der ihr zu Grunde liegenden genetischen Information. Für letzteres existieren mittlerweile zahlreiche Verfahren. Neben reinen *in vitro* Methoden wie dem „*Ribosomal Display*“,^[159-161] dem „*mRNA Display*“^[162,163] oder der *in vitro* Mikrokompartimentierung^[164-167] sind es jedoch hauptsächlich die *in vivo* Methoden wie Oberflächenpräsentation auf Phagen^[168-172] oder Bakterienzellen, die vielseitige Anwendungsmöglichkeiten eröffnen. Auf die bakterielle Zelloberflächenpräsentation soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

1.3 Bakterielle Zelloberflächenpräsentation

Die bakterielle Zelloberflächenpräsentation nutzt die genetische Fusionierung eines Passagierproteins oder -enzym an ein anderes Protein, das den Transport und die Verankerung auf der Zelloberfläche des Wirtsorganismus vermittelt. Dazu existieren derzeit vielseitige Strategien.^[173,174] Ein häufig verwendetes Verfahren ist die Fusion von Passagierdomänen an integrale Außenmembranproteine. Diese werden vom Periplasma aus entweder spontan oder durch spezialisierte Maschinerien in die äußere Membran integriert.^[175,176] So konnte beispielsweise das Enzym β -Laktamase durch eine Fusion an die carboxyterminale Domäne des Membranproteins OmpA funktional auf der *E. coli* Zelloberfläche präsentiert werden.^[177] Die Verwendung einer verkürzten Variante des Intimins, einem Membranprotein und Pathogenitätsfaktor aus enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), ermöglichte ebenfalls die Präsentation verschiedener Passagierproteine, wie das Mikroprotein EETI-II (ein Trypsininhibitor aus *Ecballium elaterium*), das Interleukin 4 und das „*Bence Jones*“ Protein (REI_V).^[178,179] Einige Lipoproteine der äußeren Membran konnten ebenfalls bereits erfolgreich zur Präsentation heterologer Proteine verwendet werden. Dazu zählt das „*ice nucleation protein*“ (INP) aus *Pseudomonas syringae*, das als Fusionsprotein

die Präsentation der Enzyme Carboxymethylcellulase aus *Bacillus subtilis* und Levansucrase aus *Zymomonas mobilis* ermöglichte.^[180,181] Gram-negative Bakterien assemblieren außerdem eine Reihe komplexer Strukturen auf der Zelloberfläche, wie Flagellen, Pili oder *S-layer*. Auch diese Strukturen konnten für die Präsentation von Passagierproteinen verwendet werden.^[182-184] Selbst einige Protein-Sekretions-Systeme erlauben die Oberflächenverankerung von transportierten Proteinen.^[185] KORNACKER und Mitarbeiter beschrieben so die Präsentation des Enzyms β -Laktamase als Fusionsprotein mit der Pullulanase aus *Klebsiella oxytoca*, einem Substrat für das Typ II Sekretions-System.^[186]

Das am weitesten verbreitete System zur bakteriellen Oberflächenpräsentation stellt jedoch die Verwendung von monomeren Autotransporterproteinen dar. Auf diese soll im Folgenden genauer eingegangen werden. Autotransporter bilden die Gruppe V_a des Typ V-Sekretionssystems und besitzen alle die Eigenschaft, vom Periplasma aus als einzelnes, sämtliche dafür notwendigen Informationen beinhaltendes Polypeptid in die äußere Membran transloziert zu werden.^[187] Alle Autotransporter zeigen dabei eine bestimmte primärstrukturelle Organisation auf, die in drei Hauptdomänen unterteilt werden kann.^[188] Am Aminoterminal befindet sich ein Signalpeptid für den *sec*-abhängigen Transport ins Periplasma, gefolgt von einer Passagierdomäne bestehend aus dem funktionalen Teil des Proteins. Diese Passagierdomäne wird von der carboxyterminalen Domäne, der sogenannten Translokator-domäne, durch die äußere Membran transloziert. Die Translokator-domäne selbst setzt sich aus zwei Subdomänen zusammen: Die erste besteht aus den carboxyterminalen 250-300 Aminosäuren. Diese sollen laut Modell ein in die äußere Membran inserierendes β -Fass bilden.^[189,190] Die zweite Subdomäne besteht aus ca. 25 Aminosäuren und soll laut Vorhersage als Linker-Region eine α -helikale Konformation ausbilden.^[191-193] Der extrazelluläre Teil, die Passagierdomäne, besteht ebenfalls aus zwei Subdomänen: Eine aminoterminal Domäne, welche die enzymatische Aktivität des Autotransporters beinhaltet und eine carboxyterminale sogenannte „Autochaperon-Domäne“.^[193] Letztere ist für die Translokation nicht essentiell, erhöht jedoch deren Effizienz entweder durch Stabilisierung des β -Fasses^[194] oder durch die Förderung der Faltung der Passagierdomäne.^[193,195,196] Der postulierte Mechanismus der Sekretion eines Autotransporters besteht aus drei Schritten. (i) *sec*-abhängige Translokation durch die Periplasmamembran, (ii) Transport durch das Periplasma, (iii) Insertion in und Translokation durch die äußere Membran.^[197] Eine schematische Darstellung der strukturellen Organisation und der Sekretion von Autotransporterproteinen befindet sich in Abbildung 1.7.

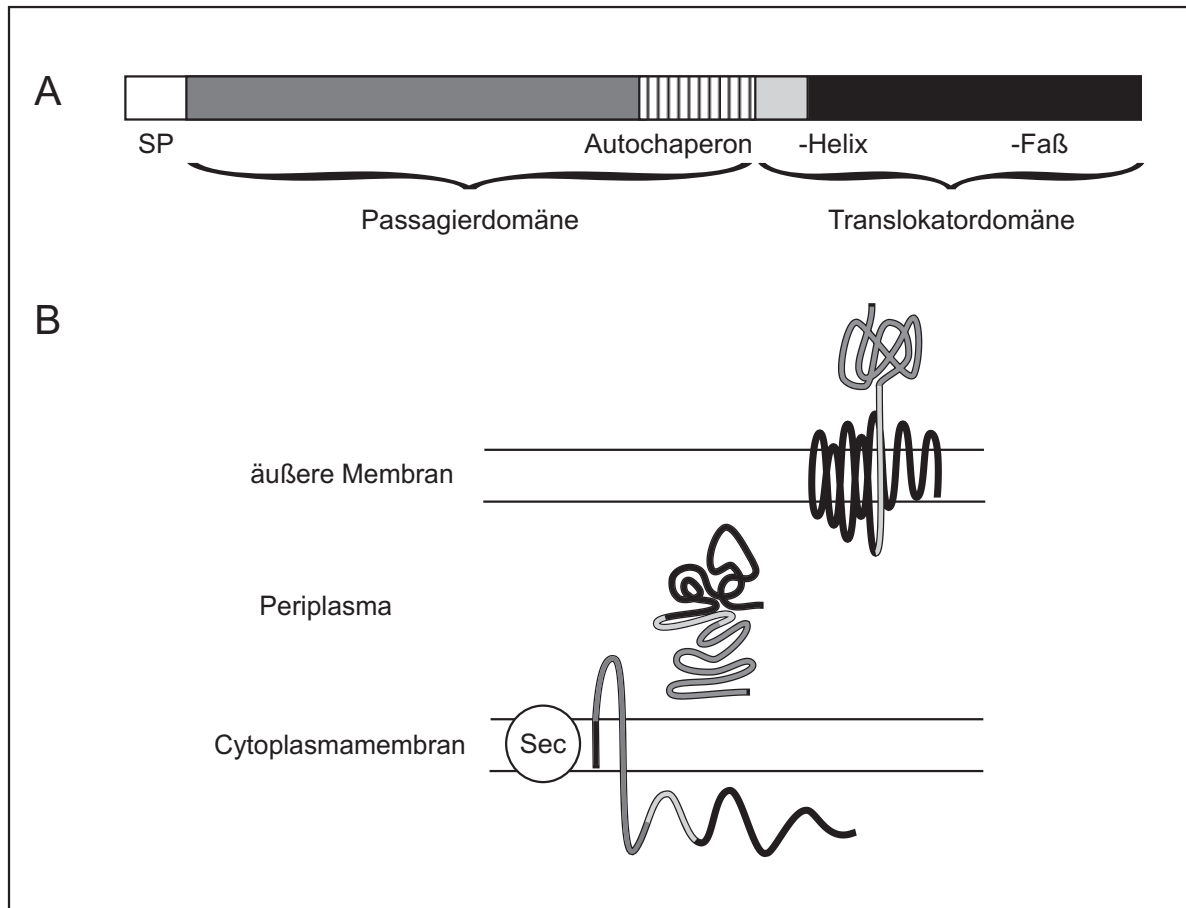


Abb. 1.7: (A) Schematische Darstellung der typischen primärstrukturellen Organisation von Autotransporterproteinen, bestehend aus aminoterminalen Signalpeptid (SP), einer Passagierdomäne und einer Translokator-domäne. Die Passagierdomäne besteht aus einem aminoterminalen Teil, der die enzymatische Aktivität des Autotransporters beinhaltet und einer carboxyterminalen Autochaperon-Domäne. Die Translokator-domäne bildet auf der aminoterminalen Seite eine α -Helix, auf der carboxyterminalen ein β -Faß aus. (B) Die Sekretion eines Autotransporters besteht aus Translokation durch die Cytoplasmamembran, Transport durch das Periplasma, Integration in und Translokation durch die äußere Membran (Abbildung modifiziert nach [197]).

Für die Insertion und Translokation eines Autotransporterproteins wurden verschiedene Mechanismen postuliert.^[187] Kürzlich konnte die Röntgenkristallstruktur der Translokator-domäne des Autotransporters NalP aus *Neisseria meningitidis* gelöst werden, die das bereits genannte Modell bestätigte: Die Struktur besteht aus einem zwölfsträngigen β -Faß, das eine Pore in der äußeren Membran bildet und einer α -Helix, die sich im Lumen des β -Fasses befindet. Der Aminoterminus der α -Helix, der zur Passagierdomäne führt, ist dabei auf der extrazellulären Seite der äußeren Membran lokalisiert.^[198] Diese Befunde untermauern die Theorie, daß die Passagierdomäne durch die Pore der Translokator-domäne auf die Zelloberfläche „gefädelt“ wird.

Das erste entdeckte Autotransporterprotein ist die IgA Protease aus *Neisseria gonorrhoeae*.^[188] Die carboxyterminale Domäne dieses Proteins (IgA β) konnte als Fusion unter anderem zur Präsentation der Cholera Toxin B Untereinheit (CtxB) aus *Vibrio cholerae* verwendet werden.^[199,200] Letzteres Protein konnte in einem anderen Ansatz durch die Fusion an die carboxyterminale Domäne des *E. coli* Adhäsins (AIDA-I) ebenfalls auf der Zell-

oberfläche präsentiert werden.^[201] Weitere Beispiele für durch Autotransporter präsentierte Proteine und Enzyme sind die Sorbitol Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides*,^[202] die alkalische Phosphatase und das Maltose-Bindeprotein MalE aus *E. coli*^[203] und die *Shigella dysenteriae* Toxin B Untereinheit.^[204] Es konnte des Weiteren gezeigt werden, daß Autotransporter präsentierte Polypeptide auf der Zelloberfläche oligomerisieren können, was die Präsentation dimerer Enzyme in katalytisch aktiver Form ermöglicht.^[202,205]

Die Präsentation von Enzymen auf bakteriellen Zelloberflächen bietet neben der Gewährleistung einer effizienten Genotyp-Phänotyp-Kopplung noch einige weitere, für biotechnologische Applikationen positive Aspekte: Die Enzyme sind für ihre entsprechenden Substrate direkt zugänglich. Ein Durchdringen der Zellmembranen, was nicht allen Substraten möglich ist, wird dadurch überflüssig und die katalysierten Reaktionen können in einem definierteren Milieu stattfinden, als es im Inneren einer Zelle gegeben ist. Zellen mit oberflächenpräsentierten Enzymen finden deshalb häufig eine Anwendung als „Ganz-Zell-Biokatalysatoren“.^[197,206-208] Im Gegensatz zur Präsentation auf Phagen ist die Größe des Passagierproteins bei der bakteriellen Zelloberflächenpräsentation kein limitierender Faktor.^[9] Davon abgesehen sind Bakterienzellen selbstreplizierend und groß genug, um durch optische Verfahren wie Fluoreszenzmikroskopie und Durchflußzytometrie analysiert zu werden. Letzteres ermöglicht zudem Hochdurchsatz-Durchmusterungen.^[173,174,209-212]

Obwohl die bakterielle Zelloberflächenpräsentation eine effiziente Methode zur Kopplung von Geno- und Phänotyp darstellt, existieren jedoch insbesondere im Falle von Enzymen kaum leistungsstarke Durchmusterungsverfahren zur Isolierung von Einzelklonen, die Varianten bestimmter katalytischer Eigenschaften präsentieren. Eines der wenigen Beispiele für die erfolgreiche Etablierung eines auf bakterieller Zelloberflächenpräsentation basierenden Hochdurchsatzverfahrens wurde von OLSEN und Mitarbeitern beschrieben. Zur Evolvierung nutze das Verfahren die Protease OmpT, die als integrales Außenmembranprotein natürlicherweise in der äußeren Membran von *E. coli* lokalisiert ist und somit *per se* eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung vermittelt.^[213] Das Prinzip basierte auf der Inkubation von *E. coli* Zellen, die ein Zufallsrepertoire unterschiedlicher OmpT Varianten präsentierten, mit einem variierbaren peptidischen FRET-Substrat (*fluorescence resonance energy transfer*). Dieses beinhaltete eine OmpT Erkennungssequenz, die auf einer Seite mit einem BODIPY-, auf der anderen mit einem Tetramethylrhodamin-Fluorophor flankiert war. Eine positive Nettoladung des Substrats ermöglichte außerdem die nicht-kovalente Bindung an die negativ geladene *E. coli* Zelloberfläche. Der geringe Abstand zwischen beiden Fluorophoren resultierte in der Unterdrückung der BODIPY-Floureszenz durch das Tetramethylrhodamin-Fluorophor. Die enzymatische Spaltung des Substrats durch oberflächenexponiertes OmpT führt jedoch zur physikalischen Trennung beider Fluorophore. Während das Fragment mit dem BODIPY-Fluorophor aufgrund der positiven Ladung auf der Zelloberfläche zurückbleibt, kann das ungeladene Fragment mit dem Tetramethylrhodamin-Fluorophor wegdiffundieren, was zu einem Anstieg der BODIPY-eigenen Fluoreszenzemission führt. Diese spiegelt somit die katalytische Aktivität der entsprechenden Protease-Variante auf der Zelloberfläche wieder. Abbildung 1.8 zeigt eine schematische Darstellung des Verfahrens.

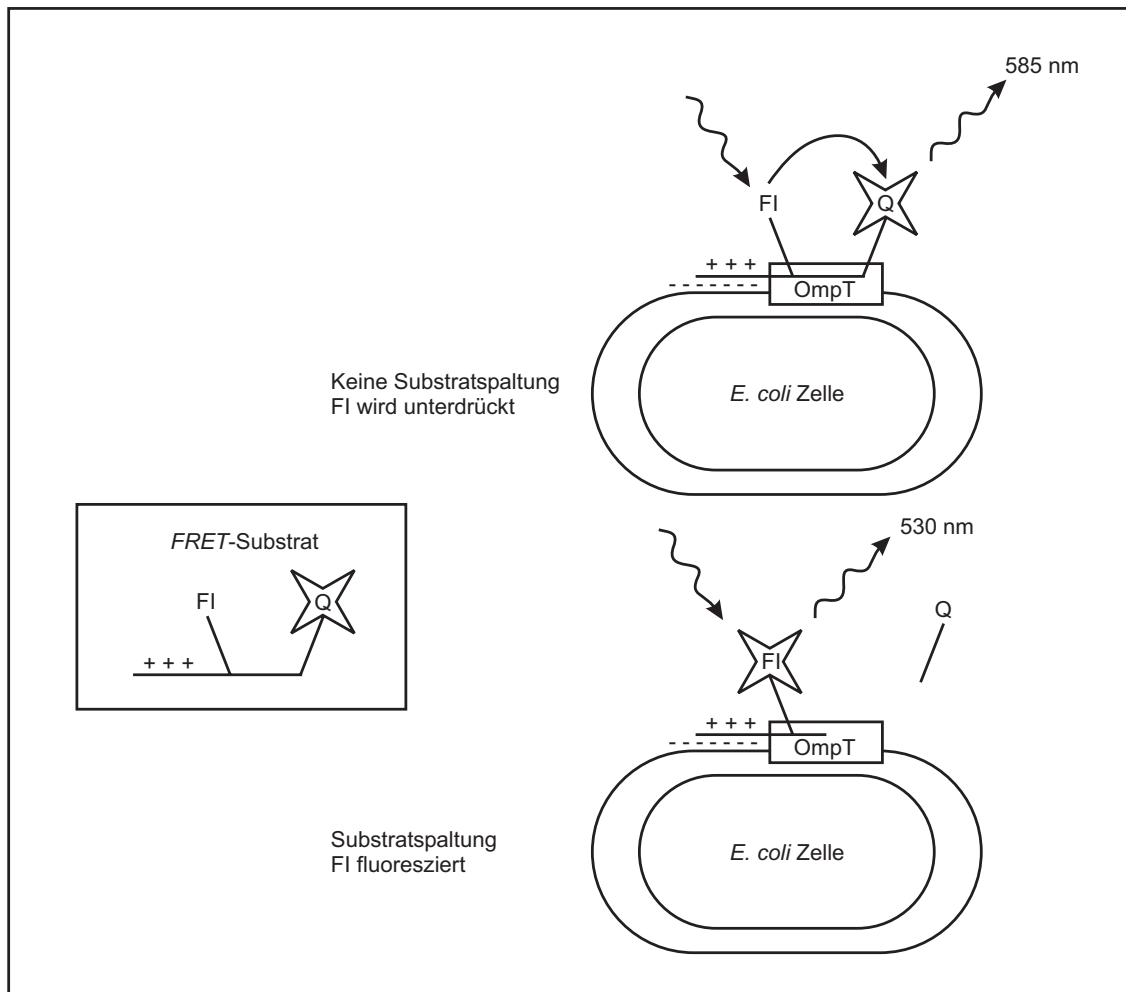


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der von OLSEN und Mitarbeitern durchgeführten Isolierung von OmpT-Varianten mittels FRET-Substraten. Das positiv geladene peptidische FRET-Substrat bindet an die negativ geladene Zelloberfläche und besteht aus einem BODIPY(FI)- und einem Tetramethylrhodamin(Q)-Fluorophor auf den gegenüberliegenden Seiten einer OmpT Erkennungssequenz. Die Fluoreszenz des BODIPY-Fluorophors wird durch das Tetramethylrhodamin unterdrückt. Die Spaltung des variierbaren Substrats durch OmpT resultiert in einem Wegdiffundieren des Tetramethylrhodamin-Fluorophors und einem damit verbundenen Anstieg der Fluoreszenzemission des BODIPY-Fluorophors^[211] (Abbildung modifiziert nach [214]).

Mit diesem Verfahren konnten in einer einzigen Sortierung mittels *FACS* (*fluorescence activated cell sorting*) Einzelklone mit einer aktiven OmpT-Variante von Einzelklonen mit einer inaktiven über 5000-fach angereichert werden. Des Weiteren gelang es mit dem FRET-Verfahren, aus einem Repertoire von 6×10^5 OmpT-Varianten eine Mutante zu isolieren, die eine 60-fach erhöhte Hydrolyseaktivität gegenüber einem Substrat mit einer durch den Wildtyp wenig bevorzugten Erkennungssequenz aufwies.^[211] Der Nachteil dieses Verfahrens besteht allerdings im nicht-kovalenten Charakter der Substratbindung, die zudem von der Hydrolysereaktion vollständig unabhängig ist. Es ist dadurch nicht auszuschließen, daß FRET-Substrate schon vor Bindung an die betreffende Zelloberfläche gespalten werden, dann wegdiffundieren und auf benachbarten Zellen zu falsch-positiven Markierungen führen.

Ein kürzlich etabliertes Hochdurchsatzverfahren zur Isolierung aktiver Esterasemoleküle durch bakterielle Zelloberflächenpräsentation und eine spezifische Zellmarkierung wird im nächsten Abschnitt vorgestellt.

1.4 ESCAPED

Das im Folgenden vorgestellte Verfahren mit dem Namen *ESCAPED* (*enzyme screening by covalent attachment of products via enzyme display*) kombiniert Genotyp-Phänotyp-Kopplung durch bakterielle Zelloberflächenpräsentation mit einer aktivitätsspezifischen kovalenten Zellmarkierung zur Hochdurchsatz-Isolierung Esterase profizienter Zellen aus einem großen Überschuss inaktiver Zellen.^[214-216] Das Verfahren basiert dabei auf dem Konzept der Anreicherung replizierbarer Partikel, die eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung vermitteln, als Folge einer vorhandenen katalytischen Aktivität. Dieses Prinzip wurde erstmalig von JANDA und Mitarbeitern anhand katalytischer Antikörper vorgestellt, die auf Bakteriophagen präsentiert wurden.^[217] Etabliert wurde das *ESCAPED*-Verfahren am Beispiel der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*.

EstA ist als Typ V_a Autotransporterprotein natürlicherweise in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* lokalisiert. Es gehört zu einer neuen Familie lipolytischer Enzyme mit dem Konsensusmotiv GDSLS um den katalytisch aktiven Serinrest und wird als Vorläuferprotein von 646 Aminosäuren mit einer aminoterminalen Signalsequenz von 24 Aminosäuren synthetisiert, die den *sec*-abhängigen Transport ins Periplasma vermittelt. Das reife Enzym besteht nach Prozessierung aus 622 Aminosäuren und verfügt als Autotransporter neben der aminoterminalen katalytischen Domäne auch über eine charakteristische carboxyterminale β -Faltblatt-Domäne. EstA läßt sich zudem in *E. coli* produzieren und wird auch dort funktional in die äußere Membran integriert.^[218] Über die physiologische Bedeutung von EstA ist bis *dato* nicht viel bekannt. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse deuten jedoch an, daß es an der Synthese von Rhamnolipiden und der damit verbundenen Biofilmproduktion beteiligt ist.^[219]

Für die Identifizierung und Isolierung von Esterase präsentierenden *E. coli* Zellen bedarf es einer aktivitätsspezifischen kovalenten und einfach nachzuweisenden Markierung der betreffenden Zelloberfläche. Peroxidase besitzt die Eigenschaft unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid die kovalente Dimerisierung von Tyrosinresten zu katalysieren.^[220] Diese Reaktion tritt in der Natur vor allem in arteriosklerotischen Geweben auf, in denen Phagozyten Myeloperoxidase und H₂O₂ sekretieren und dadurch eine kovalente Verknüpfung von Proteinen der Arterienwand bewirken.^[221-223] Technisch wird diese, als *TSA* (*tyramide signal amplification*) bekannte Reaktion zur Signalverstärkung in der Cyto- und Immunhistochemie verwendet, sowie für *in situ* Hybridisierung.^[224-226] Dabei werden Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper verwendet, die unter Verbrauch von H₂O₂ an der Stelle ihrer Bindung die kovalente Markierung von Proteinen mit Biotin-Tyramid-Konjugaten katalysieren. Dies geschieht durch die Bildung von Dityrosinen zwischen einem Tyrosinrest eines Proteins und einem Tyrosinrest eines Biotin-Tyramid-Konjugats. Diese Markierung kann durch die Bindung von Streptavidin-gekoppelten Fluorophoren an den Biotinrest des Konjugats nachgewiesen werden.^[224,227-229] Der Mechanismus der Tyrosindimerisierung läuft über die Bildung eines Tyrosylradikals durch einen hochoxidativen Komplex aus Peroxidase und H₂O₂. Dazu müssen die beteiligten Tyrosinreste an der Hydroxygruppe deprotoniert sein und somit als Phenolatanionen vorliegen. Die Dimerisierung läuft deshalb präferentiell im alkalischen Milieu ab. Von dem Phenolatanion

wird durch die Peroxidase ein Elektron abstrahiert, was zur Bildung eines Tyrosylradikals führt. Trifft ein Tyrosylradikal auf einen anderen Tyrosinrest erfolgt wiederum die Abstrahierung eines Elektrons, diesmal durch das Tyrosylradikal, wodurch der andere Tyrosinrest radikalisiert wird. Treffen zwei Radikale aufeinander, kommt es zur Ausbildung eines *o,o*-Dityrosins.^[220] Dabei können jedoch nicht nur Tyrosinreste in Proteinen kovalent mit Biotin-Tyramid-Konjugaten verknüpft werden. Nebenreaktionen sind Dimerisierungen der Biotin-Tyramid-Konjugate sowie die kovalente Kopplung von Proteinen untereinander. In Abbildung 1.9 ist eine schematische Darstellung des verwendeten Biotin-Tyramid-Konjugats sowie des Reaktionsmechanismus abgebildet.

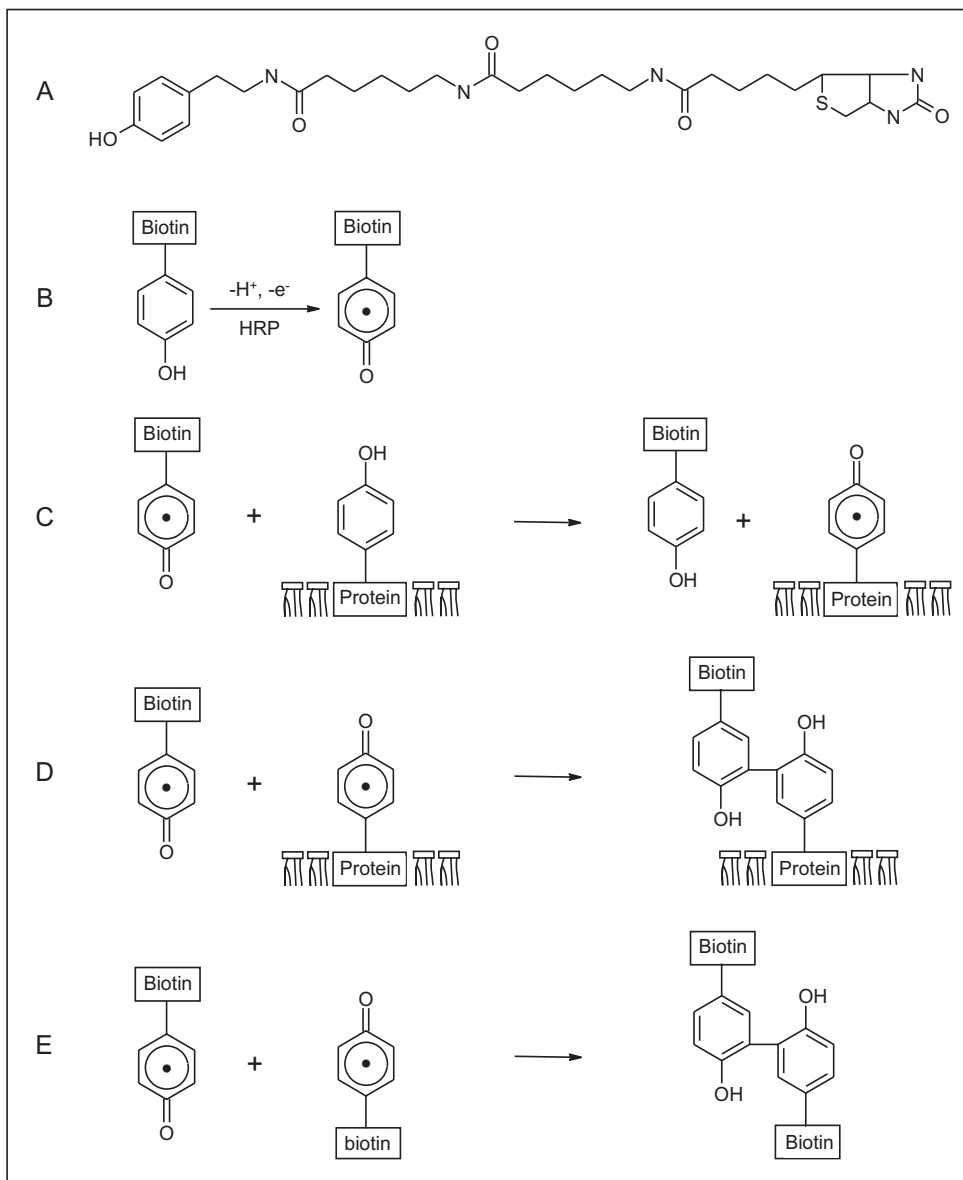


Abb. 1.9: (A) Struktur des zur kovalenten Markierung von *E. coli* Zellen verwendeten Biotin-Tyramid-Konjugats. (B-D) Mechanismus der Peroxidase-katalysierten Bildung von *o,o*-Dityrosinen am Beispiel der Markierungsreaktion mit Biotin-Tyramid-Konjugaten. (B) Ein hochoxidativer Komplex aus Peroxidase und H_2O_2 abstrahiert ein Elektron vom Tyrosinrest des Biotin-Tyramid-Konjugats, was in der Entstehung eines Biotin-Tyramid-Radikals resultiert. (C) Das entstandene Radikal trifft auf einen Tyrosinrest auf der Zelloberfläche, was zum Radikaltransfer führt. (D) Die Bildung von *o,o*-Dityrosin durch Radikale beider Spezies führt zur kovalenten Biotinylierung der Zelloberfläche. (E) Bildung von *o,o*-Dityrosin durch zwei Biotin-Tyramid-Radikale (unerwünschte Nebenreaktion) (Abbildung modifiziert nach [216]).

Durch Zelloberflächenkonjugation von Meerrettich-Peroxidase und Inkubation mit dem Biotin-Tyramid-Konjugat in Gegenwart von H_2O_2 konnte diese Reaktion zur kovalenten Biotinylierung lebender *E. coli* Zellen verwendet werden. Eine chemische „Blockierung“ der phenolischen Hydroxygruppe des Biotin-Tyramid-Konjugats mittels Esterifizierung verhindert die Radikalbildung durch die Peroxidase und ermöglichte so die spezifische Markierung von Zellen mit oberflächenassoziiierter Esteraseaktivität. Solche Zellen sind in der Lage die Esterbindung zu hydrolysieren und freies Biotin-Tyramid-Konjugat zu generieren, welches von der ebenfalls oberflächenassoziierten Peroxidase auf die Zelloberfläche konjugiert wird. In einem Modellexperiment konnten so EstA präsentierende Zellen durch ein mit Oktansäure verestertes Biotin-Tyramid-Konjugat in nur zwei Anreicherungsrounds aus einem $1:10^6$ -Gemisch mit inaktiven Zellen isoliert werden. Die Anreicherungen erfolgten durch magnetische Zellsortierung mit Biotin bindenden paramagnetischen Partikeln.^[214-216] Abbildung 1.10 zeigt eine schematische Darstellung der Esterase-spezifischen Zellmarkierung.

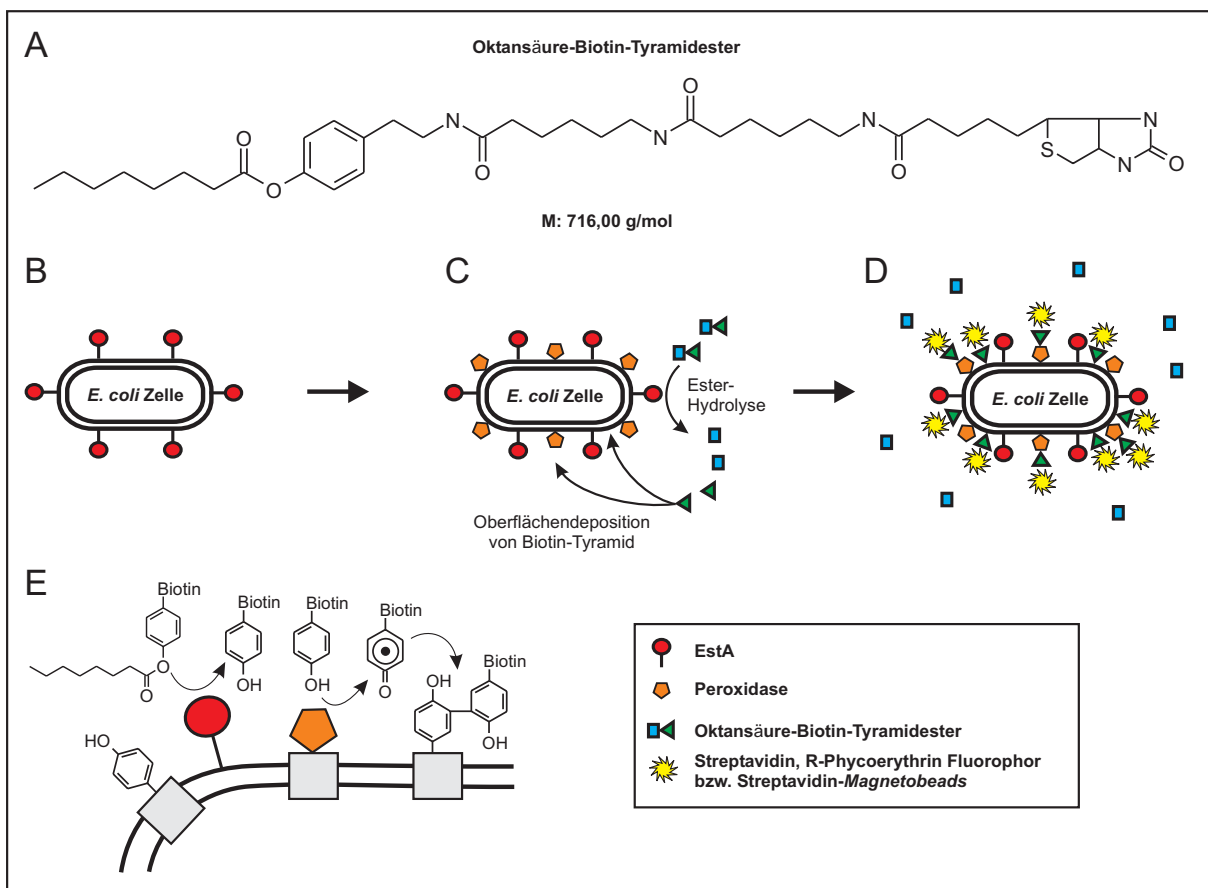


Abb. 1.10: (A) Struktur des zur Anreicherung EstA präsentierender Zellen verwendeten Oktansäure-Biotin-Tyramidesters. (B-D) Schematische Darstellung der spezifischen Markierung EstA präsentierender Zellen mittels Oktansäure-Biotin-Tyramidester. (B) Plasmid-kodiertes EstA wird in *E. coli* produziert und in die äußere Zellmembran integriert. (C) Meerrettich-Peroxidase wird kovalent auf der Zelloberfläche fixiert. Der Oktansäure-Biotin-Tyramidester wird durch EstA hydrolysiert. Die Peroxidase katalysiert unter Verbrauch von H_2O_2 die Bildung eines Biotin-Tyramid-Radikals, das mit Tyrosinresten auf der Zelloberfläche reagieren kann. Das Biotin-Tyramid-Konjugat wird dadurch kovalent auf der Zelloberfläche fixiert. (D) Der Nachweis der Markierung bzw. die Sortierung positiver Zellen erfolgt mittels Streptavidin-gekoppelten Fluorophoren und Durchflußzytometrie oder mittels Streptavidin-Magnetobeads und magnetischer Zellsortierung. (E) Detailansicht der Markierungskaskade (Abbildung modifiziert nach [214]).

Das Anreicherungsexperiment zeigte, daß die entstehenden Tyramid-Radikale kurzlebig sind und direkt am Ort ihrer Entstehung weiterreagieren. Die maximale Anzahl konjugierter Tyramidmoleküle pro Zelle wurde auf 120.000 bestimmt. Es konnte zudem nachgewiesen werden, daß die Intensität der Markierung mit dem Grad der zellulären Esteraseaktivität korreliert.^[216]

Dieses Verfahren bietet damit eine ähnlich sensitive Methode zur Isolierung Esterase präsentierender Zellen, wie die von OLSEN und Mitarbeitern beschriebene *FRET*-Technik für Protease präsentierende (Abb. 1.8). Der Vorteile gegenüber letzterer besteht im kovalenten Charakter der Zellmarkierung, die außerdem direkt von einer vorangegangenen Substrat-hydrolyse abhängig ist. Den entscheidenden Nachteil stellt jedoch die Beschränkung des Systems auf die Isolierung generell esterolytisch aktiver Zellen dar. Eine Isolierung von Varianten mit veränderter Substratspezifität, wie es mit der *FRET*-Technik bereits durchgeführt wurde, war durch das *ESCAPED*-Verfahren bis *dato* nicht möglich.

1.5 Zielsetzung

Das hier vorgestellte Promotionsvorhaben hat zum Ziel ein Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung und Isolierung von Varianten lipolytischer Enzyme mit veränderter Substratspezifität aufzubauen.

Dazu soll zunächst auf Basis der *Pseudomonas aeruginosa* Membranesterase EstA ein allgemeines System zur Präsentation enzymatisch aktiver lipolytischer Enzyme auf *E. coli* Zellen entwickelt werden, welches eine vereinfachte Funktionsabfrage und effiziente Genotyp-Phänotyp-Kopplung ermöglicht.

Das eigentliche Isolierungsverfahren soll als Weiterentwicklung des *ESCAPED*-Prinzips (1.4) auf einer spezifischen kovalenten Zellmarkierung beruhen, die abhängig ist von der Substratspezifität der jeweilig oberflächenpräsentierten Enzymvariante. Dadurch sollte es möglich sein, eine große Anzahl unterschiedlicher Varianten simultan auf veränderte Substratspezifität hin zu durchmustern.

In einem Modellanreicherungsexperiment soll das entwickelte Verfahren schließlich praktisch erprobt werden.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

Escherichia coli

JM109 ([230])

[F' *traD36 lacI^Q ΔlacZ(M15) proA⁺B⁺*) *mcrA Δ(lac-proAB) thi-1 gyrA96 endA1 hsdR17 relA1 supE44 recA1*]

BMH71-18 (Quelle: H. Kolmar)

[$\Delta(lac-proAB)$, *supE, thi, F' lacI^Q, lacZΔM15, proA⁺B⁺*]

BL21(DE3) (Quelle: Fa. Novagen)

[F' *ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm λ(DE3)*]

DH5α (Quelle: Fa. Invitrogen)

[$\Phi80\Delta lacZ\Delta M15 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17$ (*r_k⁻, m_k⁺*) *supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169*]

2.2 Plasmide

2.2.1 pBBX+

Das Plasmid pBBX+ wurde aus dem Plasmid pBBR1MCS (2.2.2.) durch Klonierung der kodierenden Sequenz der *Pseudomonas aeruginosa* Membranesterase EstA konstruiert^[218] und diente der Produktion und Oberflächenpräsentation von EstA in *Escherichia coli*. EstA steht dabei unter Kontrolle der Promotor/Operator-Region des Laktose-Operons. Die Mobilisierungsregion stammt aus *Bordetella bronchiseptica* und dient dem konjugativen Transfer des Plasmids in *Pseudomonas putida* Stämme, die zur heterologen Expression herangezogen werden können. Somit besteht die Möglichkeit auf einen anderen Expressionsstamm auszuweichen, falls die Expression des entsprechenden Gens in *Escherichia coli* keine zufriedenstellenden Ausbeuten ermöglicht.

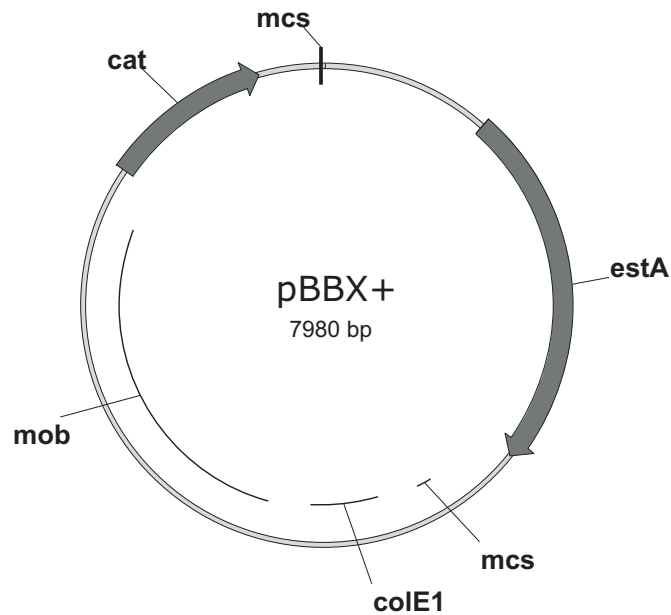


Abb. 2.1: Genetische Karte des Plasmides pBBX+. Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *cat*: Kodierende Sequenz für die Chloramphenicol-Acetyltransferase, *estA*: Kodierende Sequenz für die *Pseudomonas aeruginosa* Membranesterase EstA mit eigener Signalsequenz zum Transport ins Periplasma, *lacP/O*: Promotor/Operator-Region des Laktose-Operons, *mcs*: multiple cloning site, *mob*: Mobilisierungsregion aus *Bordetella bronchiseptica*, *colE1*: Replikationsursprung.

2.2.2 pBBR1MCS

Das Plasmid pBBR1MCS ist der Vorläufer von pBBX+ und leitet sich von dem Plasmid pBBR1 ab. Dieses wurde aus *Bordetella bronchiseptica* isoliert.^[231] Die genetischen Elemente sind, mit Ausnahme der kodierenden Sequenz der *P. aeruginosa* Membranesterase EstA, identisch mit denen des Vektors pBBX+ (2.2.1.). Dieser Vektor diente als Negativkontrolle.

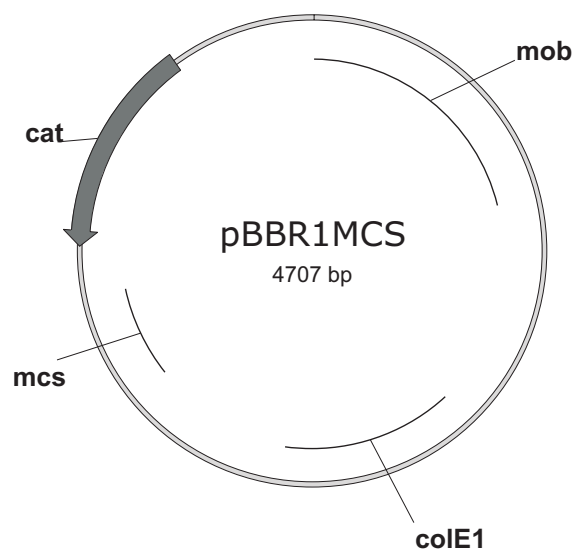


Abb. 2.2: Genetische Karte des Plasmides pBBR1MCS. Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *cat*: Kodierende Sequenz für die Chloramphenicol-Acetyltransferase, *lacP/O*: Promotor/Operator-Region des Laktose-Operons, *mcs*: multiple cloning site, *mob*: Mobilisierungsregion aus *Bordetella bronchiseptica*, *colE1*: Replikationsursprung.

2.2.3 pEst100

Das Plasmid pEst100 wurde von Alexander Wentzel konstruiert und basiert auf pPrey100, einem Derivat von pMAC5-8,^[232] das die kodierende Sequenz des Signalpeptids der *E. coli* alkalischen Phosphatase (*phoAL*) beinhaltet, gefolgt von der kodierenden Sequenz eines „Linker-Peptids“. pEst100 beinhaltet zusätzlich die kodierende Sequenz einer um 144 Aminosäuren verkürzten Variante von EstA (*estA**). Die Deletion befindet sich in der aminoterminalen Domäne von EstA und beginnt mit der katalytisch aktiven Aminosäure Serin #14. Dadurch soll zum einen die esterolytische Inaktivierung der aminoterminalen Domäne vermittelt werden, zum anderen soll eine Verkürzung des insgesamt zu translozierenden Bereichs die Effizienz der Oberflächenpräsentation erhöhen. Zwischen Linker-Peptid und EstA* befindet sich außerdem die kodierende Sequenz für ein E-Epitop, welches sich über einen monoklonalen Antikörper nachweisen läßt. Das Konstrukt steht unter Kontrolle der Promotor/Operator-Region des Laktose-Operons und ermöglicht die Produktion und Oberflächenpräsentation von EstA* als Fusionsprotein mit dem Linker-Peptid auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen. Dieses Plasmid wurde zur Erzeugung von Oberflächenpräsentationsvektoren für lipolytische Enzyme verwendet.

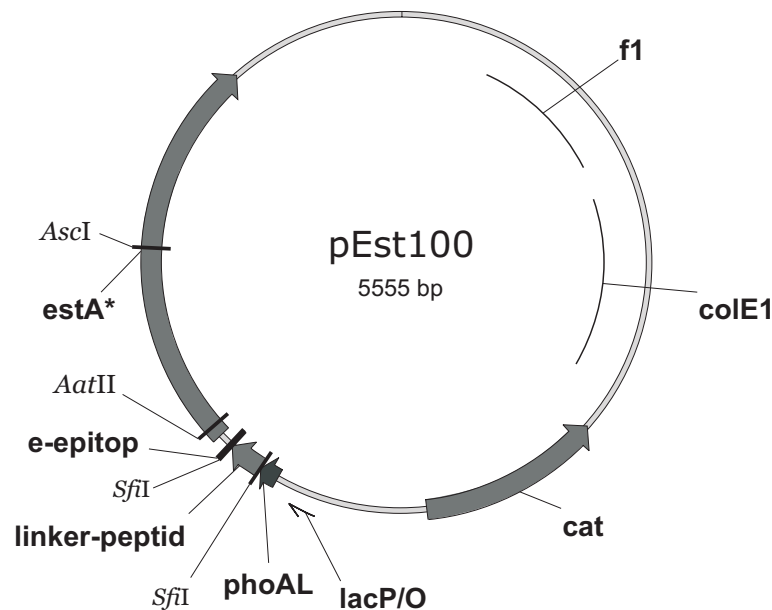


Abb. 2.3: Genetische Karte des Plasmides pEst100. Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *lacP/O*: Promotor/Operator-Region des Laktose-Operons, *phoAL*: Kodierende Sequenz für das Signalpeptid der *E. coli* alkalischen Phosphatase, *linker-peptid*: Kodierende Sequenz für ein 41 Aminosäuren umfassendes Linker-Peptid, *e-epitop*: Kodierende Sequenz für ein E-Epitop (GAPVPYPDPLEPR), *estA**: Kodierende Sequenz für eine um 144 Aminosäuren verkürzte, esterolytisch inaktive Variante der *P. aeruginosa* Membranesterase EstA. *cat*: Kodierende Sequenz für die Chloramphenicol-Acetyltransferase, *colE1*: Replikationsursprung, *f1*: f1-Replikationsursprung,

2.2.4 pET22lipA

Das Plasmid pET22lipA ist ein Derivat von pET22b der Fa. Novagen und enthält zusätzlich die kodierende Sequenz der Lipase LipA aus *Bacillus subtilis*.^[233] Es dient zur

löslichen Produktion von LipA in *E. coli*. Dies steht unter Kontrolle des Promotors aus dem T7-Bakteriophagen. Für die Produktion von LipA ist die Verwendung eines Expressionsstammes notwendig, der eine im Genom integrierte, induzierbare T7-RNA Polymerase beinhaltet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür der *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet. pET22lipA diente außerdem als Matrize für die PCR-Amplifikation der kodierenden Sequenz von LipA.

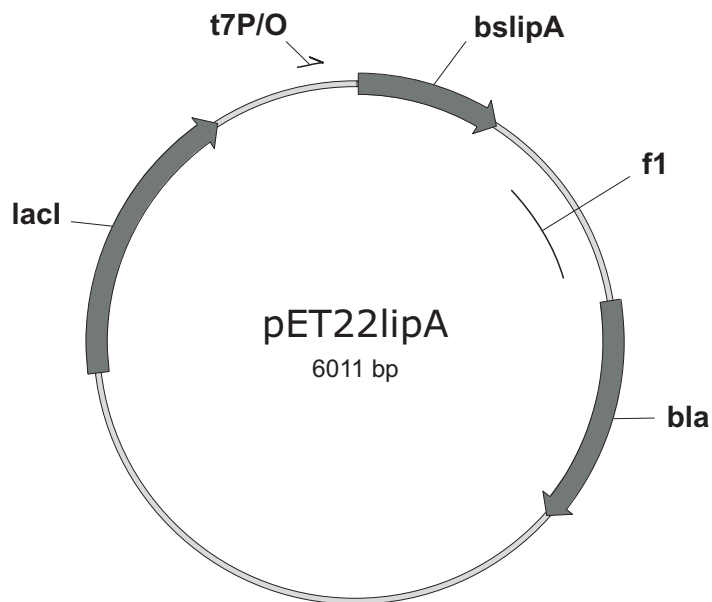


Abb. 2.4: Genetische Karte des Plasmides pET22lipA. Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *t7P/O*: Promotor/Operator-Region des T7-Bakteriophagen, *bslipA*: Kodierende Sequenz der *Bacillus subtilis* Lipase LipA, *bla*: Kodierende Sequenz der β -Laktamase, *lacI*: Kodierende Sequenz des Lac-Repressors, *f1*: f1-Replikationsursprung.

2.2.5 pVSlipA

Das Plasmid pVSlipA (unpubliziert) enthält die kodierende Sequenz der Lipase aus *Serratia marcescens* unter Kontrolle des T7-Promotors. Es dient zur löslichen Produktion dieser Lipase in *E. coli*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es zur PCR-Amplifikation der kodierenden Sequenz der *S. marcescens* Lipase verwendet.

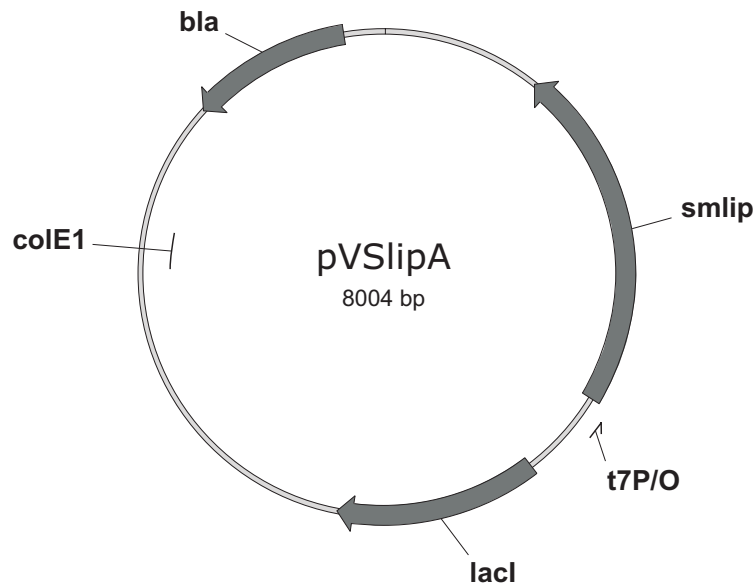


Abb. 2.5: Genetische Karte des Plasmides pVSlipA. Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *t7P/O*: Promotor/Operator-Region des T7-Bakteriophagen, *smlip*: Kodierende Sequenz der *Serratia marcescens* Lipase, *bla*: Kodierende Sequenz der β -Laktamase, *lacI*: Kodierende Sequenz des Lac-Repressors, *colE1*: Replikationsursprung.

2.2.6 pMac5-8FSP

Das Plasmid pMAC5-8FSP ist ein Derivat von pMAC5-8^[232] und enthält zusätzlich die kodierende Sequenz der Cutinase aus *Fusarium solani pisi*. Es dient zur löslichen Produktion der Cutinase in *E. coli*.^[234] Die vermittelte Resistenz richtet sich gegen das Antibiotikum Ampicillin. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es zur PCR-Amplifikation der kodierenden Sequenz der Cutinase verwendet.

2.2.7 pRep4

Das Plasmid pREP4 (3740 bp) ist durch einen *P15A low-copy* Replikationsursprung (ca. 10 Kopien pro Zelle) kompatibel zu *colE1*-Plasmiden und kann so mit diesen in Kombination in *E. coli* repliziert werden. Es vermittelt die Expression des durch das *lacI*-Gen kodierten Lac-Repressors. Die vermittelte Resistenz richtet sich gegen das Antibiotikum Kanamycin. Im Rahmen dieser Arbeit diente es als Helferplasmid zur Regulation der Expression oberflächenpräsentierter Proteine.

2.2.8 053870pPCR-Script

Das Plasmid 053870pPCR-Script wurde von der Fa. GENEART in Regensburg konstruiert. Es basiert auf dem Plasmid pPCR-Script (Fa. Stratagene), beinhaltet jedoch zusätzlich eine synthetische kodierende Sequenz der katalytischen aminoterminalen Domäne

der *P. aeruginosa* Esterase EstA (353 AS), die unter Verwendung der *E. coli*-eigenen Kodonhäufigkeit entworfen wurde. Flankiert wird diese Sequenz von zwei nicht komplementären *SfiI* Erkennungsstellen. Im Rahmen dieser Arbeit diente es als Matrize zur Erzeugung von EstA Enzymbibliotheken.

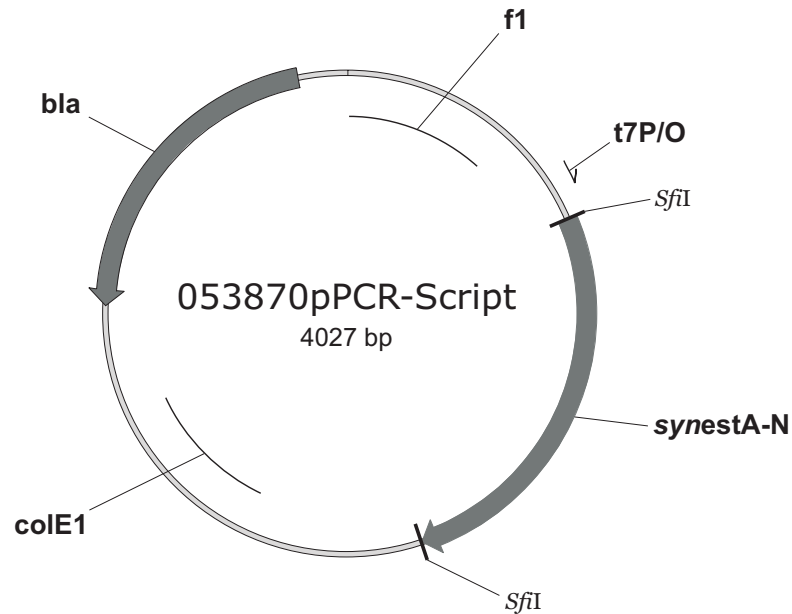


Abb. 2.4: Genetische Karte des Plasmides 053870pPCR-Script. Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *t7P/O*: Promotor/Operator-Region des T7-Bakteriophagen, *synestA-N*: Synthetische kodierende Sequenz der aminoterminalen Domäne (353 AS) der *P. aeruginosa* Esterase EstA, *bla*: Kodierende Sequenz der β -Laktamase, *f1*: *colE1*: Replikationsursprung, f1-Replikationsursprung.

2.3 DNA-Längenstandards

Lösungen von DNA-Längenstandards (MBI Fermentas) wurden mit TE-Puffer und Sucrosefarbmarker auf eine DNA-Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und bei 4 °C gelagert.

λ -DNA, *Eco47I* geschnitten

Fragmentlängen in bp:

8126, 6555, 6442, 3676, 2605, 2555, 2134, 2005, 1951, 1612, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 398, 345, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 72, 67, 45, 42, 32, 28, 23

100 bp *GeneRuler*

Fragmentlängen in bp:

1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

2.4 *Oligodesoxyribonukleotide*

BS-LipA-Sfi-up: 5'-(GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCTGAACACA
~ATCCAGTCG)-3'

Bs-LipA-Sfi-lo: 5'-(GCGTTTCTGGGTGGGCCCCCGAGGCCGAATTCGTATTCTGG
~CCCCCG)-3'

Sermar-LipA-Sfi-up: 5'-(GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGGCATCTT
~TAGCTATAA)-3'

Sermar-LipA-Sfi-lo: 5'- (GCGTTTCTGGGTGGGCCCCCGAGGCCGAGGCCAACAC
~CACCTGATCGG)-3'

Cutinase-Sfi-up: 5'-(GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGCTGCCTACTT
~CTAACCTG)-3'

Cutinase-Sfi-lo: 5'-(GCGTTTCTGGGTGGGCCCCCGAGGCCGAAGCAGAACCACG
~GACAGCC)-3'

EstA-SOE1-AscI-lo: 5'-d(GGCGGCGACCCCGGCGCGCCA)-3'

EstA-SOE2-AatII-up: 5'-d(GGGCGCATCCTCAACGACGTC)-3'

EstA-SOE1-SfiI-up: 5'-(TGGCGCGGCTTCGTTCGGCCTCGGGGGCCAGCGCCTGGA
~CT)-3'

EstA-SOE2-SfiI-lo: 5'-(AGTCCAGGCGCTGGCCCCCGAGGCCGACGAAGCCGCGC
~CA)-3'

EstA-N-SfiI-up: 5'-(GCGCGCGCGCGGCCAGCCGGCCCCTTCGCCCTATTCGAC
~GCTGGTG)-3'

SynEstA-up: 5'-(GTCGCTATCTACCGC)-3'

SynEstA-lo: 5'-(GAGCTCCCAGGCGC)-3'

SynEstA-Mut-SOE1-up: 5'-(CTGGTGCTCGTTACATCGTTGTTNNSCTGCTGCCAG
~ATCTGGGTCTGACCCCGGCTA)-3'

SynEstA-Mut-SOE2-lo: 5'-(AACAAACGATGTAACGAGCAC)-3'

2.5 *Enzyme und Proteine*

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Anti-E-Epitop Antikörper (1 mg/ml]

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

DNA-Längenstandards, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Taq-DNA-Polymerase

Molecular Probes, Eugene, USA

Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat (1 mg/ml), Anti-Dinitrophenyl IgG, Alexa-fluor488Konjugat (polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen)

Sigma-Aldrich, Schnellendorf

Anti-Maus IgG (*whole molecule*), Biotin-Konjugat (polyklonaler Antikörper aus der Ziege), Anti-Kaninchen IgG (*whole molecule*), Biotin-Konjugat (polyklonaler Antikörper aus der Ziege), Meerrettich-Peroxidase (Typ VI-A)

Sonstiges

Anti-EstA Antikörper (polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen die *Pseudomonas aeruginosa* Membranesterase EstA), Anti-*B. subtilis* LipA Antikörper (polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen die Lipase LipA aus *Bacillus subtilis*), anti-LipH Antikörper (polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen die Foldase LipH aus *P. aeruginosa*), Anti-*P. aeruginosa* LipA Antikörper (polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen die Lipase LipA aus *P. aeruginosa*), *P. aeruginosa* Lipase LipA (850 ng/μl in 8M Harnstoff). Alle diese Materialien wurden freundlicherweise von Dr. Susanne Wilhelm (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.

2.6 *Chemikalien*

Applichem, Darmstadt

Imidazol, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), Wasserstoffperoxidlösung 30 %, Chloroform

Boehringer Mannheim, Mannheim

Ampicillin (Natriumsalz)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Agar-Agar (Kobe I, pulv.), Roti[®]garose (NEEO Ultra-Qualität), Ethanol, Natriumchlorid, Salzsäure, Trypton/Pepton aus Casein (pankreatisch verdaut), Hefeextrakt

Difco, Dreieich

Bacto-Agar

Fluka, Buchs, Schweiz

Dimethylsulfoxid (DMSO), p-Nitrophenol, Oktansäure-p-Nitrophenylester, Bromphenolblau, Natriumchlorid, Saccharose

Gibco BRL, Eggenstein

Hefe-Extract

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Merck, Darmstadt

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien, die zur Anwendung kamen.

MJ Research, Watertown, USA

Chill out 14[®] (Flüssigwachs)

Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Borsäure, Ethidiumbromid, Bromphenolblau, Chloramphenicol, Dimethylformamid (DMF, *biotech grade solvent*, 99,9+ %), Tributyrin, Tyramin, *Gummi Arabicum*, Natrium(meta)periodat,

Sigma-Genosys, Steinheim

Oligodesoxirubonukleotide

2.7 Sonstige Materialien und Geräte

Accelrys Inc., San Diego, USA

GCG v11.1, Software für wissenschaftliche EDV

AGFA, Köln

VISTA 200 Farbfotofilm

American National Can., Chicago, USA

Parafilm[®] "M" Laboratory Film

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Sephadex G-25 Gelfiltrationssäulen (PD-10)

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

EPICS Alignment Fluorespheres for optical alignment of flow cytometers (fluoreszierende *MicroBeads*), Beckman Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, SW41TI-Schwenkbecherrotor

Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Vortex® Genie 2

BioRad, München

Gene Pulser® und *Pulse Controller*, Elektroporationsküvetten

Brand, Wertheim

PLASTIBRAND® UV-Küvetten (halbmikro)

C. A. Greiner & Söhne, Nürtingen

Röhrchen 12 ml

CEAG Schirp Reinraumtechnik, Essen

Envirco Sterilbank

Dako Cytomation, Fort Collins, USA

MoFlo® Cytometer mit *Cyclone* Sortiereinheit, *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) mit Coherent *Enterprise II Laser*, *Summit®* v4.0 Software-Paket

DeLano Scientific LLC., Palo Alto, USA

PyMol™ v0.99rc6

Eppendorf, Hamburg

200 µl Mehrkanalpipette, *Mastercycler® personal*

Genomed, Bad Oeyenhausen

JetStar Plasmid Midiprep Kit 2.0

Gilson, Middleton, USA

Mikroliter-Pipetten, 1000 µl, 200 µl und 20 µl

Glasbläserei der Technischen Universität Darmstadt, Darmstadt

Zwei-Kammer-Gradientenmischer für Sucrosegradienten

Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Ultraschallgerät *Branson Sonifier W-250*

Heinzinger, Rosenheim

Stromversorger LNGs 350-06

Helma, Müllheim/Baden

Quarzküvetten (0,5 ml und 2 ml, 1 cm Schichtdicke)

Herolab, Wiesloch

UVT2035 302 nm UV-Leuchttisch, Plastikröhrchen für die Ultrazentrifugation

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Kühlzentrifuge Mikro Rapid/K, Kühlzentrifuge Rotanta/RPC, Kühlzentrifuge Roto Silenta/RP, Kühlzentrifuge Rotixa/RP, Mikroliter-Tischzentrifuge

Ibis Biosciences, Carlsbad, USA

BioEdit v7.0.7.0 biological sequence alignment editor

InforMax Inc., Bethesda, USA

VectorNTI 9 Bioinformatik-Software, Demoversion

Ingold, Steinbach/Ts

pH-Elektrode U402-M5

Invitek, Berlin

Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Kit, Invisorb Spin DNA Extraction Kit

IKA-Labortechnik, Staufen

beheizbarer Magnetrührer IKAMAG RCT

Kimberley-Clark, USA

Kimwipes[®] Papiertücher, fusselfrei; SafeSkin Einmahlhandschuhe

Knick, Berlin

pH-Meter 761 Calimatic

Kontron, Eching

Zweistrahls-Spektralphotometer Uvicon[®] 933, Uvicon[®] 933 Version 0.63-9725 Software-Paket

MDL Information Systems, Inc., San Ramon, USA

Isis[™]/Draw v2.4

Menzel-Gläser, Braunschweig

Objektträger (76 x 26 mm), Deckgläser (18 x 18 mm)

Millipore, Eschborn

Filtereinheiten Millex FG13, *Ultrafree-20* Nanopore-Wasser-Anlage

Minolta, Langenhagen

Minolta X-700 Spiegelreflexkamera

Sarstedt, Nümbrecht

Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2,0 ml, Röhrchen 50 ml, PCR-Gefäße (*Multiply*[®]- μ Strip, 8er-Kette), Petrischalen (92 x 16 mm und 150 x 20 mm)

Sartorius, Göttingen

Minisart NML Sterilfilter, Sartorius Universal U 4800P Feinwaage

Schott, Mainz

Glaswaren

Shimadzu, Weiterstadt

Zweistrahlspektrophotometer UV-1650-PC, *UVProbe v2.20 Software-Paket*

SPSS Inc., Chicago, USA

SigmaPlot 2002 v8.02, Software für wissenschaftliche EDV, Demoversion

Terumo, Leuven, Belgien

Syringe Spritzen, 5 ml, 10 ml, 30 ml

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim

pH-Meter-522

Zeiss, Oberkochen

Mikroskop Axioskop mit Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz (Filtersätze: 487902 und 487909) und Kameraaufsatz, Okulare: Vergrößerung 10 x, Sehfeldzahl 20, Objektive: Plan Neofluar 63 x/1,25 Oil, 440480, Plan Neofluar 100 x/1,25 Oil, 440460, Acroplan 20 x, 440845, Immersionsöl

Ziegra, Stockport, England

Eismaschine

2.8 Nährmedien zur Anzucht von *Escherichia coli*

dYT-Medium

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,6 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl

LB-Medium

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) 10 mM NaCl

SOB-Medium

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl.

SOC-Medium

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl. Nach dem Autoklavieren Zugabe von sterilfiltrierter Glukose auf eine Endkonzentration von 20 mM, sowie von sterilfiltriertem MgCl₂ und MgSO₄, jeweils auf eine Endkonzentration von 10 mM.

Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 120 °C autoklaviert.

Für feste Medien wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben.

Antibiotika wurden aus den entsprechenden 1000fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 25 mg/l Chloramphenicol, 100 mg/l Ampicillin bzw. 75 mg/l Kanamycin zugegeben.

2.9 Lösungen und Puffer

Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser, sterilfiltriert

Boratpuffer

0,1 M Natriumborat (hergestellt aus Borsäure und NaOH), pH 9,1

Chloramphenicol-Stammlösung

25 mg/ml Chloramphenicol in 96 % (v/v) Ethanol

dNTP-Stammlösung

je 100 mM dNTP (N = A, C, G, T), mit 1 M Tris-Base auf pH 7 eingestellt

dNTP-Stammlösung für die PCR

je 10 mM dNTP (N = A, C, G, T), aus dNTP-Stammlösungen mit Wasser verdünnt

E1 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA

E2 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

E3 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

3,2 M Kaliumacetat-Essigsäure, pH 5,5

E4 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat-Essigsäure, pH 5,0

E5 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat-Essigsäure, pH 5,0

E6 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

1,25 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5

Ethidiumbromid-Stammlösung (10x)

10 mg/ml Ethidiumbromid

Imidazol-Puffer

1 M Imidazol-HCl, pH 7,8

Invisorb[®]-Puffer (Invitek)

Die Zusammensetzungen der Puffer *Resuspension Solution*, *Alkaline Lysis Solution*, *Neutralization Solution*, *Binding Solution*, *Wash Buffer PL* sowie *Elution Buffer* sind vom Hersteller nicht angegeben.

IPTG-Stammlösung

1 M IPTG in Wasser, sterilfiltriert

Kaliumphosphatpuffer

100 mM Kaliumphosphat, pH 7,2, 10 mM MgSO₄

Natriumperiodatlösung

0,088 M Natriumperiodat

PBS-Puffer

140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄

Phenol/Chloroform

1 Vol Phenol/TE, 1 Vol Chloroform

Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas)

Blau: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂

Grün: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl

Orange: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl

Rot: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl

Gelb: 33 mM Tris-Acetat, pH 7,9, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat

Sucrosefarbmarker

60 % (w/v) Sucrose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 1 x TAE

Sucrosegradientenpuffer

100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl

T4-DNA-Ligase-Puffer

400 mM Tris-HCl, pH 7,8 bei 25 °C, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP

TBE-Puffer

89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8,0

“Tyramid-Reaktionspuffer”

90 % (v/v) 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2, 10 mM MgSO₄; 10 % (v/v) 1 M Imidazol-Puffer, pH 7,8; 0,001 % (v/v) H₂O₂

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit demineralisiertem Wasser (Millipore, Nanopore-Wasser-Anlage) angesetzt.

3. Methoden

3.1 Handhabung von Bakterien

3.1.1 Lagerung von *Escherichia coli*

Die verwendeten Bakterienstämme von *Escherichia coli* wurden zur längerfristigen Aufbewahrung nach Zugabe von 7% DMSO (v/v) als Gefrierkulturen bei -80 °C gelagert. Häufig verwendete Bakterienstämme wurden auf LB-Minimalagarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C angezogen und konnten so bei 4 °C für einige Wochen aufbewahrt werden.

3.1.2 Vermehrung von *Escherichia coli*

Alle verwendeten *E. coli* Stämme wurden bei 37 °C in dYT-Medium vermehrt. Im Falle Plasmid-vermittelter Resistenzen wurden die Medien mit den entsprechenden Antibiotika komplettiert. Bis zu einem Volumen von 5 ml wurden die Kulturen unter Rollen in Kulturröhrchen angezogen. Kulturen mit einem Volumen von 50 ml wurden bei 150 Upm unter einer Wärmehaube geschüttelt.

3.1.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) im Spektralphotometer bestimmt. Als Leerwert wurde unbeimpftes Medium verwendet. Die Kulturen wurden gegebenenfalls so verdünnt, daß die OD_{600} kleiner als 1 war. Die tatsächliche Dichte wurde dann aus dem gemessenen Wert errechnet.

3.1.4 Transformation von *Escherichia coli* durch Elektroporation

Zur Transformation von *Escherichia coli* wurde standardmäßig nach der Elektroporationsmethode^[235] verfahren. Zur einfachen Plasmid-Vermehrung und zur Vermehrung von Ligationsprodukten wurden 50 ml dYT-Medium mit dem entsprechenden Stamm von *Escherichia coli* von dYT-Agarplatte inokuliert und bis zu einer OD_{600} von ca. 0,5 herangezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Hettich-Kühlzentrifuge, 4.000 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet, in 30 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimalig wiederholt, wobei beim zweiten Mal in 20 ml, beim dritten Mal in 10 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert wurde. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in dem restlichen Wasser resuspendiert. Während der gesamten Prozedur wurden die Zellen auf Eis gehalten. Zur Transformation wurden 70 µl Zellsuspension mit einer zur gewünschten Transformantenzahl führenden DNA-Menge versetzt und in eine vorgekühlte

Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde im *Gene Pulser*[®] (BioRad) bei folgenden Einstellungen durchgeführt: 200 mA Stromstärke, 2,5 V Spannung, 6.250 V/cm Feldstärke, 5 s Impuls, 4,0 - 4,5 ms Zeitkonstante und Raumtemperatur. Unmittelbar nach dem Potentialpuls wurde 1 ml steriles dYT-Medium in die Elektroporationsküvette pipettiert und der Inhalt in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde dann für eine Stunde bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf LB-Selektivagarplatten ausgestrichen bzw. 50 ml selektives dYT-Medium mit der Kultur beimpft.

Zur Transformation von *Escherichia coli* mit Enzymbibliotheken wurden jeweils 12 identische Ligationsansätze verwendet. Dazu wurden 2 x 400 ml SOB-Medium mit dem entsprechenden Stamm von dYT-Agarplatte inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 herangezogen. Die Zellen wurden dann auf 16 Proben je 50 ml aliquotiert und wie im vorangegangenen Absatz beschrieben gewaschen. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen wieder vereinigt und schließlich auf 12 Aliquots verteilt. Die Transformationen erfolgten wie oben beschrieben, die Zellen wurden jedoch anschließend in 1 ml sterilem SOC-Medium aufgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Elektroporationsküvetten wurden dann noch 2 mal mit je 1 ml sterilem SOC-Medium gespült und dieses ebenfalls in dem 50 ml Röhrchen gesammelt. Die anschließende Inkubation von einer Stunde bei 37°C erfolgte unter Schütteln und einer Wärmehaube. Die Vermehrung der transformierten Zellen erfolgte auf großen (150 x 20 mm) SOC-Selektivagarplatten. Zur Bestimmung der Transformantenzahl wurden zusätzlich Verdünnungsplattierungen angefertigt.

3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Molekularbiologische Arbeitstechniken, die im Folgenden nicht explizit aufgeführt sind, wurden nach [236] durchgeführt.

3.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte wurden durch Erhitzen für 20 min auf 181 °C sterilisiert. Hitzestabile Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. In der Hitze nicht beständige Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt und getrocknet. Hitzelabile Bestandteile von Lösungen wurden als konzentrierte Stammlösungen hergestellt und vor der Zugabe zu bereits sterilen Lösungen durch einen Membranfilter der Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

3.2.2 Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen

3.2.2.1 Präzipitation von DNA mit Ethanol

Die Ethanolfällung diente der Konzentration von DNA und der Entfernung von Proteinen, Salzen und freien Nukleotiden. Proteine und Salze wurden zwar nicht vollständig, für viele Zwecke jedoch in ausreichendem Maße entfernt. Dabei wurde die Konzentration monovalenter Kationen erhöht, was durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante die Abstoßung des negativ geladenen Phosphodiester-Rückgrats verminderte, wodurch bei Lösungsmittelentzug durch Zugabe von Ethanol die DNA-Fällung ermöglicht wurde.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 1/10 Vol 7 M Ammoniumacetatlösung und 3 Vol 96 % Ethanol *p.A.* je nach zu erwartender DNA-Menge 5 bis 45 min bei -20 °C gefällt und danach bei 4 °C abzentrifugiert (Hettich-Kühlzentrifuge, 15.000 Upm, 10 min). Das Pellet wurde einmalig mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Ethanol wurde dann so gut wie möglich abgetrennt. Dazu wurden die Gefäße nach Entfernen des Überstandes offen 10 min bei 37 °C im Heizblock getrocknet. Anschließend wurde das DNA-Pellet je nach gewünschter Konzentration in einem entsprechenden Endvolumen von autoklaviertem, demineralisiertem Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

3.2.2.2 Präzipitation von DNA mit Isopropanol

DNA kann auch mit Isopropanol anstelle von Ethanol gefällt werden. Bei der Verwendung von Isopropanol wird dabei die Präzipitation von Salzen vermindert. Diese Art der Fällung bietet sich insbesondere dann an, wenn Salze aus der zu fällenden Lösung entfernt werden sollen. Dazu wurde analog zur Präzipitation mit Ethanol verfahren. Im Unterschied dazu wurden jedoch nur 0,7 Vol bis 1 Vol Isopropanol eingesetzt. Wie auch nach der Ethanolfällung wurde anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen.

3.2.3 Reinigung von DNA in wässrigen Lösungen durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

3.2.3.1 Präparation einer Phenollösung nach Grinsted und Bennett

500 g festes Phenol wurden in 130 ml Wasser, 7,5 ml 2 N NaOH und 6 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 gelöst. Zum Schutz vor Oxidation wurde 8-Hydroxychinolin (0,1 % (w/v)) hinzugefügt. Die Lösung wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.^[237] Die so präparierte Lösung wird im folgenden als Phenol, die Mischung aus je 50 % (v/v) Phenollösung und Chloroform als Phenol/Chloroform bezeichnet.

3.2.3.2 Reinigung von DNA durch Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform oder Chloroform

Um Proteine und andere hydrophobe Kontaminationen aus einer DNA-haltigen Lösung zu entfernen, wurde die Lösung mit Phenol und Chloroform extrahiert. Hierzu wurde die Lösung zuerst mit 1 Vol. Phenol versetzt und gründlich mit Hilfe eines Vortex-Mischers gemischt. Um die wässrige und die organische Phase zu trennen, wurde der Ansatz zentrifugiert (13000 Upm, 5 min, Raumtemperatur). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1 Vol. Phenol/Chloroform versetzt. Nach dem Mischen mit dem Vortex-Mischer wurde wie zuvor zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und einer Chloroform Extraktion, die analog den zuvor beschriebenen Extraktionen durchgeführt wurde, unterzogen. Die letzte Chloroform Extraktion diente der Entfernung von restlichem Phenol.

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von doppelsträngiger DNA wurde in Agarosegelen der Konzentration von 1 % (w/v) (Agarose in TBE-Puffer) durchgeführt. Die Agarose wurde im Puffer bis zum vollständigen Lösen in einem Mikrowellenofen aufgekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C wurde zum Anfärben von DNA in der Regel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Das noch flüssige Gel wurde anschließend in eine Flachbett-Gelkammer (100 x 7 x 0,5 mm), direkt in einen abgegrenzten Bereich gegossen und der Taschenkamm eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde der Taschenkamm entfernt und soviel TBE-Puffer hinzugefügt, bis das Gel komplett bedeckt war. Die Proben wurden mit mindestens 1/5 Vol Sucrosefarbmarker versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung zwischen 40 V und 130 V für 30 bis 60 min durchgeführt (5 bis 10 V/cm Feldstärke). Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im UV-Durchlicht (302 nm) durch Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Längen- und Konzentrationsbestimmung für die resultierenden DNA-Banden wurden DNA-Fragmentlängenstandards verwendet (DNA-Konzentration: 100 ng/µl).

3.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *Invisorb Spin DNA Extraction Kit* der Firma Invitex verwendet. Die DNA wurde mit einem unbenutzten Skalpell aus der Gelmatrix ausgeschnitten, wobei darauf geachtet wurde, die DNA so kurz wie möglich dem UV-Licht auszusetzen. Die restliche Präparation erfolgte nach dem Protokoll der Herstellerfirma. Schließlich wurde die DNA in 50 µl autoklaviertem, demineralisiertem Wasser aufgenommen.

3.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden *Kits* verwendet, die auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruhen. Dabei werden die Zellen zunächst durch Zentrifugation pelletiert und in einem RNase-haltigen Resuspensions-Puffer aufgenommen. Im zweiten Schritt werden die Zellen durch Zugabe eines Lyse-Puffer (enthält NaOH und SDS) lysiert und die DNA denaturiert. Durch Zugabe eines Neutralisierungs-Puffers (niedriger pH-Wert) wird der pH-Wert schließlich wieder in den neutralen Bereich abgesenkt, wobei genomische DNA und Proteine ausfallen, während Plasmid-DNA aufgrund ihrer topologischen Eigenschaften in Lösung bleibt. Nach Zentrifugation kann diese schließlich über eine Affinitätsmatrix isoliert werden.

Zur Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurde das *JetStar* Plasmidpräparations *Kit* der Firma Genomed verwendet. Es wurden Zellpellets aus 50 ml Übernachtskultur nach Herstellervorschrift aufgearbeitet. Die Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab wurde mit Hilfe des *Invisorb Spin Plasmid Mini Kit* der Firma Invitex durchgeführt. Hier wurde in der Regel von 2 ml einer stationären Übernachtskultur ausgegangen. Es wurde jeweils nach der Vorschrift des Herstellers verfahren.

3.2.7 Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen

Die Nukleinsäure-Konzentration einer wässrigen Lösung läßt sich durch die Messung der Absorption einer bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmen. Gemessen wurde in einem Zweistrahl-Spektralphotometer gegen Wasser oder TE-Puffer in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA, 35 $\mu\text{g/ml}$ RNA oder 33 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA. Durch zusätzliche Messung bei 280 nm können Rückschlüsse über die Reinheit der Lösung getroffen werden. Für eine proteinfreie Desoxyribonukleinsäurelösung sollte das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} ungefähr 2 : 1 sein.

3.2.8 Separation von DNA-Fragmenten mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation

Da die Aufreinigung von DNA-Fragmenten über ein Agarosegel die Effizienz einer nach Ligation erfolgenden Transformation deutlich herabsetzt, wurden Vektorfragmente zur Erzeugung von Enzymbibliotheken mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation gereinigt.

Über eine Gradienten-Mischkammer wurde dazu zunächst ein Gradient von 10-30% Sucrose (in Sucroседichtenpuffer) in einem Ultrazentrifugenröhrchen hergestellt. Maximal 100 μg verdaute DNA wurden in einem Volumen von höchstens 200 μl (in Wasser) vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen und anschließend bis zum Rand des Röhrchens mit Paraffin überschichtet. Das Röhrchen wurde auf $\sim 1\text{mg}$ genau tariert in den SW41TI-Schwenkbecherrotor geladen und in der Beckman OptimaTM LE-80K Ultrazentrifuge im Vakuum zentrifugiert (30.000 Upm, 21 h, 15 °C). Anschließend wurde das Röhrchen

vorsichtig aus dem Rotor genommen und mit einer Kanüle (0,55 x 25 mm) am Boden des Röhrchens angestochen. Durch Austropfen des Gradienten wurden 20 Fraktionen von ca. 500 µl erhalten, von denen Aliquots direkt auf einem Agarosegel analysiert wurden. Die gewünschten Fraktionen wurden letztlich mit Ethanol präzipitiert.

3.3 Enzymatische Manipulation von DNA

3.3.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom jeweiligen Hersteller des Enzyms empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen verdaut. Simultane Spaltungen mit mehreren Enzymen wurden unter den Pufferbedingungen durchgeführt, bei denen die Enzyme laut Hersteller mindestens 50 % Aktivität aufwiesen. War ein Mehrfachverdau aufgrund abweichender Pufferanforderungen nicht möglich, wurden die Verdaus nacheinander unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Die DNA wurde in der Regel in einer Endkonzentration des Spaltungsansatzes von 100 ng/µl mit 1 - 2 Einheiten Enzym pro Mikrogramm DNA für 1 h inkubiert.

3.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit einem bis zu fünffachen molaren Überschuss an DNA-Insert-Fragment gegenüber dem DNA-Vektor-Fragment durchgeführt. Es wurde ausschließlich T4-DNA Ligase und der von MBI Fermentas mitgelieferte T4-DNA Ligasepuffer verwendet. Im allgemeinen wurden pro Ligation 2-4 Einheiten Ligase in einem Endvolumen von 20 - 40 µl verwendet. Die Reaktion erfolgte in der Regel über Nacht bei ca. 15 °C im Kühlschrank. Der Ligationsansatz wurde vor einer Transformation von *E. coli* Zellen mit Ethanol präzipitiert (3.2.2.1) und in 20 µl sterilem demineralisiertem Wasser aufgenommen.

3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion^[238-240] steht eine potente *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zur Verfügung. Mit ihr ist es möglich, aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus selektiv eine DNA-Matrize zu vervielfachen. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA-Vorlage durch Erhitzen in einzelsträngige DNA überführt (Denaturierung). Beim Absenken der Temperatur lagern sich zwei Oligonukleotid-Primer an die Matrizen-DNA an (*primer annealing*) und flankieren die zu amplifizierenden komplementären Zielregionen. Die Primer werden mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase komplementär zur ursprünglichen Duplex-DNA bei hoher Temperatur verlängert (*primer extension*), um unspezifische Hybridisierung der Primer an die

Matrize zu verhindern. Es wird eine bestimmte Anzahl an Amplifikationszyklen durchgeführt, wodurch sich die durch die beiden *Primer* flankierte DNA-Region akkumuliert.

Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 μl durchgeführt. Als Matrize wurden ca. 5 - 10 ng DNA eingesetzt, in Einzelfällen war die DNA-Menge höher (bis 100 ng). Ein Standard-Ansatz enthielt des Weiteren 10 pmol eines jeden *Primers*, 5 μl 10 x Taq DNA Polymerasepuffer (MBI Fermentas) und 0,2 mM dNTPs. Die Gefäße wurden mit PCR-Wachs überschichtet, um die Evaporation der Flüssigkeit während der Amplifikationszyklen zu verhindern. Nachdem der Reaktionsansatz im PCR-Gerät für 2 min auf 98 °C erhitzt wurde, erfolgte die Zugabe von einer Einheit Taq DNA Polymerase. Diese Abwandlung der PCR, bei der die Matrize zuerst denaturiert wird, wird als *Hot-Start-PCR* bezeichnet und ermöglicht eine höhere Spezifität durch Vermeidung von *Primer*-Fehlpaarungen.^[241]

Die Länge und die Temperatur der einzelnen Reaktionsschritte der PCR-Zyklen, sowie deren Anzahl wurde durch die Wahl der Matrize, die Basenzusammensetzung und Länge der *Primer*, sowie durch die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt. Die Elongationsreaktion wurde bei 72 °C für 60 s pro 1000 bp durchgeführt. Die Anzahl der Zyklen betrug in der Regel 30. Die Schmelztemperatur T_M eines Oligonukleotids wurde nach folgender empirischer Formel (3.1) berechnet, welche sowohl den relativen G/C-Gehalt (% G/C) als auch die Länge der Oligonukleotide (n) mit einbezieht:

$$T_M [\text{°C}] = 69,3 + 0,41 \cdot (\% \text{ G/C}) - \frac{650}{n} \quad (3.1)$$

Die errechnete Temperatur lag in der Regel zwischen 45 °C und 60 °C. Die optimale *Annealing*-Temperatur T_A für eine Polymerasekettenreaktion wurde nach (3.2) bestimmt.

$$T_A = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3 \text{°C} \quad (3.2)$$

T_{M1} und T_{M2} stehen dabei für die Schmelztemperaturen der beiden verwendeten *Primer*. Die zyklische Denaturierung erfolgte bei jeder PCR für 30 s bei 94 °C.

In einigen Fällen konnte das zu generierende PCR Produkt nicht in einem Schritt hergestellt werden bzw. sollte eine Restriktionsschnittstelle in der Mitte des Produktes erzeugt werden. Hier wurde eine zweistufige *SOE-PCR* (*splicing by overlap extension*) durchgeführt. Dazu wurden in einem ersten Amplifikationsschritt zunächst mit zwei außen und zwei innen hybridisierenden Oligonukleotiden zwei Fragmente generiert. Die beiden inneren *Primer* wurden dabei so definiert, daß die beide Fragmente eine Überlappung von 22-24 Basen aufwiesen. Nach Reinigung der Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.5) wurden diese in etwa gleichen Mengen als Matrize in einer zweiten PCR-Reaktion mit den beiden äußeren Oligonukleotiden eingesetzt. Das entstehende Endprodukt wurde schließlich mittels Phenol/Chloroform Extraktion (3.2.3.2.) und anschließender Ethanol Präzipitation (3.2.2.1.) für nachfolgende Anwendungen gereinigt.

3.4 Proteinchemische Arbeitsmethoden

3.4.1 Oxidation und Reinigung von Meerrettich-Peroxidase

Zur kovalenten Kopplung von Peroxidase auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen wurde ein Verfahren eingesetzt, das auch für die Konjugation von Peroxidase an Proteine verwendet wird. Die endständigen Zuckerreste der glycosylierten Meerrettich-Peroxidase werden dafür durch das milde Oxidationsmittel Natrium(meta)periodat zu Aldehyden oxidiert, ohne daß die katalytische Aktivität des Enzyms verloren geht (Abb. 3.1).^[242]

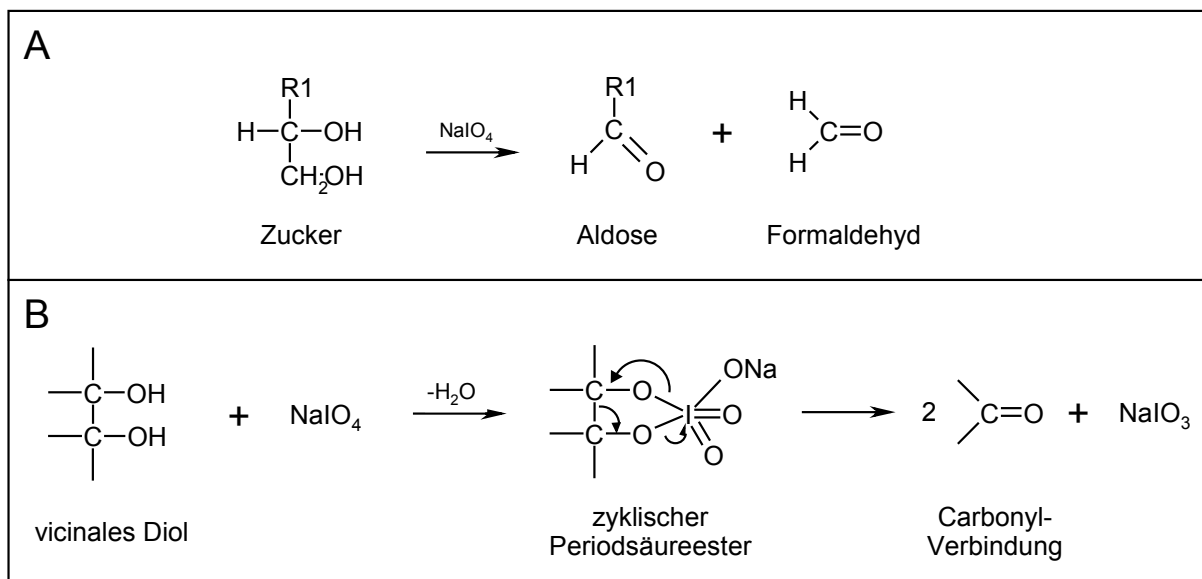


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der Oxidation von Zuckern zu Aldehyden mittels Natriumperiodat. **(A)** Allgemeines Reaktionsschema: Durch die oxidative Spaltung entsteht Formaldehyd und eine neue, um ein Kohlenstoffatom verkürzte Aldose. **(B)** Reaktionsmechanismus der oxidativen Spaltung vicinaler Dirole mittels Natriumperiodat: Die Umsetzung verläuft über einen zyklischen Periodsäureester, der über einen aromatischen sechs-Elektronen Übergangszustand zerfällt (Abbildung modifiziert nach [243]).

Zur Oxidation wurden 10 µl Natriumperiodatlösung (0,088 M) zu 100 µl Meerrettich-Peroxidase (10 mg/ml, in H₂O) gegeben. Der Ansatz wurde anschließend 1 h abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Das Fortschreiten der Reaktion ließ sich anhand eines Farbumschlags nach grün der ansonsten braungefärbten Peroxidase verfolgen. Zur Reinigung des Enzyms und Separation des cytotoxischen Periodats wurde der Ansatz anschließend auf eine fertig gepackte Sephadex G-25 Gelfiltrationssäule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) geladen. Diese wurde vorher mit 5 ml 0,1 M Boratpuffer pH 9,1 äquilibriert. Nach Durchlauf wurde die grüne Peroxidase-Fraktion aufgefangen und mit Boratpuffer auf ein Endvolumen von 1 ml gebracht (Konzentration ca. 1 mg/ml). Bis zur Verwendungen wurde das oxidierte Enzym bei -20 °C in einem abgedunkelten 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufbewahrt.

3.5 Enzymatische Aktivitätstests

3.5.1 Herstellung von Tributyrinagar

Zum Nachweis von extrazellulärer Esteraseaktivität (4.1.2.1.) wurden nach [244] Tributyrinagarplatten gegossen. Tributyrin ist das Triacylglycerid der Butansäure und somit ein Substrat für Lipasen und Esterasen, da es mit geringem Anteil (0,01 %) auch in Wasser löslich ist.^[245] Dazu wurden 7,5 ml Tributyrin und 0,75 g *Gummi arabicum* mit sterilem demineralisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 15 ml gebracht und sorgfältig vermischt. Anschließend wurde die Suspension mittels Ultraschall (3 min, 75 W) emulgiert und dann in 500 ml autoklavierten LB-Agar (auf ca. 60 °C abgekühlt) gemischt. Zur Induktion der Expression relevanter Gene wurde der Agar zusätzlich mit 1 mM IPTG komplettiert.

3.5.2 Esterolytische Aktivitätsbestimmungen

Carbonsäureester des p-Nitrophenols sind ein Standard-Substrat für esterolytische Aktivitätstests.^[50] Die mit einer Hydrolyse von p-Nitrophenylestern einhergehende Produktbildung von p-Nitrophenol lässt sich anhand eines Farbumschlags nach gelb verfolgen. Dieser kann durch die spektralphotometrische Messung der Absorption bei 410 nm registriert und aufgezeichnet werden (Abbildung 3.2).

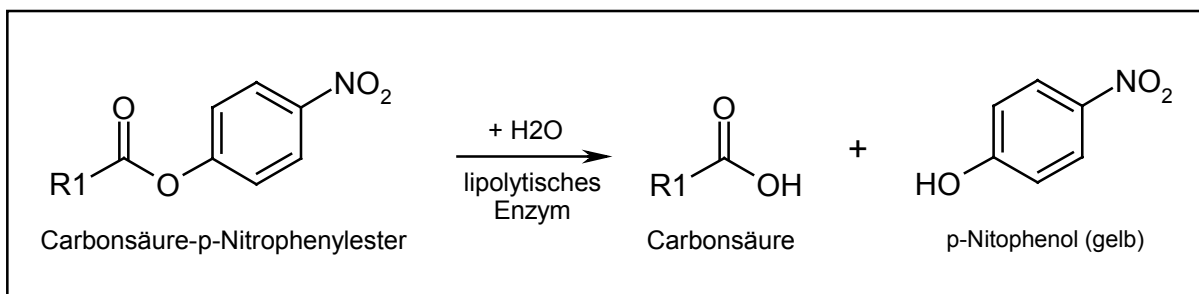


Abb. 3.2: Hydrolyse eines Carbonsäure-p-Nitrophenylesters katalysiert durch ein lipolytisches Enzym. Als Produkte entstehen unter Verbrauch von Wasser die freie Carbonsäure und p-Nitrophenol, was sich durch einen Farbumschlag nach gelb bemerkbar macht.

Da die verwendeten p-Nitrophenylester nicht wasserlöslich waren, mussten diese im Vorfeld einer Messung emulgiert werden. Dazu wurden ca. 12,4 µmol des entsprechenden Substrats in 500 µl Ethanol gelöst und gemischt. Diese Suspension wurde anschließend komplett in 10 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2, mit 10 mM MgSO₄) gegeben und sorgfältig durchmischt (Substratkonzentration: 0,001 mol/l). Zur Messung wurden 150 µl (0,18 µmol) der entstandenen Emulsion eingesetzt.

3.5.2.1 Bestimmung der esterolytischen Aktivität oberflächenpräsentierter lipolytischer Enzyme

Zur Bestimmung der esterolytischen Aktivität lipolytischer Enzyme auf *E. coli* Zelloberflächen wurden die zu untersuchenden Zellen wie in Abschnitt 3.1.2. beschrieben angezogen und die Expression der relevanten Gene induziert (3.6.1). Anschließend wurde 1 ml Zellsuspension abgenommen, pelletiert (13.000 Upm, 2 min) und in 1 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2, mit 10 mM MgSO_4) resuspendiert. Zur Gewährleistung einer möglichst identischen Zellmenge bei jeder Messung wurde die optische Dichte der zu untersuchenden Proben bei 600 nm mit Kaliumphosphatpuffer auf einen Wert von 0,4 eingestellt. Als Referenz diente 1 ml Kaliumphosphatpuffer ohne Zellen. Gemessen wurde je 1 ml Zellsuspension. Dazu wurden von den zu untersuchenden Substraten Emulsionen hergestellt (3.2.5). Aus diesen wurden zur Messung 150 μl (0,18 μmol) abgenommen, zur entsprechenden Probe direkt in eine Einmalküvette pipettiert (diese wurde vorher in das Spektralphotometer gestellt) und eingemischt. Unmittelbar danach wurde die Absorption bei 410 nm am Spektralphotometer (Shimadzu Zweistrahl-Spektralphotometer 1650-PC) auf null eingestellt. Die Absorptionsänderung bei 410 nm wurde für 60 min bei Raumtemperatur mit dem zum Photometer gehörigen *Softwarepaket* (*UVProbe v2.20*) aufgezeichnet.

Die Berechnung der Substrathydrolyseraten in nmol/min erfolgte bei Zelloberflächenpräsentierten Enzymen anhand einer Referenzgeraden. Dazu wurden steigende Mengen p-Nitrophenol jeweils in einem Endvolumen von 150 μl in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2, mit 10 mM MgSO_4) gelöst und zu jeweils 1 ml Zellsuspension der OD_{600} von 0,4 (in selbigem Puffer) pipettiert. Die spektralphotometrischen Messungen der Absorptionen bei 400 nm einer jeden Probe erfolgten gegen 1 ml Zellsuspension, zu dem lediglich 150 μl Puffer pipettiert wurden. Die Referenzgerade ergab sich durch die Auftragung der errechneten Mengen p-Nitrophenol gegen die gemessenen Absorptionen (Abb. 3.3).

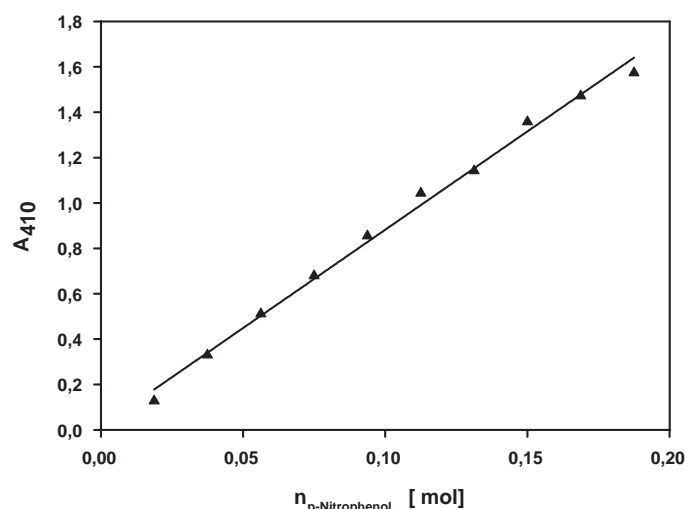


Abb. 3.3: Referenzgerade zur Bestimmung der Hydrolyseraten zelloberflächenpräsentierter lipolytischer Enzyme. Aufgetragen sind die errechneten Mengen an p-Nitrophenol (n) in den verschiedenen Proben gegen die gemessene Absorption bei 410 nm (A_{410}). Die Berechnung der linearen Regressionsgeraden erfolgte mit Hilfe des Programms *SigmaPlot* (SPSS Inc.).

Für die mittels linearer Regression erzeugte Referenzgerade wurde folgende Gleichung ermittelt:

$$y = 8,666x + 0,015 \quad (3.3)$$

Anhand der für jede Aktivitätsmessung erstellten linearen Regressionsgeraden des Substrathydrolyseverlaufs erfolgte die Berechnung der Absorptionsänderung pro Minute. Diese wurde dann mit Hilfe von Gleichung 3.3 zur Berechnung der Hydrolyserate in nmol/min herangezogen. Die berechneten Werte repräsentieren dabei jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer Optischen Dichte bei 600 nm von 0,4.

3.5.2.2 Bestimmung der esterolytischen Aktivität in Kulturüberständen

Zur Bestimmung esterolytischer Aktivität in Kulturüberständen wurden die zu untersuchenden Zellen, wie in Abschnitt 3.1.2. beschrieben, angezogen und die Expression der relevanten Gene induziert (3.6.1). Anschließend wurde 1 ml Zellsuspension abgenommen und aus Gründen der Vergleichbarkeit mit sterilem Medium auf eine optische Dichte bei 600 nm von 0,4 eingestellt. Die Zellen wurden anschließend pelletiert (13.000 Upm, 2 min) und 200 µl des Überstands in eine Einmalküvette mit 800 µl 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2, mit 10 mM MgSO₄) eingebracht und durchmischt. Es erfolgte die Zugabe von 150 µl emulgiertem Substrat (3.5.2). Die Messung und Aufzeichnung der Substrathydrolyse wurde im Spektralphotometer, wie in Abschnitt 3.5.2.1 beschrieben, durchgeführt.

Die Berechnung der Substrathydrolyseraten in nmol/min erfolgte bei zellfreien Analysen anhand der für jede Messung erstellten linearen Regressionsgeraden des Hydrolyseverlaufs und des molaren Extinktionskoeffizienten des p-Nitrophenols bei pH 7,2 und 410 nm mit einem Betrag von 17,5/cm[nmol/µl].^[246] Die resultierenden Werte repräsentierten die Aktivität in 200 µl Überstand und wurden dann zum Vergleich mit den Aktivitätsmessungen oberflächenpräsentierter Enzyme auf 1 ml hochgerechnet.

3.5.2.3 Bestimmung der esterolytischen Aktivität von Zelllysaten

Zur Bestimmung esterolytischer Aktivität in Zelllysaten wurden die zu untersuchenden Zellen, wie in Abschnitt 3.1.2. beschrieben, angezogen und die Expression der relevanten Gene induziert (3.6.1). Anschließend wurde 1 ml Zellsuspension abgenommen und aus Gründen der Vergleichbarkeit mit sterilem Medium auf eine optische Dichte bei 600 nm von 0,4 eingestellt. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels Ultraschallbehandlung (*Branson Sonifier W-250*, 3 mal 3 min, 40 %, Stufe 2, auf Eis). 200 µl des Lysats wurden anschließend in eine Einmalküvette mit 800 µl 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2, mit 10 mM MgSO₄) eingebracht und durchmischt. Es erfolgte die Zugabe von 150 µl emulgiertem Substrat (3.5.2). Die Messung und Aufzeichnung der Substrathydrolyse wurde im Spektralphotometer, wie in

Abschnitt 3.5.2.1 beschrieben, durchgeführt. Die Berechnung der Substrathydrolyseraten in nmol/min erfolgte wie in Abschnitt 3.5.2.2 beschrieben.

3.5.2.4 Bestimmung der Enantioselektivität oberflächenpräsentierter lipolytischer Enzyme

Für die Bestimmung der Enantioselektivität in Form des apparenten E -Wertes wurden die zu untersuchenden Zellen, wie in Abschnitt 3.1.2. beschrieben, angezogen und die Expression der relevanten Gene induziert (3.6.1). Anschließend wurden 20 ml Zellsuspension abgenommen, pelletiert (13.000 Upm, 2 min) und in 20 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2, mit 10 mM $MgSO_4$) resuspendiert. Zur Vergleichbarkeit verschiedener Messungen wurde die optische Dichte der zu untersuchenden Zellsuspension bei 600 nm mit Kaliumphosphatpuffer auf einen Wert von 0,4 eingestellt. Als Referenz diente 1 ml Kaliumphosphatpuffer ohne Zellen. Danach wurden je 10 ml der so erstellten Zellsuspension auf zwei 13 ml Röhrchen verteilt. In jedes Röhrchen wurden dann 1,5 ml Substratemulsion (1,8 μ mol) von jeweils einem der enantiomere *p*-Nitrophenylester pipettiert. Von diesen wurden vorher identische Mengen separat emulgiert (3.5.2). Zu verschiedenen Zeitenpunkten wurde dann von beiden Proben jeweils 1 ml abgenommen und die Hydrolysereaktionen durch Sedimentation der Zellen abgestoppt (13.000 Upm, 2 min). Die Überstände wurden unmittelbar darauf abgenommen, in eine Küvette überführt und spektralphotometrisch bei 410 nm gegen Kaliumphosphatpuffer vermessen. Die Meßzeitpunkte waren 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min und 240 min. Die erhaltenen Absorptionswerte beider Substratenantimere wurden dann gegen die Meßzeitpunkte aufgetragen. Die Änderungen der OD_{410}/min wurden mit Hilfe des *SigmaPlot Software*-Pakets durch lineare Regression bestimmt. Der Quotient der erhaltenen Werte bildete den apparenten E -Wert.^[146,247] Die Berechnung der Hydrolyseraten für beide Substratenantimere erfolgte ebenfalls anhand der $\Delta OD_{410}/min$ -Werte und des molaren Extinktionskoeffizienten des *p*-Nitrophenols bei pH 7,2 und 410 nm mit einem Betrag von 17,5/cm[nmol/ μ l].^[246]

3.6 Zellbiologische Arbeitsmethoden

3.6.1 Induktion plasmidkodierter Genexpression in *Escherichia coli* Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Plasmide verwendet, die eine regulierte Expression kodierter Gene erlaubten. Verwendet wurde dabei die lac-Promotor/Operatorregion sowie der T7-Promotor. Gene, die unter Kontrolle des T7-Promotors standen, wurden in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) exprimiert.^[213] Dieser besitzt das Gen der RNA-Polymerase des T7-Phagen im Genom integriert, wiederum unter der Kontrolle des lac-Promotors.

Die Induktion der Expression regulierbarer plasmidkodierter Gene erfolgte bei einer optischen Dichte von 0,5 bei 600 nm durch die Zugabe von 1 mM IPTG. Zur Produktion betreffender Genprodukte wurden die induzierten Zellen für weitere 60 min bei 37 °C inkubiert.

3.6.2 Immunfluoreszenzmarkierung von *Escherichia coli* Zellen

Zum Nachweis zelloberflächenpräsentierter Proteine wurden Immunfluoreszenzmarkierungen mit entsprechend spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden 300 µl einer induzierten Kultur (3.6.1) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert (13000 Upm, 1 min, RT) und in 10 µl des betreffenden Primärantikörpers (1:10-verünnt in PBS) aufgenommen. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 500 µl PBS und eine weitere Zentrifugation. Die pelletierten Zellen wurden dann in 10 µl eines entsprechenden Sekundärantikörpers (1:10-verünnt in PBS) aufgenommen und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Je nach Herkunft des Primärantikörpers handelte es sich hierbei um ein Anti-Maus oder Anti-Kaninchen IgG (*whole molecule*)-Biotin-Konjugat (Fa. Sigma-Aldrich). Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von 500 µl PBS und Zentrifugation gewaschen, in 10 µl Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat (1:10-verdünnt in PBS) aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Diese Inkubation erfolgte abgedunkelt, um ein Ausbleichen des R-Phycoerythrins zu vermeiden. Die Zellen wurden im Anschluß erneut mit 500 µl PBS gewaschen, bevor sie nach der letzten Zentrifugation in 20 µl sterilem PBS-Puffer aufgenommen wurden. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der markierten Zellen abgedunkelt auf Eis.

3.6.3 Fluoreszenzmarkierung von *Escherichia coli* Zellen mit Tyramidestern

Zur Markierung von *E. coli* Zellen mit veresterten Tyramid-Konjugaten wurde je 1 ml induzierte Zellen pelletiert (13000 Upm, 1 min, RT) und in 1 ml PBS resuspendiert. Zur Gewährleistung ähnlicher Zellzahlen in jedem Markierungsansatz wurden die Proben dann gegen PBS auf eine optische Dichte von 0,5 bei 600 nm eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Aufnahme der Zellen in 150 µl oxidiertes Meerrettich-Peroxidase (3.4.1) und eine Inkubation für 60 min abgedunkelt unter Schütteln bei Raumtemperatur. Die durch die Oxidation entstandenen Aldose der Peroxidase-Glycosylierung können nun aufgrund ihrer Aldehydfunktionen mit Aminogruppen auf der Zelloberfläche unter Ausbildung von „Schiff'schen Basen“ (Iminen) reagieren, was zur kovalenten Kopplung der Peroxidase auf der Zelloberfläche führt.^[215,216] Nach dreimaligem Waschen der Zellen durch Zugabe von je 500 µl PBS und Zentrifugation wurden die Pellets anschließend in 1 ml „Tyramidreaktionspuffer“ (90 % (v/v) 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2; 10 mM MgSO₄; 10 % (v/v) 1 M Imidazol-Puffer, pH 7,8; 0,001 % (v/v) H₂O₂) resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 1,14 nmol Tyramidester in 10 µl aminfreiem Dimethylformamid (Endkonzentration: 1,14 µM). Bei simultanen Markierungen mit unterschiedlichen Tyramidestern wurden diese in Mischung bis zu einer Ester-Endkonzentration von 1,14 µM eingesetzt

(je 0,57 nmol). Die anschließende Inkubation erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, für 5 min bei Raumtemperatur. Die Reaktionen wurden dann durch Zugabe von 100 µl 500 mM Tyraminlösung gestoppt, abzentrifugiert und mit 300 µl PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 10 µl konjugiertem Fluoreszenzfarbstoff (1:10-verünnung in PBS) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Im Falle einer Markierung mit Biotin-Tyramidestern handelte es sich dabei um Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat. Bei Markierungen mit 2,4-Dinitrophenyl-Tyramidestern wurde ein anti-Dinitrophenyl Antikörper-Alexafluor488-Konjugat verwendet. Simultane Markierungen mit beiden Tyramid-Spezies wurden mit einem 1:1-Gemisch beider Farbstoff-Konjugate (je 1 µg) inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluß erneut mit 300 µl PBS gewaschen, bevor sie nach der letzten Zentrifugation in 20 µl sterilem PBS-Puffer aufgenommen wurden. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der markierten Zellen abgedunkelt auf Eis.

3.6.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von markierten *Escherichia coli* Zellen

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden 5 µl entsprechend markierter Zellen auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt und auf dem Objektisch des Fluoreszenzmikroskops (Zeiss *Axioskop*) arretiert. Die Untersuchung erfolgte in der Regel mit einem *Acroplan 20x* Objektiv. Die Lichtbildaufnahmen eines Gesichtsfeldes wurden abwechselnd mit Phasenkontrast- bzw. Fluoreszenzbeleuchtung durchgeführt. Dabei wurde für die Aufnahmen im Phasenkontrast eine maximale Durchlichtbeleuchtung sowie die Funktion der Belichtungszeitautomatik an der Kamera (*Minolta X-700*, Spiegelreflex) gewählt. Für die Aufnahmen im Fluoreszenzlicht wurden manuelle Belichtungszeiten von 30 s, 60 s, 90 s und 120 s durchgeführt und die Aufnahmen mit den besten Ergebnissen ausgewählt. Der verwendete Film (AGFA *Vista 200*) hatte eine Empfindlichkeit von 200 (ISO).

3.6.5 Durchflußzytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von *Escherichia coli* Zellen

Für durchflußzytometrische Analysen und fluoreszenzaktivierte Zellsortierungen wurde ein *MoFlo*-Zellsortiergerät (*FACS*) der Firma Dako Cytomation verwendet. Der Strahlengang des *FACS* wurde unter Verwendung fluoreszierender *MicroBeads* (Fa. Beckman Coulter) justiert und fokussiert und die Photomultiplier auf die Werte 750 (*side scatter*), 600 (FL1: Alexafluor488-Fluoreszenz) und 600 (FL2: R-Phycoerythrin-Fluoreszenz) eingestellt. Die Anzahl der Ereignisse wurde bei einer Tropfenfrequenz zwischen 95.000 und 100.000 pro Sekunde auf maximal 30.000 pro Sekunde begrenzt. Es wurden bei jeder Analyse 300.000 Ereignisse vermessen. Die Datenverwaltung erfolgte mit dem Softwarepaket *Summit*[®] v4.0.

Für Sortierungen wurde zusätzlich zur Justierung des Strahlengangs und des Flüssigkeitsstrahls der Tropfenabrißpunkt eingestellt und die Tropfenverzögerung kalibriert. Sortiert wurde grundsätzlich im *single-sort*-Modus. Positive Zellen wurden entweder in 5 ml

Röhrchen sortiert oder mit Hilfe des *CyClone*-Einzelablagearms auf Agarplatten vereinzelt. Bei Sortierungen mit unterschiedlichen Selektionsfenstern wurde simultan in zwei verschiedene 5 ml Röhrchen sortiert. Die Frequenz der Ereignisse betrug bei Sortierungen zwischen 5.000 und 25.000 pro Sekunde bei einem Probedruck von 57 bis 59 psi.

3.6.6 Bestimmung der Überlebensraten Expressions-induzierter *Escherichia coli* Zellen

Zur Bestimmung der Überlebensraten Expressions-induzierter Zellen wurden die zu untersuchenden Spezies sowie Zellen des gleichen Stammes, die einen Kontrollvektor (pBBR1MCS, 2.2.2) beinhalteten, wie in Abschnitt 3.1.2. beschrieben, angezogen und die Expression der relevanten Gene induziert (3.6.1). Von jeder Kultur wurden dann 100 µl pelletiert (13000 Upm, 1 min, RT) und in 1 ml PBS resuspendiert. Von den so erstellten Zellsuspensionen wurden anschließend je 3 x 144 Einzelklone mit Hilfe des *CyClone*-Einzelablagearms des *MoFlo*-Zellsortiergeräts auf LB-Selektivagarplatten ausgebracht (3.6.5). Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht erfolgte die Bestimmung der Anzahl angewachsener Kolonien jeder Probe. Diese wurde letztlich zur Bestimmung der Überlebensraten mit der Anzahl angewachsener Kolonien der Kontrollkultur in Relation gesetzt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die folgenden Kapitel erläutern die Entwicklung und experimentelle Überprüfung eines Hochdurchsatz-Verfahrens zur Isolierung von Varianten lipolytischer Enzyme mit veränderter Enantioselektivität. Das hier vorgestellte Verfahren basiert auf der funktionalen Präsentation lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen und stellt eine Weiterentwicklung des „*ESCAPED*“-Verfahrens dar (1.4), welches bereits eine effektive Anreicherung von Esterase präsentierenden Zellen aus einem Überschuss an Esterase defizienten ermöglichte.^[215,216] Kapitel 4.1 befasst sich zunächst mit der Entwicklung eines allgemeinen Verfahrens zur Präsentation unterschiedlicher lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen in katalytisch aktiver Form. Die Modifikation des *ESCAPED*-Verfahrens, um es einer Nutzung als Methode zur Isolierung von Varianten mit veränderter Substratspezifität zugänglich zu machen, sowie die experimentelle Überprüfung dieses Zugangs sind Gegenstand von Kapitel 4.2. Das abschließende Kapitel 4.3 befasst sich als Exkurs mit der indirekten Präsentation eines lipolytischen Enzyms auf der *E. coli* Zelloberfläche und zeigt Wege der Nutzung eines solchen Ansatzes auf.

4.1 Aufbau und Untersuchung eines allgemeinen Verfahrens zur Präsentation lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von E. coli Zellen

Das hier dargestellte Verfahren zur Präsentation unterschiedlicher lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen nutzt die Esterase EstA aus *P. aeruginosa* als „Präsentations-Mediator“. Dies geschieht mittels aminoterminaler Fusion der Zielproteine an eine esterolytisch inaktive Variante von EstA (EstA*). Das Verfahren nutzt dabei zwei Eigenschaften dieses Proteins: (i) Als Typ V_a-Autotransporter vermittelt die carboxyterminale Domäne von EstA die Translokation der aminoterminalen Domäne durch die äußere Zellmembran. (ii) Die carboxyterminale Domäne bleibt dabei in der äußeren Membran verankert und bildet somit eine Art „Sockel“ für die in das extrazelluläre Medium ragende aminoternale Domäne und daran fusionierte Passagierdomänen. Eine schematische Darstellung des EstA*-Konstrukts ist in Abbildung 4.1 wiedergegeben.

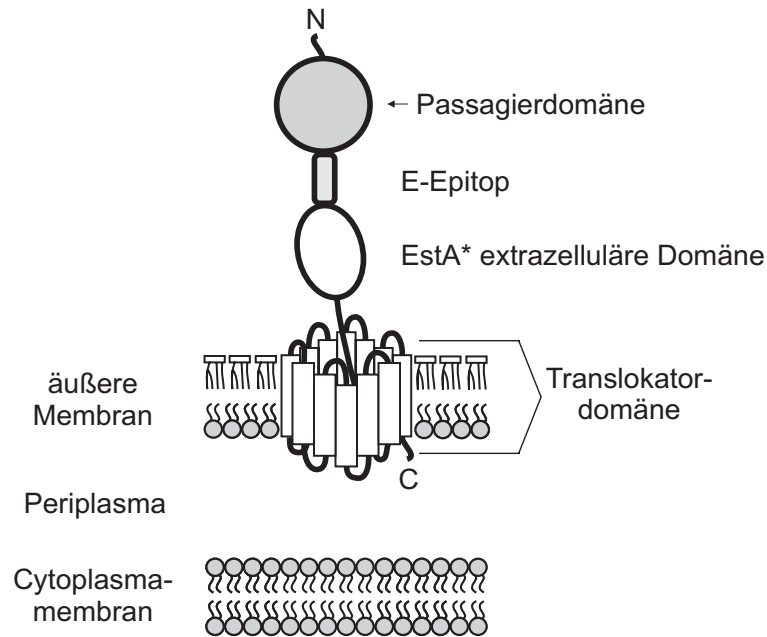


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Autotransporter EstA*-Konstrukts zur Präsentation heterologer Passagierproteine auf der *E. coli* Zelloberfläche. EstA* besteht aus einer in der äußeren Zellmembran eingebetteten carboxyterminalen Translokator-domäne und einer verkürzten enzymatisch inaktiven extrazellulären Esterasedomäne. Zwischen der aminoterminalen Passagierdomäne und der extrazellulären Domäne von EstA* wurde zum Nachweis der Oberflächenpräsentation mittels Immunfluoreszenzmarkierung ein E-Epitop eingefügt (Abbildung modifiziert nach [248]).

Zur Demonstration der funktionalen Produktion und Oberflächenexposition derartiger Fusionsproteine wurden die Lipase LipA aus *Bacillus subtilis*,^[249] die Lipase aus *Serratia marcescens*^[250] und die Cutinase aus *Fusarium solani pisi*^[251] als Passagierproteine ausgewählt.

4.1.1 Konstruktion von Expressionsvektoren zur Präsentation verschiedener lipolytischer Enzyme auf *E. coli* Zellen

Zur Produktion und Oberflächenpräsentation unterschiedlicher lipolytischer Enzyme auf der *E. coli* Zelloberfläche wurde das Plasmid pEst100 (2.2.3) freundlicherweise von Alexander Wentzel zur Verfügung gestellt. Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz einer esterolytisch inaktiven Variante von EstA (EstA*) unter der Kontrolle des P_{lac} -Promotors. Zur effizienten Translokation durch die Cytoplasmamembran von *E. coli* wurde die native Signalsequenz von EstA gegen die der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* ersetzt. Zusätzlich wurde zwischen Signalsequenz und der Sequenz des reifen EstA* die kodierende Sequenz für ein 43 Aminosäuren umfassendes „Linker-Peptid“ eingeführt. Diese Sequenz ist flankiert von *SfiI* Restriktionserkennungsstellen, die nicht-komplementäre DNA-Überhänge nach einem Verdau mit dem Restriktionsenzym *SfiI* generieren. Dies verhindert die Ligation des Vektorfragments und erlaubt den effizienten Einbau von Nukleotidsequenzabschnitten für Passagierdomänen, die wiederum von entsprechenden *SfiI* Erkennungsstellen flankiert sind. Vor der kodierenden Sequenz von EstA* befindet sich zusätzlich die Sequenz eines E-Epitops (GAPVPYPDPLEPR^[179]) zum immunhistochemischen Nachweis der Oberflächen-

präsentation über einen spezifischen Antikörper. Zur Inaktivierung der esterolytischen Aktivität der aminoterminalen Domäne wurde diese um 144 Aminosäuren verkürzt. Die Deletion beginnt mit der katalytisch aktiven Aminosäure Serin #14. Dies soll außerdem durch die Verkürzung des insgesamt zu translozierenden Bereichs die Effizienz der Oberflächenpräsentation erhöhen.^[177,179] Abbildung 4.2 zeigt eine schematische Darstellung des Vektors pEst100.

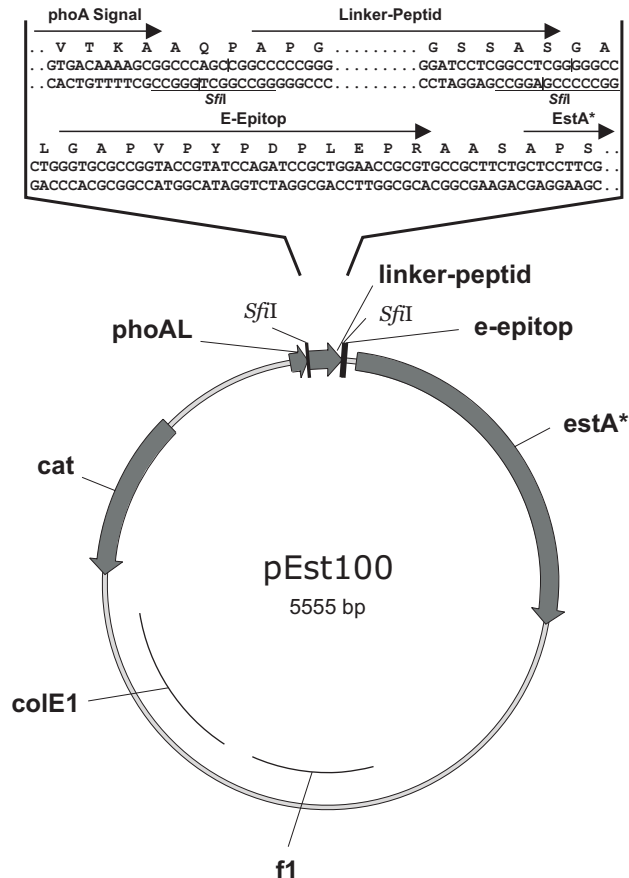


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pEst100 zur Präsentation von Passagierdomänen auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen. Die Ausschnittvergrößerung zeigt die zur Klonierung verwendeten *Sfi*I Erkennungsstellen. Informationen über die genetischen Elemente befinden sich in Abschnitt 2.2.3 (Abbildung modifiziert nach [248]).

Die kodierenden Sequenzen der als Passagierdomänen ausgewählten lipolytischen Enzyme wurden mittels PCR-Amplifikation (3.3.3) mit Oligonukleotiden zur Einführung korrespondierender *Sfi*I Erkennungsstellen durchgeführt. Als Matrizen dienten Plasmide mit den kodierenden Sequenzen der betreffenden Enzyme, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Jaeger vom Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) in Jülich zur Verfügung gestellt wurden. Im Falle der *Bacillus subtilis* Lipase LipA handelte es sich dabei um das Plasmid pET22lipA^[233] (2.2.4). Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide waren BS-LipA-Sfi-up und BS-LipA-Sfi-lo (2.4). Bei der Lipase aus *Serratia marcescens* diente unter Verwendung der Oligonukleotide Sermar-LipA-Sfi-up und Sermar-LipA-Sfi-lo (2.4) das Plasmid PVSlipA (2.2.5) als Matrize. Die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* wurde auf Basis des Plasmids pMac5-8FSP^[234] (2.2.6) mit den Oligonukleotiden Cutinase-Sfi-up und Cutinase-Sfi-lo (2.4) amplifiziert. Die PCR-Produkte

wurden mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion (3.2.3.2) und anschließender Ethanolpräzipitation (3.2.2.1) gereinigt. Anschließend erfolgte der restriktionsendonukleatische Verdau mit *Sfi*I (3.3.1). Eine abschließende Reinigung wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation durchgeführt. Das Akzeptorplasmid pEst100 wurde ebenfalls mit *Sfi*I verdaut und anschließend durch Sucrosedichtegradientenzentrifugation von der Nuclease und dem herausgespaltenen DNA-Fragment gereinigt (3.2.8). Nach Ligation der PCR-Produkte mit dem Vektorfragment (3.3.2) erfolgte die Transformation mit *E. coli* Zellen des Stammes 71-18 (3.1.4). Von jeder Ligation wurden dann einzelne Transformanten vermehrt und deren Plasmide präpariert (3.2.6). Die Identifizierung positiver Klone erfolgte durch enzymatischen Verdau mit *Sfi*I. Die entstandenen Plasmide wurden pEst100-BSLipA (EstA*-*B. subtilis* LipA-Fusion), pEst100-SMLip (EstA*-*S. marcescens* Lipase-Fusion) und pEst100-FSCut (EstA*-*F. solani pisi* Cutinase-Fusion) genannt. Eine Zusammenfassung der in diesem Abschnitt verwendeten Plasmide sowie der zugehörigen relevanten Genprodukte befindet sich in Tabelle 4.1.

Plasmide	relevante Genprodukte	Proteingröße (AS)
pET22lipA	<i>Bacillus subtilis</i> LipA	181
pMac5-8FSP	<i>Fusarium solani pisi</i> Cutinase	214
PVSlipA	<i>Serratia marcescens</i> Lipase	613
pBBX+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EstA	622
pEst100	EstA*	542
pEst100-BSLipA	EstA*- <i>Bacillus subtilis</i> LipA Fusionsprotein	686
pEst100-FSCut	EstA*- <i>Fusarium solani pisi</i> Cutinase Fusionsprotein	719
pEst100-SMLip	EstA*- <i>Serratia marcescens</i> Lipase Fusionsprotein	1117

Tab. 4.1: Zusammenfassung der in diesem Kapitel verwendeten Plasmide und der zugehörigen relevanten Genprodukte sowie deren Größe in Aminosäuren (AS).

4.1.2 Untersuchung der funktionalen Expression der erzeugten EstA*-Fusionsproteine

Zur Überprüfung der funktionalen Expression der erzeugten EstA*-Fusionsproteine wurden Zellen der verschiedenen Spezies (pEst100-BsLip, pEst100-SMLip und pEst100-FSCut) auf IPTG-haltige Tributyrin-Selektivagarplatten (3.5.1) ausgebracht. Als Kontrollen dienten Zellen, die das esterolytisch inaktive EstA*-Konstrukt (pEst100) bzw. den aktiven EstA-Wildtyp produzierten (pBBX+,^[218] 2.2.1). Alle drei Fusionsproteine sowie der EstA-Wildtyp zeigten nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und weiterer Inkubation für einen Tag bei Raumtemperatur lipolytische Aktivität durch die Bildung klarer Halos um die Kolonien. Wie erwartet konnte bei der EstA* Negativkontrolle (pEst100) keine Bildung eines Halos beobachtet werden. Abbildung 4.3 zeigt eine Fotografie der betreffenden Tributyrinagarplatte.

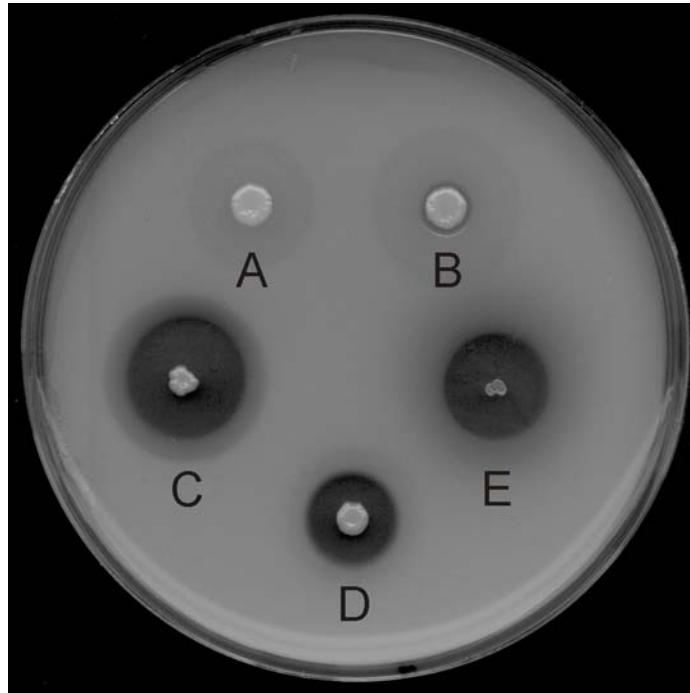


Abb. 4.3: Tributyrin-Selektivagarplatte mit Kolonien von *E. coli* 71-18 mit (A) pEst100 (EstA*), (B) pBBX+ (EstA-Wildtyp), (C) pEst100-BSLipA (EstA*-*B. subtilis* LipA-Fusion), (D) pEst100-SMLip (EstA*-*S. marcescens* Lipase-Fusion) und (E) pEst100-FSCut (EstA*-*F. solani pisi* Cutinase-Fusion) (Abbildung modifiziert nach [248]).

4.1.3 Untersuchung der Oberflächenexposition der erzeugten EstA*-Fusionsproteine

Die zelluläre Lokalisation der erzeugten Fusionsproteine aus EstA* und den unterschiedlichen lipolytischen Enzymen wurde mittels Immunfluoreszenzmarkierung (3.6.2) untersucht. Dazu diente ein monoklonaler Maus-Antikörper, der gegen das 13 Aminosäuren umfassende E-Epitop gerichtet war (Fa. Amersham). Dieses befindet sich zwischen der aminoterminalen Domäne von EstA* und den entsprechenden Passagierdomänen (Abb. 4.1). Als Kontrollen dienten Zellen mit dem Akzeptorplasmid pEst100 sowie Zellen des Stammes 71-18 ohne Plasmid. Die Analyse der markierten Zellen erfolgte mittels Durchflußzytometrie (3.6.5). Abbildung 4.4 fasst die Ergebnisse der einzelnen Messungen sowie eine Auflistung der zugehörigen *Peak* Fluoreszenzkanäle zusammen.

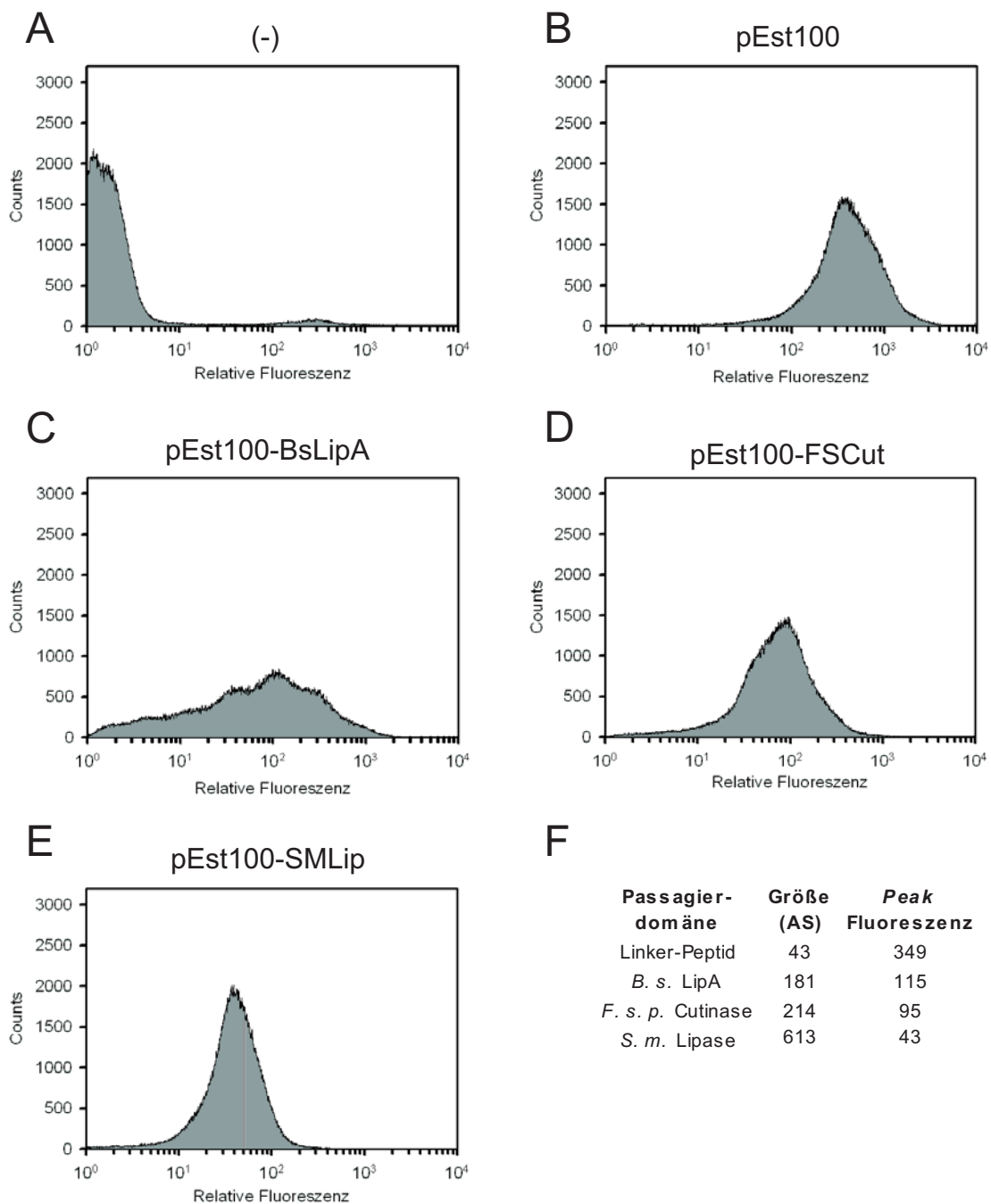


Abb. 4.4: Durchflußzytometrische Analysen der EstA*-vermittelten Zelloberflächenpräsentation von Passagierdomänen. Die Nachweise erfolgten mittels anti-E-Epitop Antikörper. FACS-Histogramme von *E. coli* 71-18 ohne Plasmid (A), mit pEst100 (B), pEst100-BsLipA (C), pEst100-FSCut (D) und pEst100-SMLip (E). Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz pro Zelle und die Zellzahl (Counts). Die zugehörigen Peak Fluoreszenzen, die mit der Anzahl oberflächenpräsentierter Moleküle pro Zelle korrelieren, sind gegeben in (F) (Abbildung modifiziert nach [248]).

Abbildung 4.4 zeigt, daß bei allen drei Fusionsproteinen und der Positivkontrolle (pEst100) ein E-Epitop auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Die Peak Fluoreszenzen deuten allerdings daraufhin, daß signifikante Unterschiede in der Präsentationseffizienz vorliegen. Die untransformierten Zellen der Negativkontrolle zeigten erwartungsgemäß kein Signal bei der FACS-Analyse. Es ist bemerkenswert, daß sogar die

Lipase aus *Serratia marcescens* als Passagierdomäne auf der Zelloberfläche detektiert werden konnte. Mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 65.000 ist sie sogar größer als das Translokatorprotein EstA* selbst (M_r ca. 52.000). Die Präsentationseffizienz ist im Vergleich zu EstA* allein allerdings ca. 8-fach verringert.

Im Falle der *Bacillus subtilis* Lipase LipA konnte die extrazelluläre Lokalisation des EstA*-Fusionsproteins zusätzlich direkt nachgewiesen werden. Der dazu verwendete polyklonale anti-LipA Antikörper aus dem Kaninchen wurde ebenfalls freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Jaeger (IMET, Jülich) zur Verfügung gestellt (3.6.2). Als Kontrolle dienten Zellen des Stammes BL21(DE3) mit dem Plasmid pEt22lipA (2.2.4), welches die Produktion und Akkumulation der *B. subtilis* Lipase LipA im Periplasma vermittelt. Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse (3.6.4) zeigte markierte Zellen nur bei Produktion des Fusionsproteins. Die Zellen, die LipA periplasmatisch produzierten erschienen dagegen gänzlich ungefärbt. Fotografische Aufnahmen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen sind in Abbildung 4.5 gezeigt.

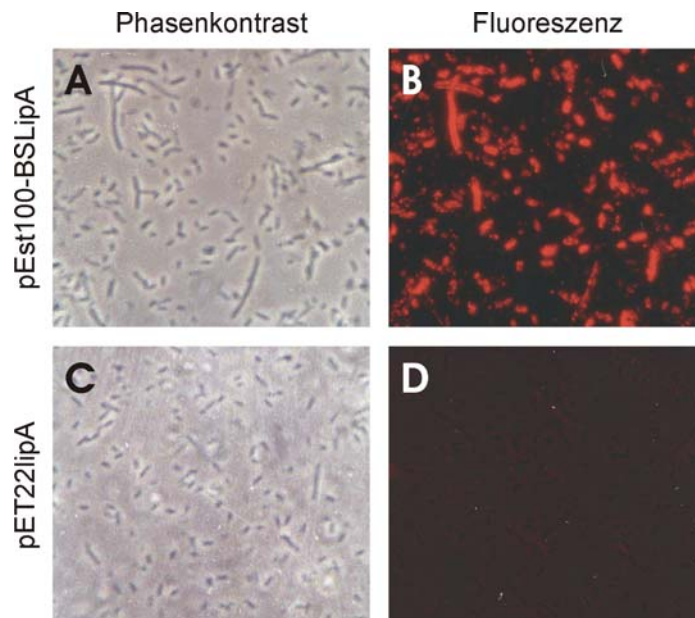


Abb. 4.5: Phasenkontrast- (A, C) und fluoreszenzmikroskopische (B, D) Aufnahmen identischer Gesichtsfelder von *E. coli* 71-18 mit pEst100-BSLipA (A, B) und *E. coli* BL21(DE3) mit pET22lipA (C, D). Der Nachweis der Oberflächenpräsentation erfolgte mit einem anti-LipA Antikörper.

4.1.4 Untersuchung der esterolytischen Aktivität der erzeugten EstA*-Fusionsproteine

Zur genaueren Untersuchung der esterolytischen Aktivitäten der erzeugten EstA*-Fusionsproteine wurden mit dem p-Nitrophenylester der Oktansäure die Hydrolyseraten der verschiedenen oberflächenpräsentierten Konstrukte bestimmt (3.5.2.1). Als Kontrolle dienten Zellen, die den EstA-Wildtyp produzierten. Für eine zusätzliche Bestimmung der Lokalisation der Aktivitäten erfolgten außerdem Bestimmungen der Hydrolyseraten in Kulturüberständen (3.5.2.2) und Zellysaten (3.5.2.3) der unterschiedlichen Spezies. Abbildung 4.6 fasst die Ergebnisse zusammen.

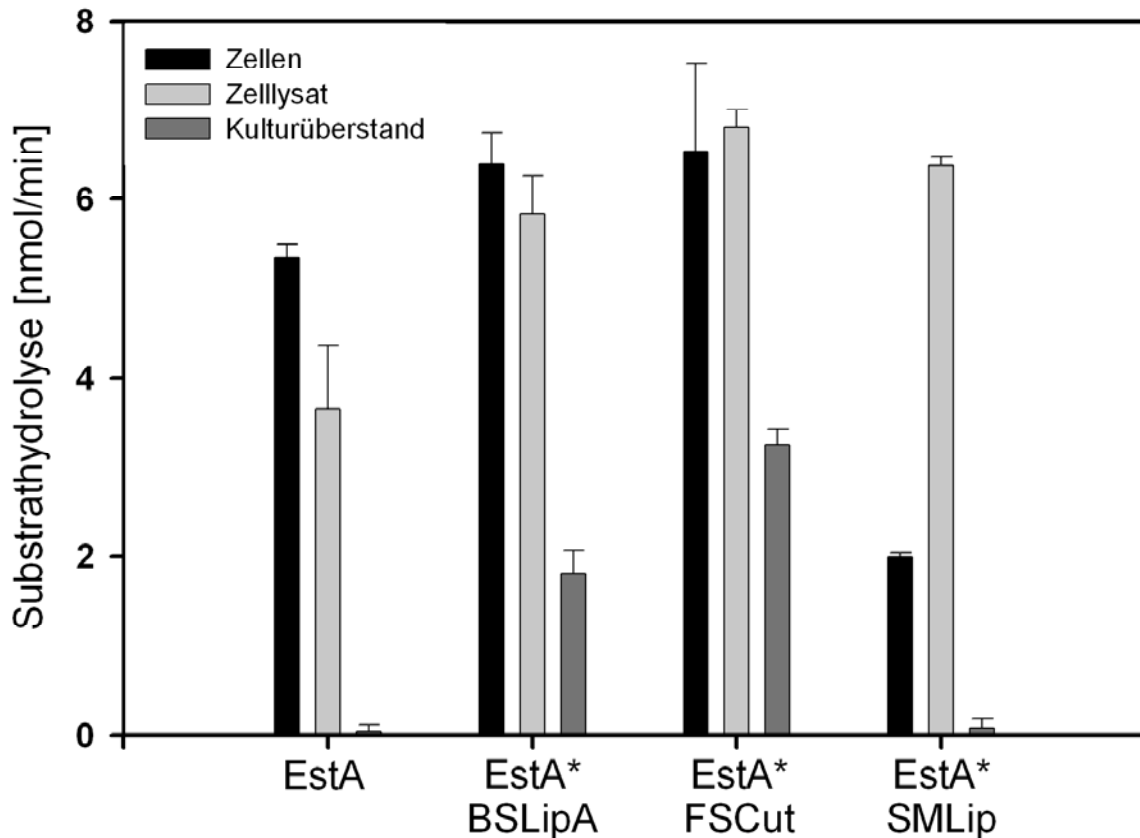


Abb. 4.6: Esterolytische Aktivitäten von *E. coli* 71-18, vermittelt durch unterschiedliche Expressionsplasmide. Die verschiedenen Zellen produzierten EstA, bzw. eines der erzeugten EstA*-Fusionsproteine mit *B. subtilis* LipA, *F. solani pisi* Cutinase oder *S. marcescens* Lipase. Schwarze Balken repräsentieren ganze Zellen, hellgraue Balken Zellysate und dunkelgraue Balken Zellkulturüberstände. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer OD₆₀₀ von 0,4 (Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen von je drei unabhängigen Messungen) (Abbildung modifiziert nach [248]).

Es zeigte sich, daß alle erzeugten EstA*-Fusionsproteine esterolytische Aktivität aufwiesen. Dies deutet daraufhin, daß sie in einer enzymatisch aktiven Form produziert und auf der Zelloberfläche präsentiert wurden. Die Lipase aus *S. marcescens* zeigte bei den durchflußzytometrischen Analysen eine 8-fach reduzierte Oberflächenakkumulation verglichen mit EstA* (Abb. 4.4, F). Dies korrespondiert mit der für diese Zellen gemessenen reduzierten Enzymaktivität. Die Untersuchung lysierter Zellen von *E. coli* 71-18 mit pEst100-SMLip zeigte eine ca. 4-fach höhere Enzymaktivität im Vergleich zu intakten Zellen. Dies deutet daraufhin, daß ein großer Teil der *S. marcescens* Lipase in den Zellen persistiert, anstatt auf der Oberfläche präsentiert zu werden. Im Falle von LipA aus *B. subtilis* und der Cutinase aus *F. solani pisi* konnte zusätzlich enzymatische Aktivität im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Dies könnte das Resultat einer partiellen Zellyse sein, und bzw. oder einer proteolytischen Abspaltung der entsprechenden Passagierdomänen von der Zelloberfläche. Die Bestimmung der Überlebensraten (3.6.6) deutete jedoch auf einen toxischen Effekt der Produktion der Fusionsproteine hin und damit eher auf eine partielle Zellyse (EstA*-*B. subtilis* LipA: 15 %, EstA*-*F. solani pisi* Cutinase: 30 %). Die Zellen die das EstA*-*S. marcescens* Lipase-Fusionsprotein produzierten schienen interessanterweise nur leicht in ihrer Überlebensrate beeinträchtigt zu sein (60 %).

4.1.5 Zusammenfassung und Diskussion zur Zelloberflächenpräsentation verschiedener lipolytischer Enzyme

Dieses Kapitel beschreibt die Präsentation von lipolytischen Enzymen auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen als Fusionsproteine mit EstA*, einer verkürzten enzymatisch inaktiven Variante der *P. aeruginosa* Autotransporter Esterase EstA. Die experimentellen Daten deuten daraufhin, daß EstA* für verschiedene Lipasen als Translokator durch die äußere Zellmembran verwendet werden kann, und daß die Passagierdomänen dabei ihre enzymatische Aktivität auf der Zelloberfläche behalten (Abb.4.6).

Die Esterase EstA aus *P. aeruginosa* ist ein Mitglied der Familie der Autotransporterproteine, die in Gram negativen Bakterien über einen Typ V_a-Mechanismus sekretiert werden.^[252] Im Gegensatz zu den meisten bisher bekannten Autotransportern wird bei EstA die Passagierdomäne nicht proteolytisch abgespalten, sondern bleibt auf der äußeren Membran der Bakterienzelle verankert.^[218] Die Tatsache, daß EstA auch in dem heterologen Organismus *E. coli* produziert und in die äußere Membran integriert wird,^[218] macht dieses Protein zu einem vielversprechenden Kandidaten für bakterielle Zelloberflächenpräsentation von Enzymen. Die Konstruktion von EstA*-Fusionsproteinen, deren Passagierdomänen von einem E-Epitop flankiert sind, ermöglichte die Detektion der Konstrukte auf der Zelloberfläche mittels Immunfluoreszenzmarkierung. Bei allen erzeugten Fusionsproteinen ließ sich so das zwischen EstA* und den Passagierdomänen lokalisierte E-Epitop nachweisen (Abb. 4.4). Dies ist ein deutliches Indiz für die Präsentation der Passagierdomänen auf der bakteriellen Zelloberfläche.

Bis *dato* wurden verschiedene erfolgreiche Versuche beschrieben, Autotransporterproteine zur Translokation von Passagierproteinen durch die äußere Zellmembran und zur bakteriellen Zelloberflächenpräsentation zu nutzen. Bei allen vorherigen Ansätzen wurde dazu die translozierte aminoternale Domäne durch ein heterologes Passagierpolypeptid ersetzt. Beispiele dafür sind die Zelloberflächenpräsentationen der Cholera Toxin B Untereinheit sowie einer Sorbitol Dehydrogenase durch die carboxyterminale Domäne der IgA Protease (IgA β) aus *Neisseria gonorrhoeae*^[199,200,202,253] oder die Präsentation eines pflanzlichen Protease-Inhibitors (EETI-II) durch die membranassoziierte Domäne des Intimins, einem Membranprotein und Pathogenitätsfaktor aus enterohämorrhagischen *E. coli*.^[178,179] Die hier beschriebene Strategie zur Zelloberflächenpräsentation von lipolytischen Enzymen unterscheidet sich von anderen Verfahren im Wesentlichen dadurch, daß die exportierte aminoternale Domäne von EstA nicht vollständig ersetzt wurde. Die Passagierproteine wurden als zusätzliche Domäne an eine verkürzte esterolytisch inaktive Variante der aminoternalen Domäne von EstA fusioniert. Das Resultat sind vergleichsweise große Fusionsproteine mit zwei extrazellulären Domänen (Abb. 4.1). Da die EstA-eigene Autochaperon Subdomäne^[193-196] (Abb. 1.7) in der verkürzten Variante vorhanden ist, könnte dies bei der Oberflächentranslokation von Nutzen sein. Außerdem könnte eine zweite extrazelluläre Domäne für einen ausreichenden Abstand der lipolytischen Enzyme zur Lipopolysaccharidschicht der äußeren Zellmembran sorgen. Ein anderes Oberflächenpräsentationskonstrukt nutzte die Fusion an eine unverkürzte Variante von EstA.

Auch dabei ließ sich die Translokation des Passagierproteins auf die Zelloberfläche nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Bei den drei hier untersuchten Passagierenzymen konnten unterschiedliche Nettoakkumulationen auf der bakteriellen Zelloberfläche nachgewiesen werden. Während im Vergleich zu EstA* die Oberflächenakkumulation bei LipA aus *Bacillus subtilis* und der Cutinase aus *Fusarium solani pisi* nur leicht reduziert war, zeigte sich bei der Lipase aus *Serratia marcescens* die geringste Effizienz der Oberflächenpräsentation (Abb. 4.4). Für diese Beobachtung kommen verschiedene Ursachen in Frage. Die untersuchten Passagierdomänen variierten in der Länge ihrer Polypeptidketten von 43 Aminosäureresten bei dem EstA* Konstrukt des Plasmids pEst100 bis zu 613 Resten bei der Lipase aus *S. marcescens* im Plasmid pEst100-SMLip. Damit ist letztere sogar größer als das EstA*-Translokatorprotein (479 AS) selbst und so eines der größten bis dato auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen präsentierten heterologen Passagierproteine.^[197] Unterschiedliche Effizienzen bei der Oberflächenpräsentation lipolytischer Enzyme können ihre Ursache in der unterschiedlichen Größe der Passagierdomänen haben, und bzw. oder in Unterschieden bezüglich der Faltungskinetiken, gefalteten Strukturen oder konformationellen Stabilitäten. Weitere Experimente könnten Aufschluß darüber geben, ob es sich bei dem Anteil von nicht präsentierten *S. marcescens* Lipase Molekülen um Vollängenfusionsproteine handelt oder um freie Lipasemoleküle als Resultat einer proteolytischen Spaltung.

Zusammengenommen lassen die Ergebnisse den Schluß zu, daß der EstA*-Autotransporter in der Lage ist, die Zelloberflächenpräsentation unterschiedlicher, teils sehr großer Passagierproteine zu vermitteln. Dies geschieht unter Erhalt der korrekten Translokation und Oberflächenlokalisierung und führt zur Akkumulation lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen. Durch die Lokalisation im extrazellulären Medium und die Immobilisierung auf der Zelloberfläche könnten präzentrierte Lipasen in der organischen Synthese zu einem nützlichen Werkzeug als „Ganz-Zell-Biokatalysatoren“ mit lipolytischer Aktivität werden, da sie leicht zu separieren sind und lästige Verfahren wie Zellaufschluß und Reinigung überflüssig machen. Dies gilt insbesondere für Substrate, welche die äußere Zellmembran nicht durchdringen können und so für enzymatisch katalysierte Reaktionen im Zellinneren nicht zur Verfügung stehen.^[202,205,209] Des Weiteren führt die Verankerung heterologer Enzyme in der äußeren Zellmembran zu einer effektiven Genotyp-Phänotyp-Kopplung, welche die Isolierung von Enzymvarianten mit veränderten katalytischen Eigenschaften ermöglicht, wie sie im folgenden Kapitel beschrieben ist.

4.2 *Isolierung von Esterase Varianten mit veränderter Substratspezifität mittels E. coli Zelloberflächenpräsentation und substratspezifischer zwei-Farben Markierung*

Dieser Abschnitt beschreibt die Weiterentwicklung des *ESCAPED*-Verfahrens^[214-216] (1.4) zur Isolierung von *E. coli* Zellen mit oberflächenassoziierter lipolytischer Aktivität. Ziel der hier beschriebenen Experimente war die Modifikation dieses Verfahrens, um es einer Nutzung als Methode für die Isolierung von Varianten lipolytischer Enzyme mit veränderter Substratspezifität zugänglich zu machen. Das *ESCAPED*-Verfahren basiert auf der spezifischen kovalenten Markierung von Zellen mit oberflächenassoziierter esterolytischer Aktivität, um diese aus einem Überschuss an Esterase-defizienten Zellen zu isolieren. Als Substrat diente dabei bis *dato* ein mit Oktansäure verestertes Biotin-Tyramid-Konjugat. Nach Hydrolyse der Carboxylesterbindung durch eine membranständige Esterase kann die freiwerdende phenolische Hydroxylgruppe des Tyramidrests durch eine ebenfalls membranassoziierte Peroxidase in einem Radikalmechanismus kovalent auf die Zelloberfläche gekoppelt werden (Abb. 1.9). Der Nachweis der Markierung und die darauf aufbauende Isolierung erfolgte mit Streptavidin-gekoppelten Fluorophoren bzw. paramagnetischen Partikeln (Abb. 1.10).

Prinzipiell basiert das *ESCAPED*-Anreicherungsverfahren auf der besonderen Architektur des verwendeten Carboxylestersubstrats, welches nach Hydrolyse durch das Zusammenspiel zweier oberflächenassoziierter Enzyme kovalent an die entsprechende Zelle gekoppelt wird. Die Verwendung dieses Mechanismus zur Isolierung von Esterase Varianten mit veränderter Substratspezifität ist deshalb nur durch eine Modifikation des eingesetzten Biotin-Tyramidesters möglich. Dabei muß berücksichtigt werden, daß ein Carbonsäureester das Kondensationsprodukt eines Alkohols und einer Carbonsäure ist. Es ist also im Vorfeld festzulegen, auf welche dieser beiden Komponenten einer Esterbindung die Veränderung der Substratspezifität Einfluß haben soll. Im Falle des Biotin-Tyramidesters besteht die alkoholische Komponente aus einem für die kovalente Zellmarkierung essentiellen phenolischen Rest. Modifikationen an diesem wären synthetisch aufwendig und könnten möglicherweise mit dem Radikalmechanismus der Dityramidbildung interferieren (Abb. 1.9), was zum Ausbleiben der Zellmarkierung führen könnte. Die Carbonsäurekomponente der Esterbindung ist jedoch verhältnismäßig einfach zu modifizieren und bildet im Hinblick auf Enantioselektivität auch eine für die organische Synthese interessante Seite.

Die Nutzung des *ESCAPED*-Verfahrens zur Detektion und Isolierung von Varianten lipolytischer Enzyme mit veränderter Enantioselektivität erfordert auf Seiten des Substrats zwei grundlegende Modifikationen:

- (i) Das Tyramid-Konjugat muß in Form eines chiralen Esters als definiertes Gemisch der verschiedenen Enantiomere vorliegen.
- (ii) Die unterschiedlichen Enantiomere müssen nach Hydrolyse und Deposition auf der Zelloberfläche so getrennt voneinander zu detektieren sein, daß sich eine

vorliegende Enantioselektivität durch unterschiedliche relative Anteile der Hydrolyseprodukte des jeweiligen Enantiomers auf der Zelloberfläche abbilden läßt.

Ersteres läßt sich mit Mitteln der organischen Synthese und Reinigung verhältnismäßig einfach umsetzen. Letzteres kann nur durch unterschiedliche Konjugationen am Tyramidanteil der verwendeten chiralen Ester realisiert werden. Des Weiteren erfordert der Einsatz eines Tyramidesters zur Isolierung von Varianten mit veränderter Enantioselektivität die Verwendung von Substraten, die durch das Wildtyp Enzym *per se* hydrolysierbar sind sowie die Untersuchung der dabei vorliegenden natürlichen Enantioselektivität.

Die folgenden Abschnitte beschreiben die Entwicklung unterschiedlich detektierbarer Tyramid-Konjugate sowie erste Experimente zur spezifischen zwei-Farben Markierung von *E. coli* Zellen. Der Abschnitt 4.2.2 befasst sich anschließend mit dem Aufbau eines Modellanreicherungs-experiments zur Isolierung von Enzymvarianten mit veränderter Enantioselektivität, der dazu benötigten Auswahl eines geeigneten Enzym-Substratpaares sowie mit der Erzeugung und Charakterisierung von Enzymbibliotheken. Die eigentlichen Anreicherungs-experimente sowie Charakterisierungen isolierter Einzelklone werden in Abschnitt 4.2.3 beschrieben. In Abschnitt 4.2.4 werden gesammelte Erkenntnisse aus dem vorangegangenen Abschnitten genutzt, um Varianten mit veränderter Enantioselektivität durch gezielte Mutagenese zu erzeugen und zu charakterisieren.

Abbildung 4.7 zeigt zur Verdeutlichung eine schematische Darstellung des geplanten Anreicherungsverfahrens.

nächste Seite

Abb. 4.7: Schematische Darstellung der geplanten Isolierung lipolytischer Enzyme mit veränderter Enantioselektivität mittels Zelloberflächenpräsentation und spezifischer zwei-Farben Markierung. **(A)** Plasmid-kodierte Enzymvarianten werden in *E. coli* produziert und in die äußere Zellmembran integriert. **(B)** Meerrettich-Peroxidase wird kovalent auf der Zelloberfläche fixiert. Es erfolgt die Inkubation der Zellen mit einem Gemisch unterschiedlich nachzuweisender Tyramidester, die jeweils mit dem (*R*)- bzw. (*S*)-Enantiomer einer chiralen Carbonsäure verestert sind. Varianten mit Präferenz für das (*S*)-Enantiomer werden mit Tyramid-Konjugat A markiert, Varianten mit Präferenz für das (*R*)-Enantiomer mit Tyramid-Konjugat B. **(C)** Der Nachweis der Markierungen erfolgt mit unterschiedlichen Fluorophoren, die entweder Tyramid-Konjugat A oder B binden. **(D)** Die Sortierung erfolgt durchflußzytometrisch anhand der Art der vorliegenden Fluoreszenz in zwei Richtungen.

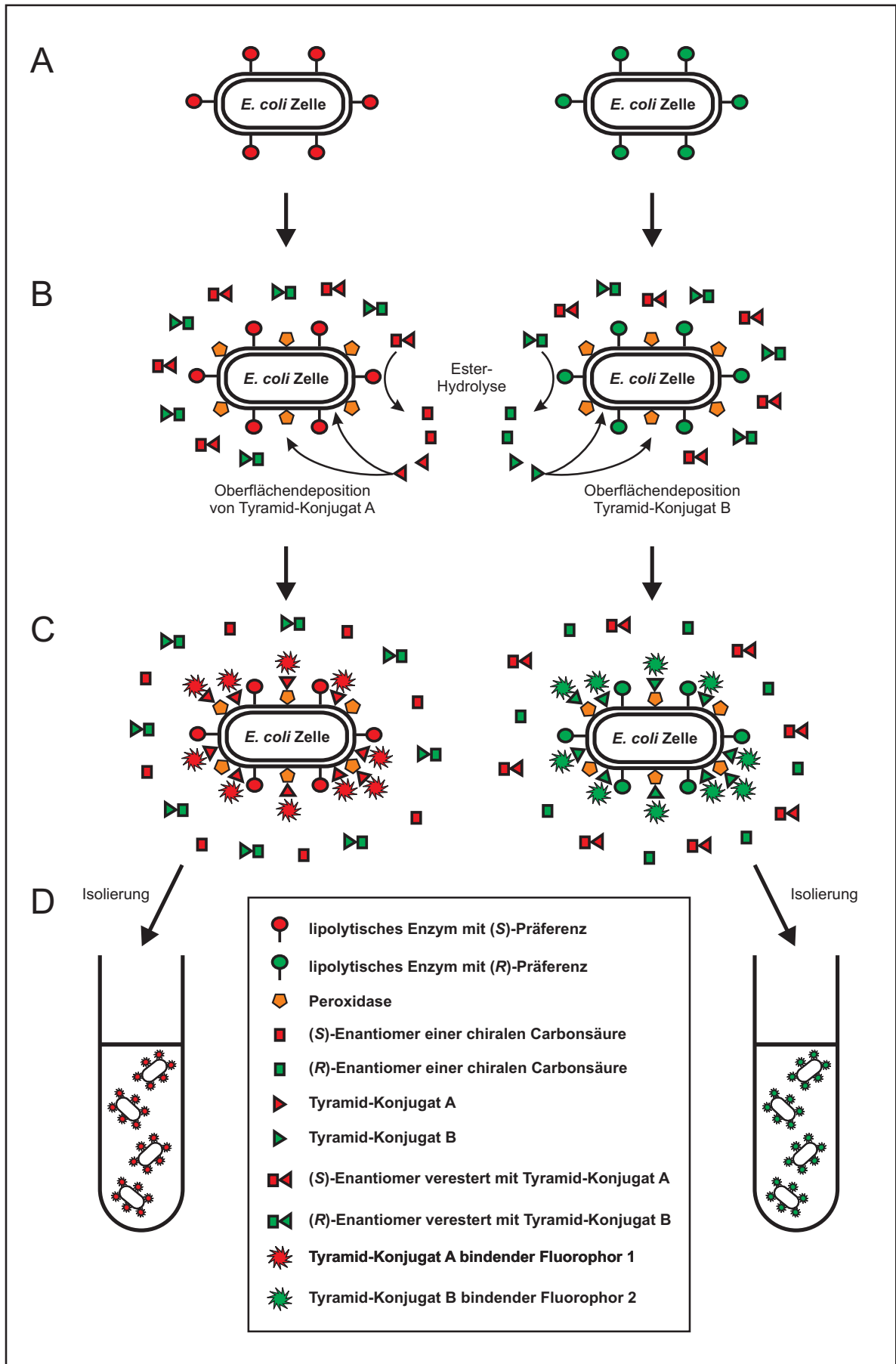


Abb. 4.7: Die Beschreibung befindet sich auf der vorangegangenen Seite.

4.2.1 Zwei-Farben Markierung von *E. coli* Zellen mit unterschiedlich detektierbaren Tyramidestern

4.2.1.1 Entwicklung unterschiedlich detektierbarer Tyramidester

Die Verwendung des *ESCAPED*-Verfahrens zur Isolierung von Enzymvarianten mit veränderter Enantioselektivität erfordert den Einsatz enantiomerenreiner Tyramidester, die unabhängig voneinander nachgewiesen werden können. Dies lässt sich durch unterschiedliche Konjugationen am Tyramidrest realisieren. Bei dem bis *dato* verwendeten Biotin-Tyramid-Konjugat ist es der Biotinrest, der über die Bindung eines Fluorophor gekoppelten Streptavidins nachgewiesen wird.^[215,216] Dieser Rest kann durch ein Molekül ersetzt werden, das von einem Antikörper spezifisch gebunden wird und auf diese Weise detektierbar ist. Ein solches Molekül ist das 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP), gegen das eine ganze Reihe beliebig konjugierter Antikörper kommerziell zu erwerben ist.^[254] Es stellt damit in Form eines Tyramid-Konjugats einen idealen Kandidaten als anderweitig detektierbare Gruppe dar. In Abb. 4.8 ist die Strukturformel des 2,4-Dinitrophenols der des Biotins gegenübergestellt.

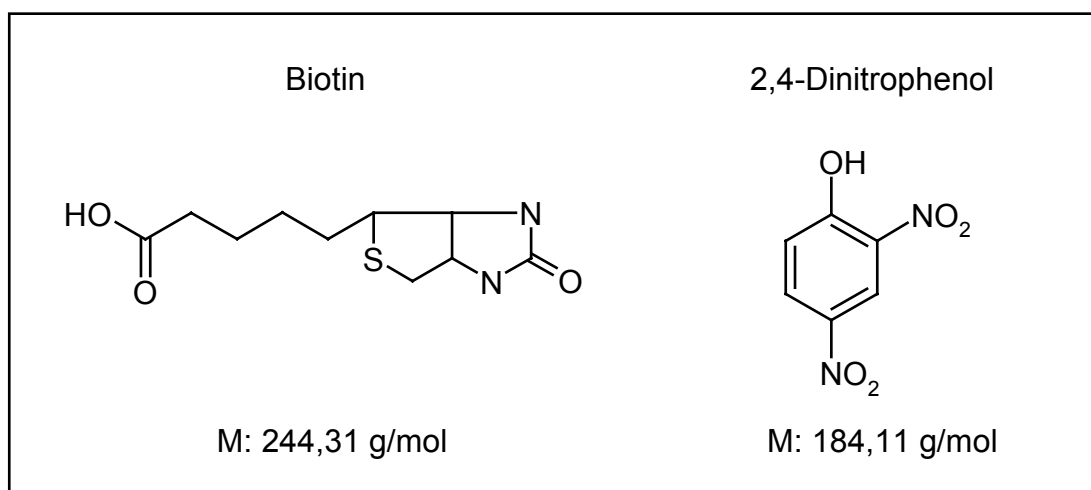


Abb. 4.8: Strukturformeln und zugehörige Molekulargewichte des Biotins und des 2,4-Dinitrophenols.

Die Synthese des resultierenden 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Konjugats erfolgte wie die des in dieser Arbeit verwendeten Biotin-Tyramid-Konjugats in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Reetz am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung (Mülheim/Ruhr) durch Horst Höbenreich. Beide Konjugate wurden als Reinsubstanzen zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden Strukturformeln sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

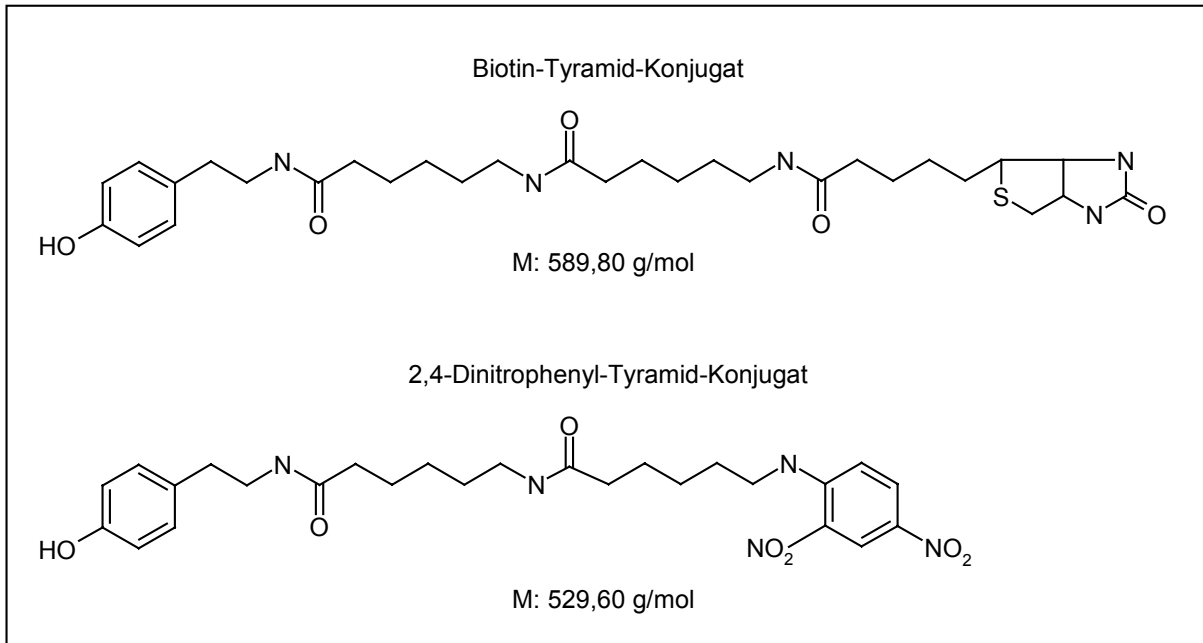


Abb. 4.9: Strukturformeln und zugehörige Molekulargewichte der erzeugten Tyramid-Konjugate.

4.2.1.2 Spezifische zwei-Farben Markierung von *E. coli* Zellen mit unterschiedlich detektierbaren Tyramidestern

Zur Überprüfung der spezifischen Markierung und unterschiedlichen Detektierbarkeit der erzeugten Tyramid-Konjugate wurden diese mit Oktansäure verestert und ebenfalls als entsprechende Reinsubstanzen zur Verfügung gestellt. Die dazu notwendigen chemisch-synthetischen Arbeiten sowie anschließende Reinigungsprozeduren wurden ebenfalls von Horst Höbenreich am MPI für Kohlenforschung durchgeführt. Die Strukturformeln der resultierenden Oktansäure-Tyramidester sind in Abbildung 4.10 gezeigt.

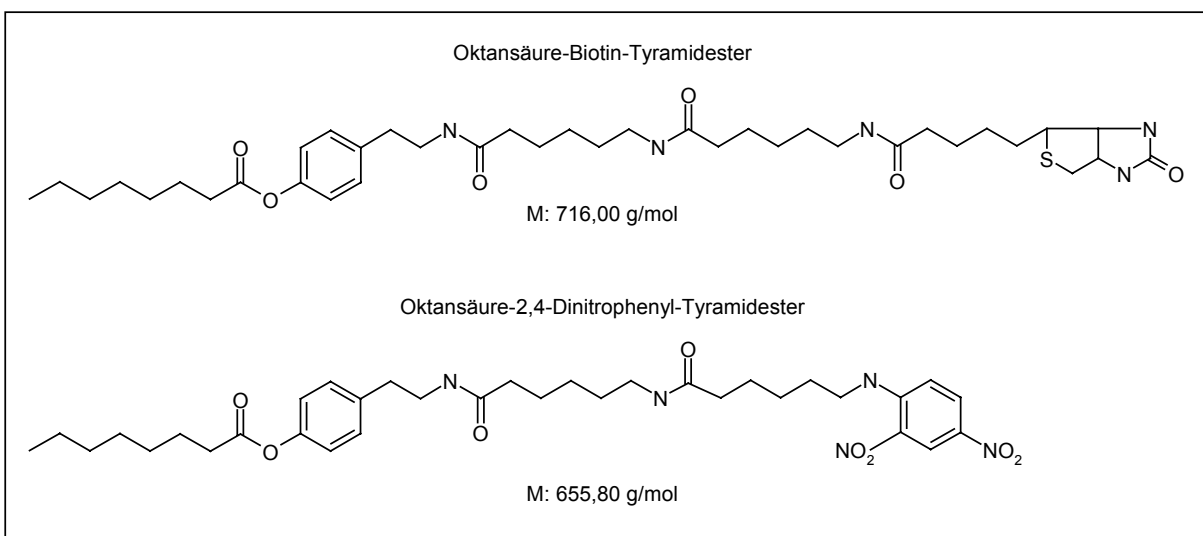


Abb. 4.10: Strukturformeln und zugehörige Molekulargewichte der erzeugten Oktansäure-Tyramidester.

Zum Nachweis einer spezifischen Markierung von *E. coli* Zellen mit membranassoziierter lipolytischer Aktivität wurden Esterase profiziente und defiziente Zellen mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert und separat mit beiden Oktansäure-Tyramidestern inkubiert. Verwendet wurden dazu jeweils Zellen des Stammes JM109 die entweder den EstA-Expressionsvektor pBBX+ oder den Kontrollvektor pBBR1MCS beherbergten. Zur Standardisierung der Markierungsreaktionen wurde in jedem Markierungsansatz eine möglichst konstante Menge an Zellen eingesetzt. Dazu wurde je 1 ml induzierte Zellen der jeweiligen Spezies durch Zentrifugation sedimentiert, in 1 ml PBS resuspendiert und die optische Dichte bei 600 nm auf 0,5 eingestellt. Für sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Tyramid-Markierungsreaktionen wurden Proben dieses Volumens und dieser Zelldichte verwendet. Die Anzahl von Zellen in einem solchen Ansatz wurde mittels Verdünnungsplattierungen auf $1,40 \times 10^8$ bestimmt. Jeweils 1 ml der so erzeugten Zellsuspensionen wurde dann nach Methode 3.6.3 mit den Oktansäure-Tyramidestern markiert. Dazu wurden pro Reaktionsansatz 1,14 nmol des jeweiligen Substrats verwendet, was einer Konzentration von 1,14 μM entsprach. Diese Substratkonzentration wurde gewählt, da sie in Vorversuchen mit konstanten Mengen Esterase profizienter Zellen und unterschiedlichen Mengen an Oktansäure-Biotin-Tyramidester zur deutlichsten Markierung von 1 ml Zellen der OD_{600} von 0,5 führte (Daten nicht gezeigt). Bei einer Anzahl von $1,40 \times 10^8$ Zellen und einer gemessenen maximalen Tyramid-Deposition von $1,20 \times 10^5$ Molekülen pro Zelle^[215,216] entspricht das einer maximalen Anzahl von ca. $1,73 \times 10^{13}$ depositionierbaren Tyramid-Konjugat Molekülen pro Markierungsansatz. Die eingesetzte Menge von 1,14 nmol entspricht einer Anzahl von ca. $6,87 \times 10^{14}$ Substratmolekülen pro Ansatz. Damit herrscht unter solchen Reaktionsbedingungen ein ca. 40-facher Überschuss an Substratmolekülen gegenüber der maximalen Anzahl depositionierbarer Tyramid-Konjugat Moleküle. Es sollte also gewährleistet sein, daß genügend Substrat vorhanden ist, um theoretisch sämtliche Zellen im Reaktionsansatz vollständig zu markieren. Die Inkubationszeit der Markierungsreaktionen betrug 5 min. Der Nachweis der kovalenten Markierung der Zelloberflächen erfolgte jeweils direkt mittels Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat zur Detektion von Biotinresten, bzw. durch einen monoklonalen Alexafluor488 gekoppelten Maus Antikörper zur Detektion von 2,4-Dinitrophenylresten. Die Analysen der unterschiedlichen Markierungsansätze erfolgten durchflußzytometrisch (3.6.5). Die Fluoreszenzemissionshistogramme dieser Messungen sind in Abbildung 4.11 zusammengefasst.

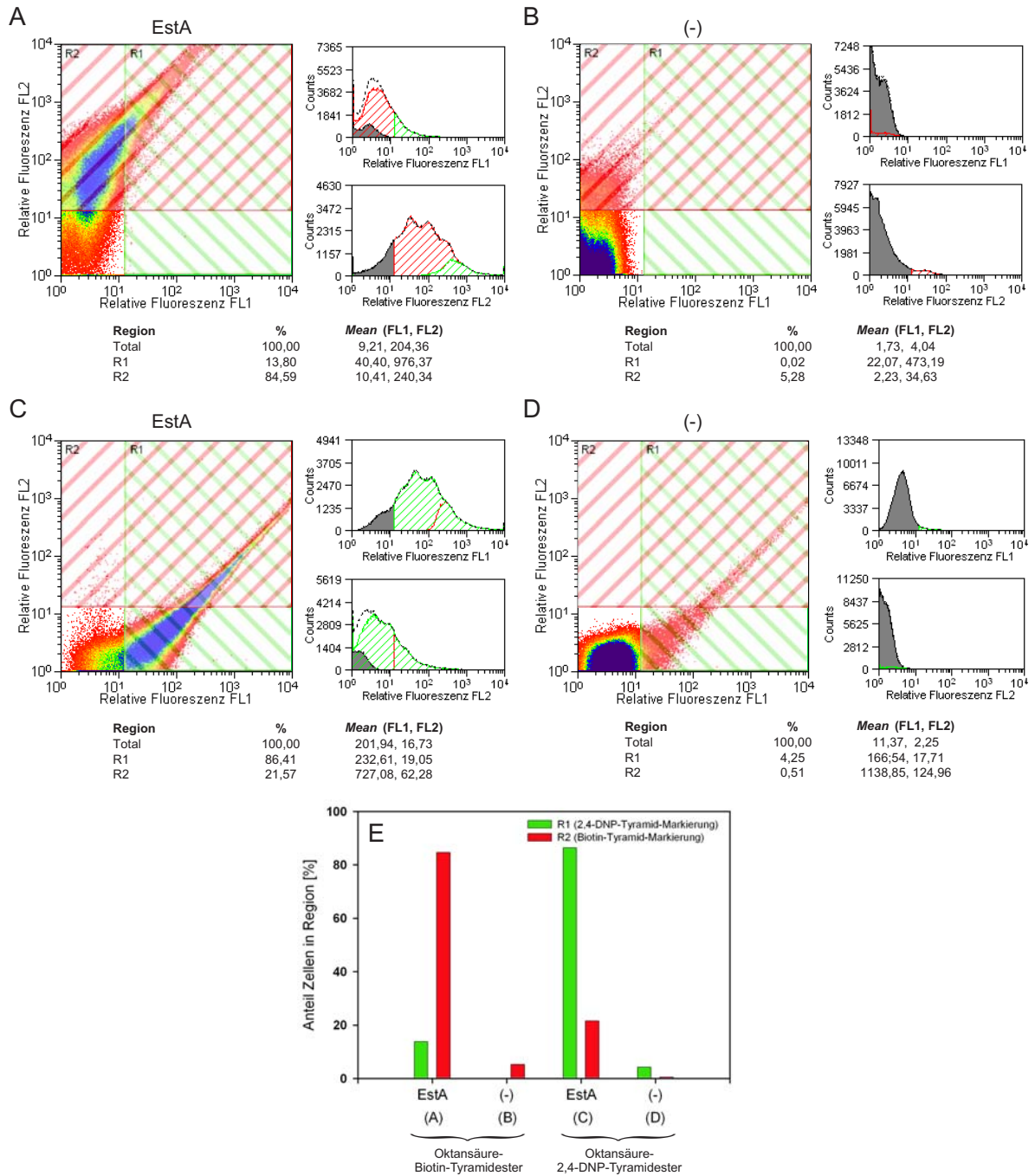


Abb. 4.11: Markierungen von *E. coli* Zellen mit Oktansäure-Biotin-Tyramidester (**A, B**) und Oktansäure-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester (**C, D**). FACS-Histogramme. Markiert wurden EstA präsentierende Zellen (**A, C**) und esterolytisch inaktive Kontrollzellen (**B, D**). Aufgetragen sind die Anzahl der für beide Kanäle gemessenen Ereignisse (*Counts*) und die zugehörigen relativen Fluoreszenzen. Die zur Analyse eingefügten Regionen repräsentieren die für die jeweilige Markierung spezifischen Fluoreszenzereignisbereiche: **R1** (grün): 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Markierung, **R2** (rot): Biotin-Tyramid-Markierung. *Mean* bezeichnet die mittleren relativen Fluoreszenzen pro Zelle im entsprechenden Bereich. (**E**) Zusammenfassung der Ergebnisse in Form der prozentualen Anteile der Gesamt Ereignisse in den entsprechenden Regionen ((-): Kontrollzellen).

Die Ergebnisse zeigen, daß sich EstA präsentierende Zellen mit beiden Oktansäure-Tyramidestern spezifisch markieren und sich diese separat voneinander nachweisen lassen. Während die EstA präsentierenden Zellen durch beide unterschiedlichen Markierungsarten im jeweils zugehörigen Fluoreszenzkanal mit fast identischer Effizienz gefärbt waren, zeigten die

esterolytisch inaktiven Kontrollzellen lediglich geringe Hintergrundfluoreszenz. Dies läßt sich vermutlich auf beginnende Spontanhydrolyse der eingesetzten Estersubstrate zurückführen. Des Weiteren ist zu erkennen, daß beide zum Nachweis der Markierung verwendeten Farbstoffe jeweils von beiden Fluoreszenzdetektoren wahrgenommen wurden. Die Intensität dieser Kreuzdetektionen ist dabei in beiden Fällen proportional zur Akkumulation des jeweiligen Farbstoffs auf der Zelloberfläche. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Emissionsspektren der Farbstoffe R-Phycoerythrin und Alexafluor488 zurückzuführen, die sich im Bereich von 560 nm noch mit ca. 30 % Emissionseffizienz überschneiden (<http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>). Trotz dieser Tatsache ist eine eindeutige Differenzierung beider Markierungsarten möglich, und beide Substrate scheinen trotz einer unterschiedlichen Konjugation auf Seiten der Alkoholkomponente mit ähnlicher Effizienz hydrolysiert und auf der Zelloberfläche deponiert zu werden.

Eine simultane Markierung identischer Konzentrationen beider Oktansäure-Tyramidester sollte somit theoretisch zu einer äquivalenten Akkumulation beider Tyramidspezies auf der Zelloberfläche esterolytisch aktiver Zellen führen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden EstA präsentierende sowie Kontrollzellen mit einem 1:1-Gemisch (1,14 μM) beider Oktansäure-Tyramidester (je 0,57 nmol) markiert (3.6.3). Die Reaktionszeit betrug erneut 5 min. Der Nachweis der unterschiedlichen Tyramid-Depositionen erfolgte über ein 1:1-Gemisch aus Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat und dem Alexafluor488 gekoppelten anti-2,4-Dinitrophenyl Antikörper (je 1 μg). In Abbildung 4.12 sind die durchfluß-zytometrischen Analysen wiedergegeben.

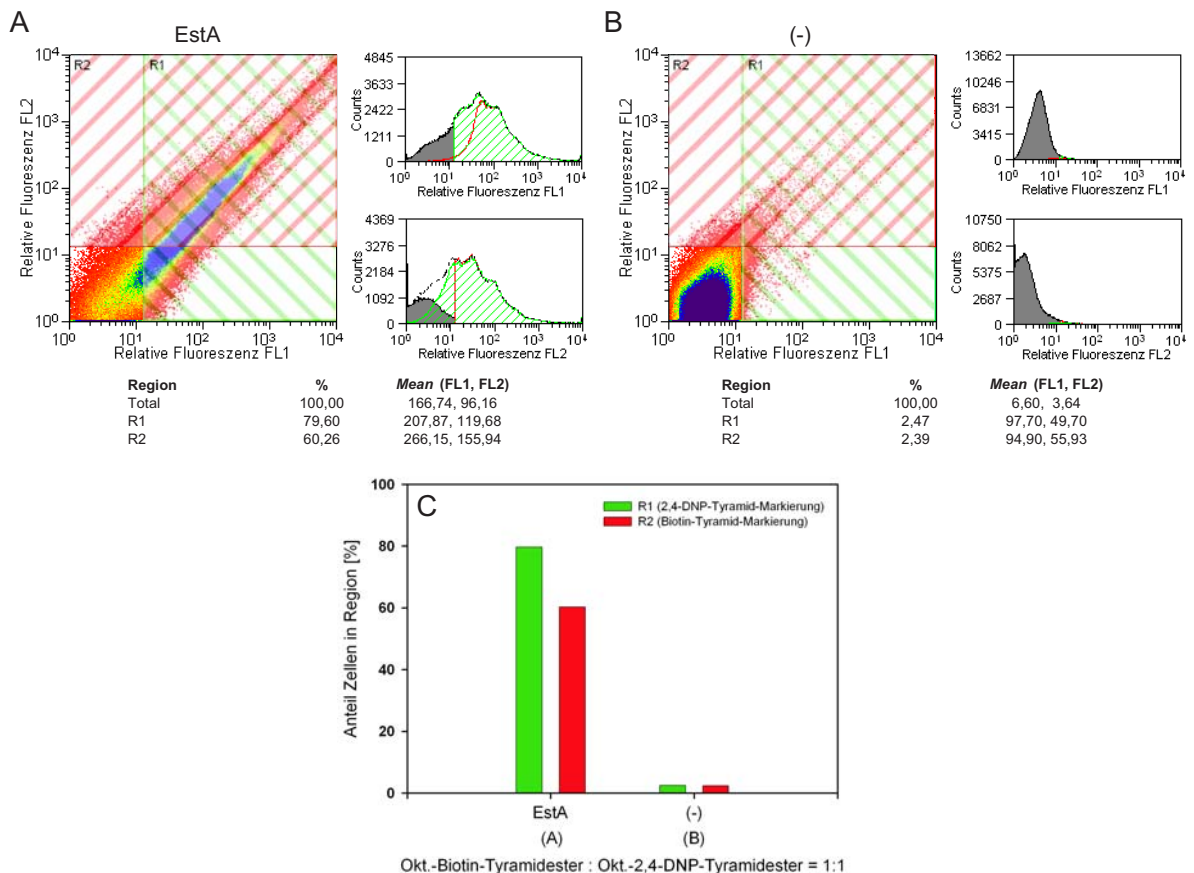


Abb. 4.12: Die Beschreibung befindet sich auf der nächsten Seite.

Abb. 4.12: (vorherige Seite) Zwei-Farben Markierungen von *E. coli* Zellen mit einem 1:1-Gemisch aus Oktansäure-Biotin-Tyramidester und Oktansäure-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester. FACS-Histogramme. Markiert wurden EstA präsentierende Zellen (**A**) und esterolytisch inaktive Kontrollzellen (**B**). Aufgetragen sind die Anzahl der für beide Kanäle gemessenen Ereignisse (*Counts*) und die zugehörigen relativen Fluoreszenzen. Die zur Analyse eingefügten Regionen repräsentieren die für die jeweilige Markierung spezifischen Fluoreszenzemissionsbereiche: **R1** (grün): 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Markierung, **R2** (rot): Biotin-Tyramid-Markierung. *Mean* bezeichnet die mittleren relativen Fluoreszenzen pro Zelle im entsprechenden Bereich. (C) Zusammenfassung der Ergebnisse in Form der prozentualen Anteile der Gesamt Ereignisse in den entsprechenden Regionen ((-): Kontrollzellen).

Die simultane Markierung äquivalenter Mengen beider Tyramidester führte erwartungsgemäß zu einer relativ gleichmäßigen Verteilung beider Fluoreszenzfarbstoffe auf der äußeren Membran der EstA präsentierenden Zellen. Auffallend ist jedoch, daß die Gesamtpopulation der markierten Zellen leicht in Richtung Fluoreszenz FL1 (entspricht der Deposition des 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Konjugats) verschoben ist. Grund dafür könnten die unterschiedlichen Anregungsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sein. R-Phycoerythrin besitzt ein Anregungsmaximum bei ca. 560 nm. Die Anregungseffizienz durch den verwendeten Laser mit 488 nm liegt bei ca. 55 %. Bei Alexafluor488 liegt das Anregungsmaximum bei ca. 490 nm. Hier ist die Anregungseffizienz bei 488 nm noch ca. 90 % (<http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>). Die esterolytisch inaktiven Kontrollzellen zeigten erneut nur eine geringe Hintergrundmarkierung beider Farbstoffe, was vermutlich wiederum als Produkt beginnender Spontanhydrolyse der Substrate interpretiert werden kann.

4.2.1.3 Differentielle zwei-Farben Markierung von *E. coli* Zellen durch Einsatz unterschiedlicher Substratverhältnisse

Eine Verwendung der *E. coli* zwei-Farben Markierung zur Isolierung von Enzymvarianten mit veränderter Enantioselektivität muß sich die vom Wildtyp abweichende Hydrolyse der eingesetzten enantiomeren Substrate zu Nutzen machen. Diese sollte sich wiederum direkt auf die Verteilung der verschiedenen Tyramidspezies und damit auf die Anzahl unterschiedlicher Fluorophormoleküle auf der Zelloberfläche auswirken. Solche Unterschiede müssen darüber hinaus durchflußzytometrisch detektierbar sein, um die zwei-Farben Markierung als Methode für eine Isolierung von Enzymvarianten mit unterschiedlicher Enantioselektivität zugänglich zu machen.

Zur Überprüfung der Detektierbarkeit unterschiedlich markierter Zellen, wurden erneut EstA präsentierende Zellen (JM109(pRep4, pBBX+)) wie im vorangegangenen Abschnitt gleichzeitig mit beiden Oktansäure-Tyramidestern markiert (3.6.3). Zur Simulation unterschiedlicher Hydrolyseraten gegenüber den enantiomeren Substraten wurden jedoch verschiedene Mischungsverhältnisse beider Esterspezies unter Erhalt der Gesamtsubstratkonzentration (1,14 μ M) eingesetzt. Die getesteten Verhältnisse des Oktansäure-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester zum Oktansäure-Biotin-Tyramidesters betragen 5:1, 10:1, 100:1, 1:5, 1:10 und 1:100. Die Markierungszeiten betragen wiederum 5 min. Die Analysen der unterschiedlichen Markierungsreaktionen erfolgten durchflußzytometrisch (3.6.5). Zur

Analyse der Depositionsmengen der unterschiedlichen Tyramidspezies wurden als Standards anhand einer zusätzlichen Markierungsreaktion mit einem 1:1-Substratverhältnis zwei Analyseregionen derart in das Fluoreszenzemissionshistogramm gelegt, daß jeweils ca. 50 % der fluoreszierenden Zellen einem der beiden Tyramid-Konjugate zugeordnet werden konnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 gezeigt.

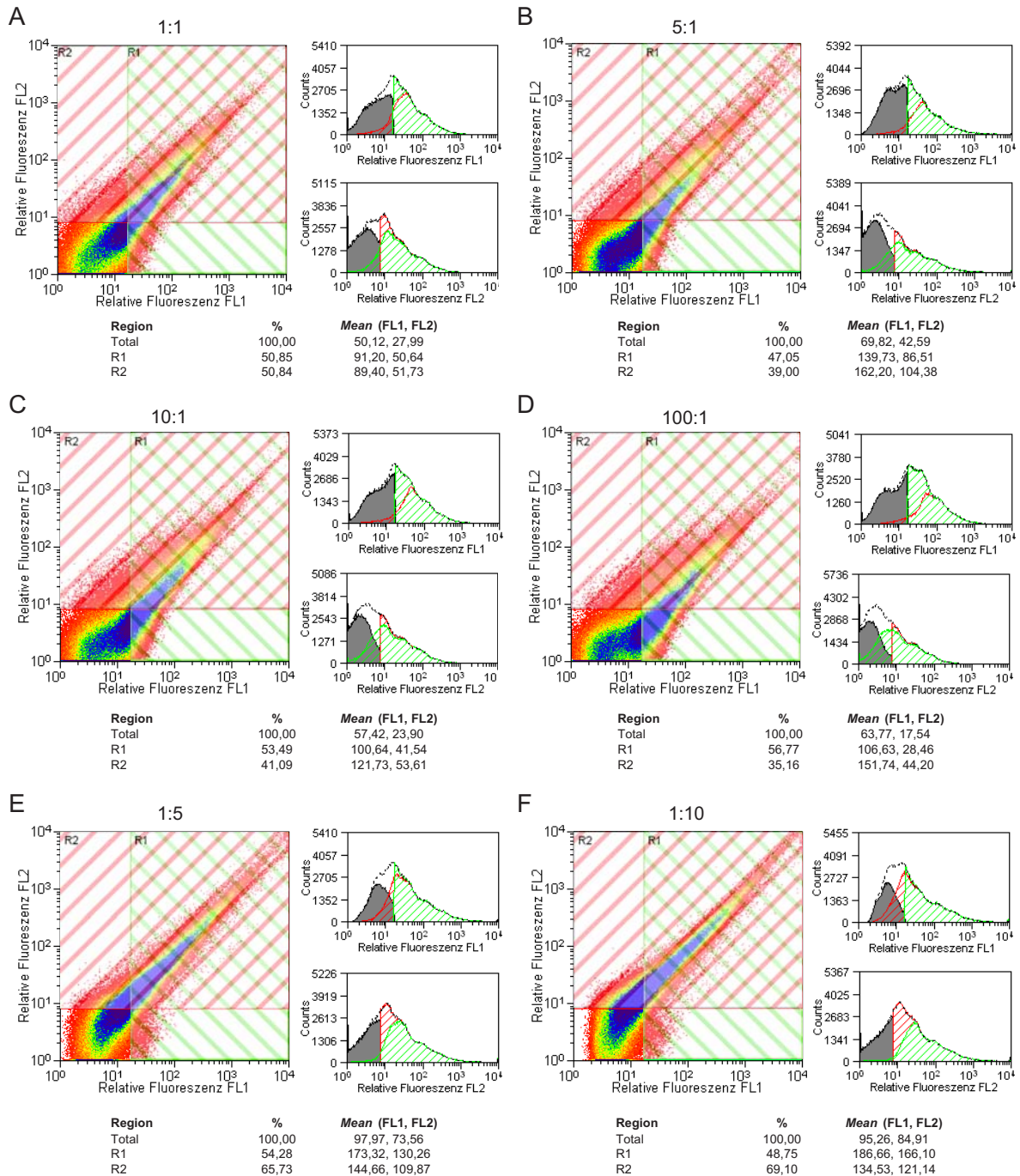


Abb. 4.13: Fortsetzung und Beschreibung auf der nächsten Seite.

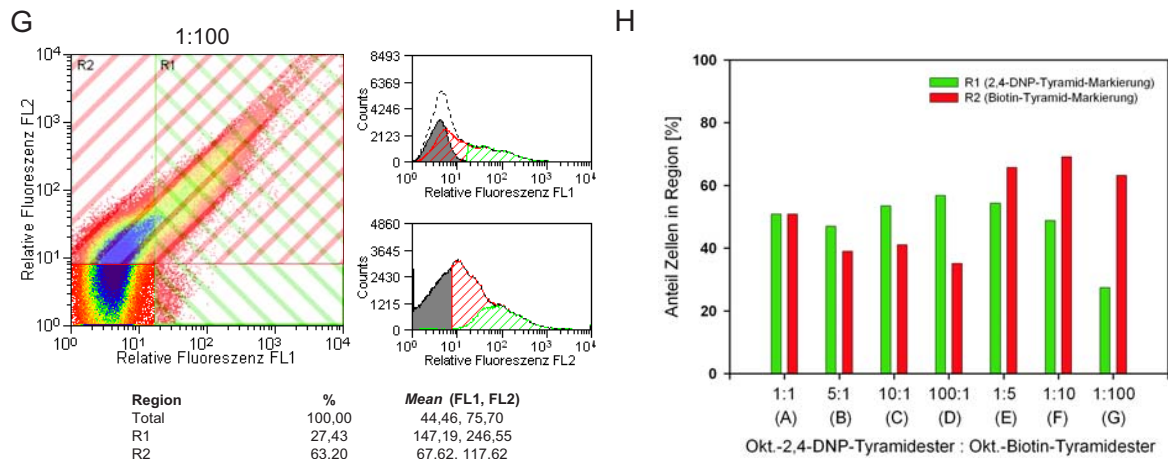


Abb. 4.13: Zwei-Farben Markierungen von *E. coli* Zellen mit Gemischen unterschiedlicher Verhältnisse aus Oktansäure-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester und Oktansäure-Biotin-Tyramidester. FACS-Histogramme. Markiert wurden EstA präsentierende Zellen. Die eingesetzten Verhältnisse (Oktansäure-2,4-Dinitrophenyl- zu Oktansäure-Biotin-Tyramidester) waren 1:1 (A), 5:1 (B), 10:1 (C), 100:1 (D), 1:5 (E), 1:10 (F) und 1:100 (G). Aufgetragen sind die Anzahl der für beide Kanäle gemessenen Ereignisse (Counts) und die zugehörigen relativen Fluoreszenzen. Die zur Analyse eingefügten Regionen repräsentieren die für die jeweilige Markierung spezifischen Fluoreszenzemissionsbereiche. Beide Regionen wurden anhand der Markierung mit dem 1:1-Gemisch so gelegt, daß sie jeweils ca. 50 % der Ereignisse beinhalteten. R1 (grün): 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Markierung, R2 (rot): Biotin-Tyramid-Markierung. Mean bezeichnet die mittleren relativen Fluoreszenzen pro Zelle im entsprechenden Bereich. (H) Zusammenfassung der Ergebnisse in Form der prozentualen Anteile der Gesamt Ereignisse in den entsprechenden Regionen.

Aus Abb. 4.13 geht hervor, daß sich die Verwendung unterschiedlicher Substratverhältnisse in der Tat auf die Verteilung der unterschiedlichen Tyramidspezies auf der Zelloberfläche auswirkt. Die Differenzen lassen sich jedoch deutlicher bei einem Überschuss an Oktansäure-Biotin-Tyramidester erkennen. Bei einem 5-fachen Überschuss werden bereits ca. 11 % mehr Ereignisse in der entsprechenden Region R2 registriert als in R1. Bei dem 10-fachen Überschuss steigt die Differenz beider Regionen auf ca. 21 %, um letztlich bei einem 100-fachen Überschuss einen Wert von ca. 36 % einzunehmen. Bei den Markierungen mit Überschüssen an Oktansäure-2,4-Dinitrophenylester sind die Differenzen nicht so deutlich. Bei einem 5-fachen Überschuss sind ca. 8 % mehr Ereignisse in der entsprechenden Region R1. Der 10-fache Überschuss liefert eine Differenz von ca. 12 %. Bei einem 100-fachen Überschuss liegt die Differenz bei ca. 21 % (Abb. 4.13 H).

4.2.2 Aufbau eines Modellanreicherungs-experiments

Die im vorangegangenen Kapitel durchgeführten Experimente zur spezifischen zwei-Farben Markierung von *E. coli* Zellen mit membranassoziierter lipolytischer Aktivität ermöglichten nun die Erprobung dieses Verfahrens in einem Modellexperiment zur spezifischen Markierung und Isolierung von Varianten eines lipolytischen Enzyms mit veränderter Substratspezifität. Der Selektionsmarker sollte dabei aufgrund der verhältnismäßig einfachen chemisch-synthetischen Zugänglichkeit und der gegebenen industriellen Relevanz die Veränderung bzw. Verbesserung der Enantioselektivität sein. Für ein solches Modellexperiment bedarf es jedoch zunächst eines geeigneten Enzym-

Substratpaares. Folgende Kriterien müssen für ein geeignetes Kandidatenpaar zutreffend sein: Zum einen muß das zu verwendende lipolytische Enzym einer Oberflächenpräsentation auf *E. coli* Zellen zugänglich sein. Zum anderen erfordert es die Verwendung eines chiralen Carbonsäurerests, dessen enantiomere Esterderivate durch das gewählte lipolytische Enzym *per se* hydrolysierbar sind. Die folgenden zwei Abschnitte befassen sich deshalb zunächst mit der Auswahl eines derartigen Enzym-Substratpaares. Die Abschnitte 4.2.2.3 und 4.2.2.4 beschreiben schließlich die Erzeugung und Charakterisierung von Bibliotheken des ausgewählten Enzyms.

4.2.2.1 Auswahl eines geeigneten Enzym-Substratpaares

Zur Durchführung eines Modellanreicherungsexperiments auf Basis der spezifischen *E. coli* zwei-Farben Markierung sollte eines der in Kapitel 4.1 untersuchten oberflächenpräsentierten Enzyme verwendet werden. Bei der Wahl eines zur Selektion auf Enantioselektivität geeigneten chiralen Carbonsäurerests müssen die katalytischen Eigenschaften des Zielenzyms gegenüber dem resultierenden Estersubstrat berücksichtigt werden. Bei einem geeigneten Kandidaten sollten die enantiomeren Ester der entsprechenden Carbonsäure durch das Zielenzym hydrolysierbar sein. Des Weiteren sollte das Zielenzym für ein Modellanreicherungsexperiment möglichst unselektiv gegenüber den enantiomeren Estern der gewählten Carbonsäure sein. Die Wahl eines geeigneten Enzym-Substrat-Paares fiel deshalb in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Reetz (MPI für Kohlenforschung, Mülheim/Ruhr) auf die *P. aeruginosa* Esterase EstA und die Enantiomere der 2-Methyldekan-säure (2-MDA). Diese Carbonsäure besitzt aufgrund des Methylsubstituenten am C2-Kohlenstoffatom ein chirales Zentrum und liegt somit in zwei enantiomeren Formen vor. Die Strukturen beider Moleküle sind in Abbildung 4.14 gezeigt.

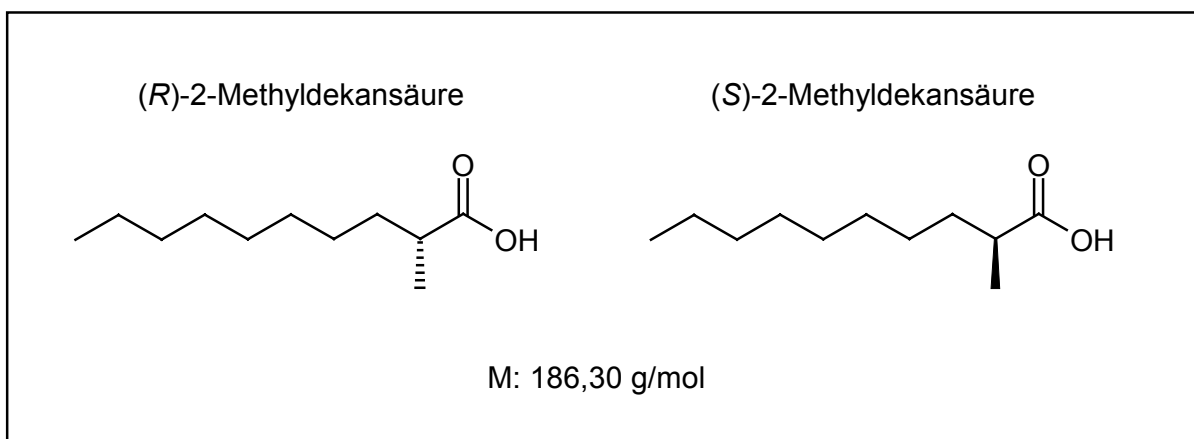


Abb. 4.14: Strukturformeln und zugehöriges Molekulargewicht der beiden Enantiomere der 2-Methyldekan-säure.

Gaschromatographische Analysen der EstA katalysierten Hydrolyse eines racemischen Gemisches von p-Nitrophenylesterderivaten beider enantiomeren Formen der 2-Methyldekan-säure ergaben eine nahezu unselektive Enantiopräferenz mit einem E_{true} -Wert von ca. 1 bei relativ hohen Hydrolyseraten und einer nur leichten Präferenz für das (S)-Enantiomer.

Dieses Enzym-Substrat-Paar schien somit ideal für ein Modellanreicherungs-experiment. Die dazu nötigen unterschiedlich konjugierten Tyramidester beider Enantiomere der 2-Methyldekansäure sowie entsprechende p-Nitrophenylesterderivate für spektralphotometrische Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Reetz am MPI für Kohlenforschung durch Horst Höbenreich synthetisiert und als Reinsubstanzen zur Verfügung gestellt. Zur Veresterung mit dem 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Konjugat wurde das (*R*)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure ausgewählt. Das (*S*)-Enantiomer wurde dementsprechend mit dem Biotin-Tyramid-Konjugat verestert. In Abbildung 4.15 sind die Strukturformeln aller in diesem Kapitel verwendeter 2-Methyldekansäureester dargestellt.

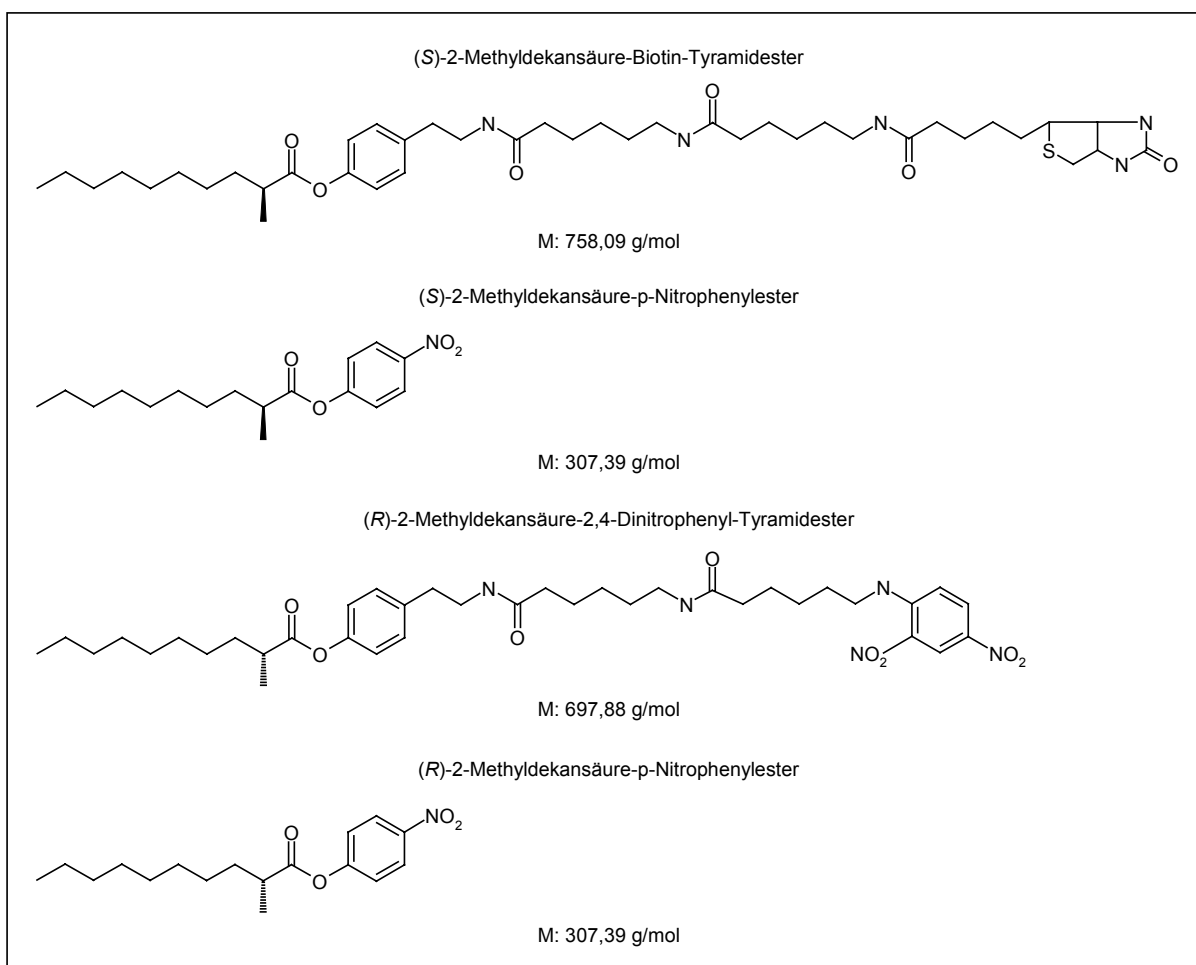


Abb. 4.15: Strukturformeln und zugehörige Molekulargewichte der in diesem Kapitel verwendeten Ester der 2-Methyldekansäure.

4.2.2.2 Untersuchung der Enantioselektivität lipolytischer Enzyme auf der *E. coli* Zelloberfläche gegenüber den Enantiomeren der 2-Methyldekansäure

Zur Validierung der am MPI für Kohlenforschung vorgenommenen GC-Analyse der Enantioselektivität von EstA sowie für potentielle weiterführende Anreicherungs-experimente wurde die Enantioselektivität von EstA und den in Kapitel 4.1 erzeugten EstA*-Fusionsproteinen gegenüber den Enantiomeren der 2-Methyldekansäure untersucht. Verwendet

wurden induzierte Zellen des Stammes JM109(pRep4), welche die Expressionsvektoren pBBX+, pEst100-BSLip, pEst100-FSCut und pEst100SMLip beherbergten. Zum Vergleich der Hydrolyseraten wurden sämtliche Messungen mit einer konstanten Zelldichte durchgeführt, die einer optischen Dichte von 0,4 bei 600 nm entsprach. Die Analysen wurden nach Methode 3.5.2.4 mit separaten Reaktionsansätzen für beide Enantiomere durchgeführt. Die Verläufe der verschiedenen Hydrolysereaktionen sind in Abbildung 4.16 dargestellt. Die Berechnung der jeweiligen Hydrolyseraten und E -Werte erfolgte anhand linearer Regressionsgeraden, die mit dem Programm *SigmaPlot* für jeden Reaktionsverlauf erstellt wurden. Die daraus erhaltenen E -Werte sind aufgrund der getrennten Reaktionsansätze für beide Enantiomere lediglich als apparente E -Werte zu betrachten (E_{app}), da auf diese Art der Messung potentielle inhibitorische und kompetitive Effekte nicht berücksichtigt werden.^[146,247]

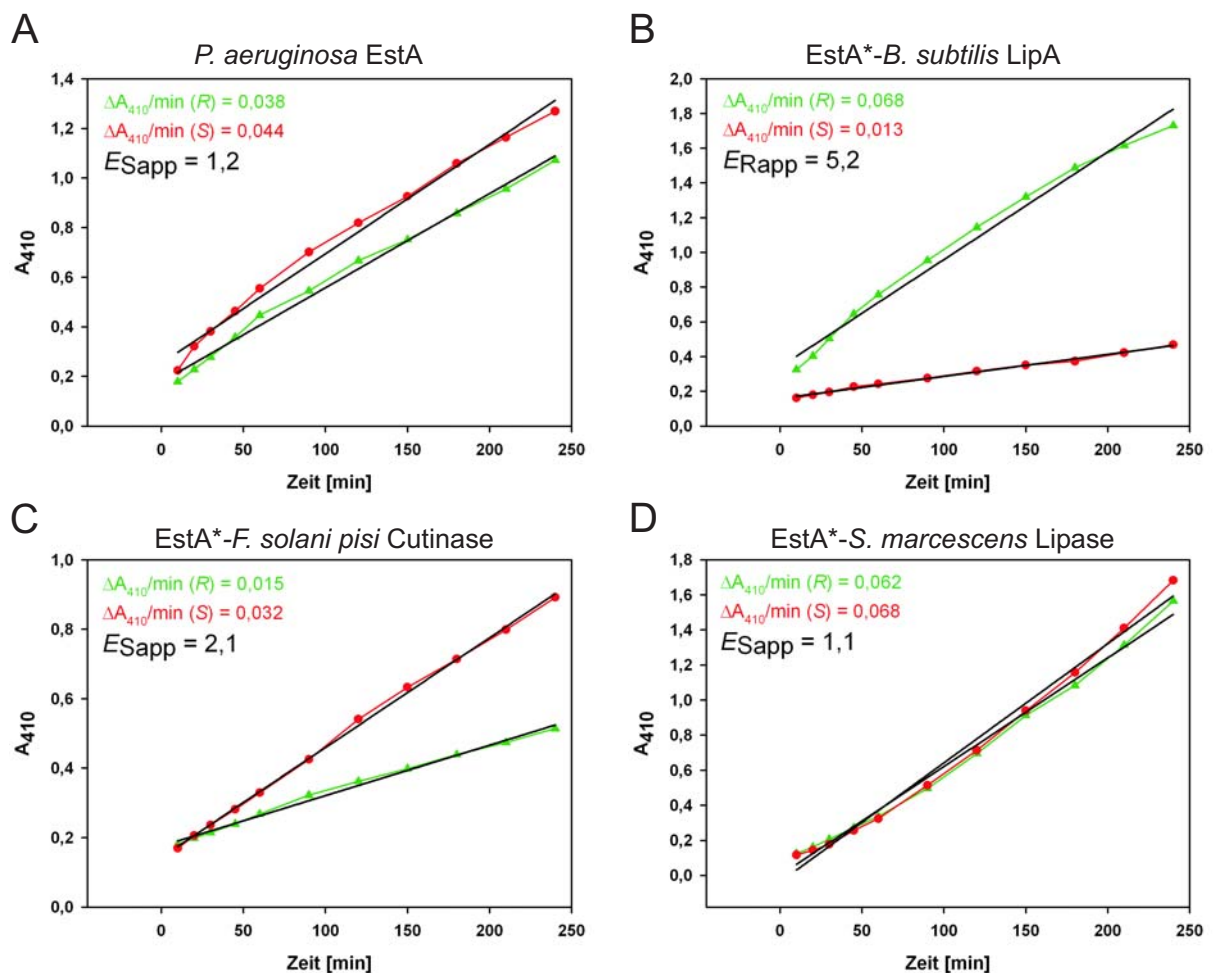


Abb. 4.16: Bestimmung der Substratumsätze der beiden enantiomeren p-Nitrophenylester der 2-Methyldekan-säure durch zelloberflächenpräsentierte lipolytische Enzyme. Grün: (R)-Enantiomer, rot: (S)-Enantiomer. Gemessen wurden die zelloberflächenpräsentierten Enzyme *Pseudomonas aeruginosa* EstA (A), EstA*-*Bacillus subtilis* LipA (B), EstA*-*Fusarium solani pisi* Cutinase (C) und EstA*-*Serratia marcescens* Lipase (D). Aufgetragen sind die Zeit gegen die Absorption bei 410 nm (A_{410}). Die Steigungen der Regressionsgeraden sind mit $\Delta A_{410}/\text{min}$ angegeben. E_{app} gibt die abgeleiteten apparenten E -Werte wieder. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer OD_{600} von 0,4.

Abbildung 4.16 zeigt, daß sich drei der vier getesteten Enzyme als mehr oder minder unselektiv gegenüber den enantiomeren p-Nitrophenylestern der 2-Methyldekansäure herausstellten. Die geringste Enantioselektivität zeigte das Fusionsprotein aus EstA* und der Lipase aus *S. marcescens* mit einem E_{app} -Wert von 1,1 und einer leichten Präferenz für das (S)-Enantiomer. Die Bestimmung des E_{app} -Werts von EstA deckte sich mit einem Betrag von 1,2 und einer ebenfalls leichten Präferenz für das (S)-Enantiomer mit dem Ergebnis der gaschromatographischen Analyse des Max-Planck-Instituts für Kohlenforschung. Das EstA*-Cutinase Fusionsprotein zeigte auch nur eine leichte Enantioselektivität mit einem E_{app} -Wert von 2,1 wiederum mit Präferenz für das (S)-Enantiomer. Lediglich die Fusion aus EstA* und der *B. subtilis* Lipase LipA zeigte eine Präferenz für das (R)-Enantiomer mit einem E_{app} -Wert von 5,2.

Anhand der Steigungen der Regressionsgeraden erfolgten ebenfalls die Berechnungen der Substratumsätze pro Minute für beide Enantiomere. Dies geschah auf Grundlage des molaren Extinktionskoeffizienten des Hydrolyseprodukts p-Nitrophenol (17,5/cm[nmol/µl]). Zur Abschätzung der esterolytischen Aktivität der verwendeten Konstrukte im *E. coli* Stamm JM109 gegenüber einem unverzweigten Substrat wurden zusätzlich die Substratumsätze pro Minute für Oktansäure-p-Nitrophenylester bestimmt (3.5.2.1). In Abbildung 4.17 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

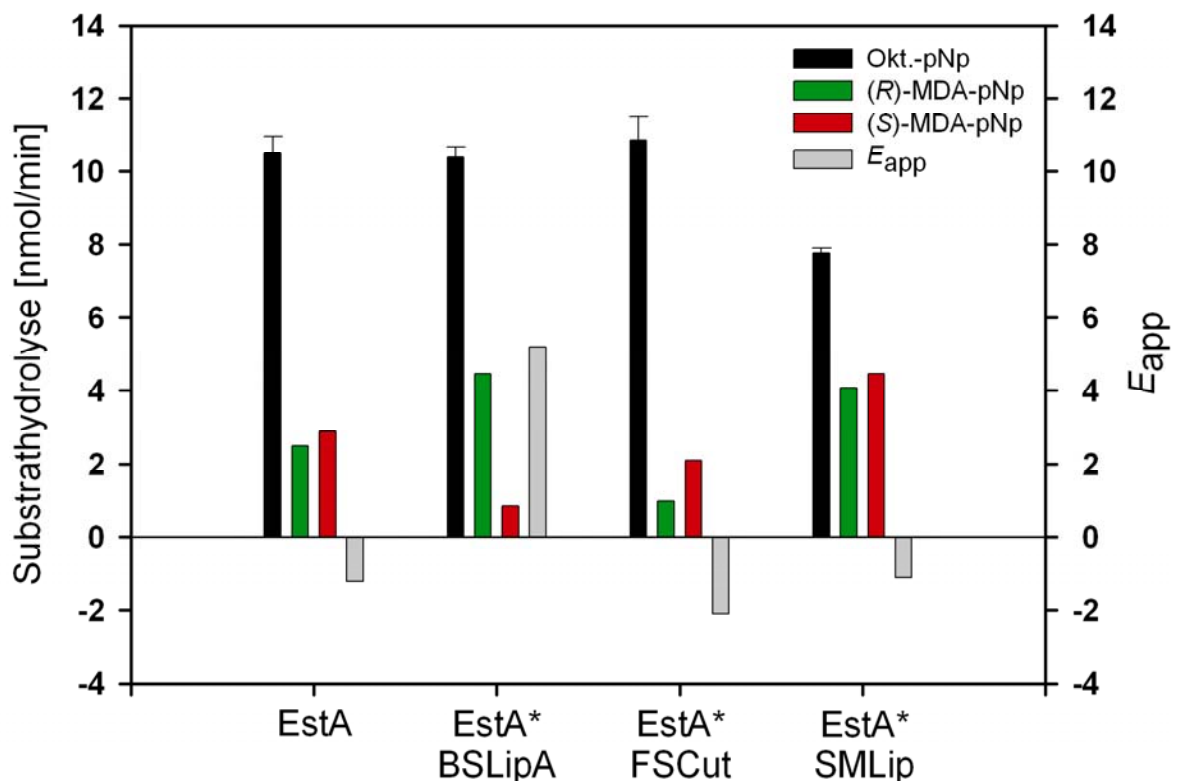


Abb. 4.17: Substratumsätze der oberflächenpräsentierten lipolytischen Enzyme EstA, EstA*-*B. subtilis* LipA, EstA*-*F. solani* pisi Cutinase und EstA*-*S. marcescens* Lipase gegenüber Oktansäure-p-Nitrophenylester (schwarz), (R)-2-MDA-p-Nitrophenylester (grün) und (S)-2-MDA-p-Nitrophenylester (rot). Die Ergebnisse repräsentieren jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer OD_{600} von 0,4 (Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen von Messungen, die zweimal durchgeführt wurden). Die errechneten apparenten E -Werte sind in grau dargestellt. Positive E_{app} -Werte repräsentieren eine Präferenz für das (R)-Enantiomer, negative für das (S)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure.

Alle getesteten oberflächenexponierten Enzyme zeigten im Vergleich zum Oktansäure-p-Nitrophenylester geringere Hydrolyseraten bei den enantiomeren Estern der 2-Methyldekansäure. Dies ist vermutlich auf sterische Hinderungen im aktiven Zentrum der Enzyme durch die längere Carbonsäurekette und den Methylsubstituenten am C2-Kohlenstoffatom zurückzuführen. Die größte Diskrepanz zeigte dabei das EstA*-Cutinase Fusionsprotein auf, mit weniger als 20 % Hydrolyseaktivität für das präferierte (S)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure. Die im Vergleich zum Oktansäure-p-Nitrophenylester höchste Hydrolyseaktivität gegenüber beiden Enantiomeren konnte bei dem EstA*-*S. marcescens* Lipase Fusionsprotein mit je etwa 50 % Aktivität gemessen werden. Bemerkenswerterweise zeigte dieses Enzym die geringste Aktivität gegenüber dem Oktansäure-p-Nitrophenylester. Bei EstA wurden Hydrolyseraten von etwa 20 % der für den Oktansäure-p-Nitrophenylester bestimmten Aktivität bei den enantiomeren Estern gemessen.

4.2.2.3 Erzeugung von EstA Enzybibliotheken

Die Durchführung eines Modellanreicherungs-experiments mit EstA als Zielenzym und den enantiomeren Tyramidestern der 2-Methyldekansäure als Markierungssubstrate erforderte die Erzeugung von Bibliotheken der katalytischen aminoterminalen Domäne dieses Enzyms. Aufgrund von Strukturvorhersagen wurden die ersten 351 Aminosäuren des reifen Enzyms als katalytische Domäne festgelegt (7.1). Eine Mutagenese mittels *error prone* PCR sollte deshalb die ersten 1053 Basen der kodierenden Sequenz von EstA umfassen (exklusive der kodierenden Sequenz für das EstA-eigene Signalpeptid). Für die Erzeugung solcher Bibliotheken wurde aus praktikablen Gründen ein Expressionsvektor benötigt, der die Klonierung entsprechender DNA-Fragmente mit nur einem Restriktionsenzym ermöglicht. Aufgrund der positiven Erfahrungen bei der Erzeugung der EstA*-Fusionsproteine (4.1.1) sollte dazu erneut die Restriktionsendonuklease *SfiI* verwendet werden. Die Insertion einer *SfiI* Erkennungsstelle zwischen den beiden funktionalen Domänen von EstA wurde mittels SOE-PCR (3.3.3) realisiert. Die Amplifikation des dafür zu ersetzenden Genabschnitts erfolgte mit den flankierenden Oligonukleotiden EstA-SOE1-AscI-lo und EstA-SOE2-AatII-up sowie den innen hybridisierenden Oligonukleotiden EstA-SOE1-SfiI-up und EstA-SOE2-SfiI-lo (2.4). Letztere führten durch eine Punktmutation (G1057C) die gewünschte *SfiI* Erkennungsstelle ein, was jedoch zwangsläufig zu einem Aminosäureaustausch an Position 353 (G353L) führte. Als Matrize diente das EstA Expressionsplasmid pBBX+ (2.2.1). Das resultierende Amplifikat wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.4) und anschließender Gelelution (3.2.5) von Nebenprodukten separiert, mit den Restriktionsendonukleasen *AscI* und *AatII* gespalten (3.3.1) und anschließend mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.3.2) und Ethanolpräzipitation (3.2.2.1) gereinigt. Als Akzeptorplasmid diente pEst100-BSLipA (4.1.1). Dies wurde ebenfalls mit *AscI* und *AatII* verdaut und das Vektorfragment über ein Agarosegel gereinigt. Nach Ligation (3.3.2) erfolgte die Transformation (3.1.4) von *E. coli* JM109(pRep4) (2.2.7) mit dem entstandenen Plasmid pEst100-BSLipA-SfiI. Die Überprüfung der Klonierung wurde mittels Restriktionsanalyse durchgeführt (3.3.1). Zur Insertion einer *SfiI* Erkennungsstelle am Beginn der kodierenden Sequenz von EstA erfolgte erneut eine PCR (3.3.3) mit dem Expressionsvektor pBBX+ als Templat und den

Oligonukleotiden EstA-N-SfiI-up und EstA-SOE2-SfiI-lo (2.4). Das resultierende Amplifikat wurde wiederum durch Extraktion und Fällung gereinigt und anschließend mit *SfiI* verdaut. Nach einer weiteren Reinigung mittels Extraktion und Fällung erfolgte die Ligation des Fragments in das Vektorrückgrat des ebenfalls mit *SfiI* gespaltenen und über ein Agarosegel gereinigten Vektors pEst100-BSLipA-Sfi. Die Transformation wurde wiederum mit *E. coli* Zellen des Stammes JM109(pRep4) durchgeführt. Als Akzeptorplasmid für Bibliotheken der katalytischen Domäne von EstA sollte der entstehende Vektor möglichst keine lipolytische Aktivität vermitteln. Da aufgrund der Gelreinigungen und der damit verbundenen UV-Bestrahlungen von einem Auftreten von Mutationen im klonierten Fragment ausgegangen werden konnte, erfolgte eine Durchmusterung der Transformanten auf esterolytische Inaktivität mittels Ausstrich auf Tributyrinselektivagarplatten (3.5.1). Bei inaktiven Einzelklonen erfolgte die Überprüfung der Klonierung mittels Restriktionsanalyse. Der letztlich gewählte enzymatisch inaktive Einzelklon wurde pEst101* genannt. Die Auswertung einer Nukleotidsequenzanalyse (Fa. Seqlab) dieses Klons ergab sechs Mutationen in der kodierenden Sequenz der aminoterminalen Domäne, die zu drei Aminosäureaustauschen führten (G85C, Q175R, G191C). Dieser Abschnitt wird bei der Erzeugung von Bibliotheken ersetzt. Ein vollständiges Schema der Klonierung von pEst101* ist in Abbildung 4.18 gezeigt.

Aufgrund des hohen G/C-Gehalts von 68 % der kodierenden Sequenz der katalytischen aminoterminalen Domäne von EstA war eine Amplifikation unter Mutagenesebedingungen nicht möglich. Des Weiteren erschwerte das Vorhandensein einer zusätzlichen inneren *SfiI* Erkennungsstelle die Klonierung dieses Fragments mittels *SfiI*. Aus diesen Gründen wurde unter Erhalt der Aminosäureabfolge eine synthetische kodierende Sequenz dieser Domäne entworfen (*SynEstA*), die durch die Verwendung der *E. coli*-eigenen Kodonhäufigkeit einen geringeren G/C-Gehalt von nur 60 % aufwies und keine innere *SfiI* Erkennungsstelle beinhaltete. Zur Klonierung in pEst101* wurden zusätzlich flankierende *SfiI* Erkennungsstellen angefügt. Der Entwurf dieser synthetischen Sequenz erfolgte mit Hilfe des *GCG Softwarepakets*. Die Synthese des insgesamt 1076 Basenpaare umfassenden DNA-Fragments übernahm die Fa. GENEART in Regensburg. Die Auslieferung erfolgte in Form des Plasmids 053870pPCR-Script (2.2.8). Die Nukleotidsequenz dieser, auf die *E. coli*-eigene Kodonhäufigkeit adaptierten kodierenden Sequenz der katalytischen aminoterminalen Domäne von EstA befindet sich im Anhang (7.2).

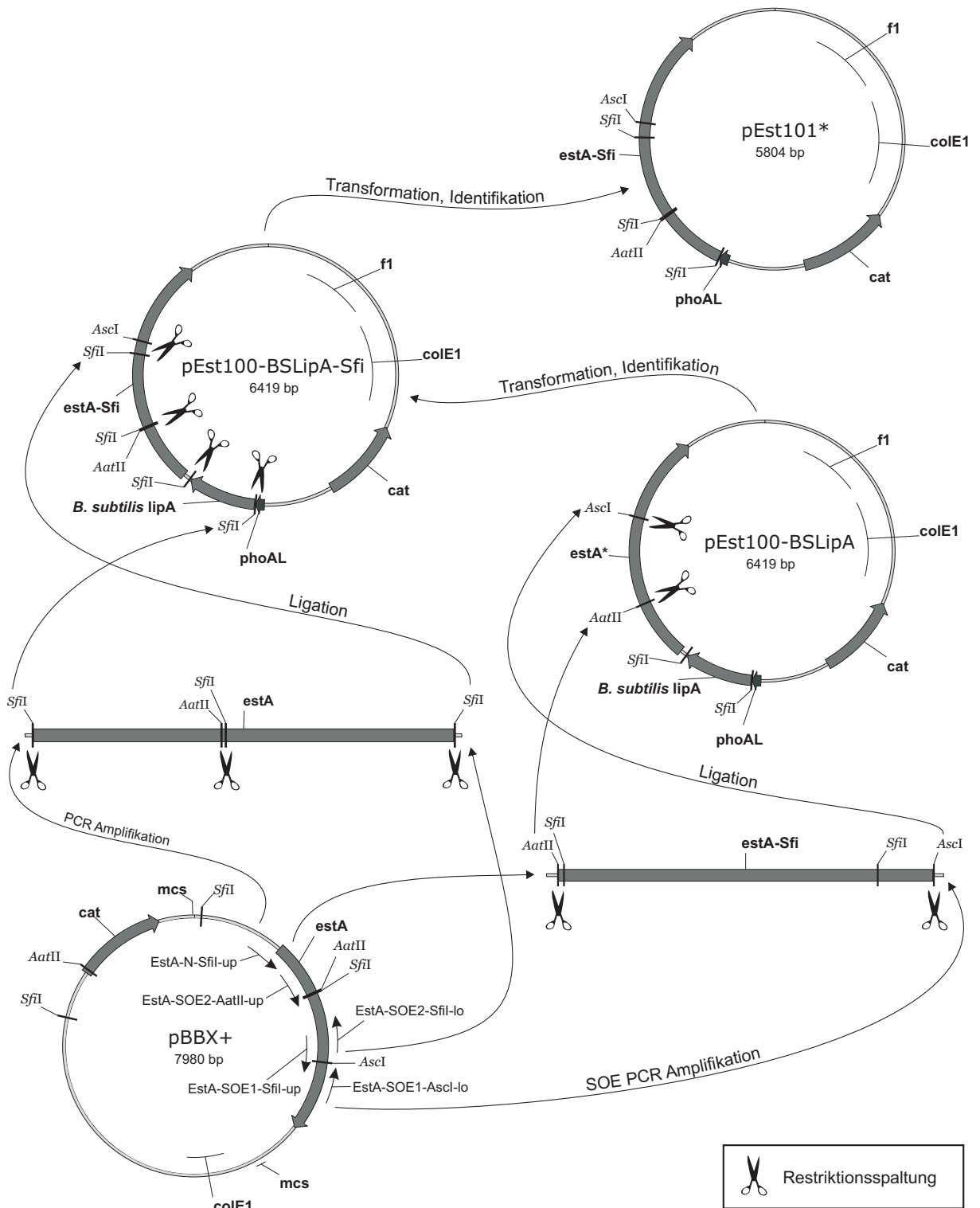


Abb. 4.18: Klonierungsschema von pEst101*.

Zur Erzeugung von Bibliotheken der katalytischen Domäne von EstA durch Zufallsmutagenese wurden auf Basis der synthetischen Sequenz mit 053870pPCR-Script als Matrize *epPCR* (*error prone*) Amplifikationen durchgeführt.^[255,256] Dazu wurden die Oligonukleotide SynEstA-up und SynEstA-lo (2.4) verwendet, die jeweils außerhalb der flankierenden *SfiI* Erkennungsstellen hybridisieren. Zwei Amplifikationsreaktionen wurden

unter unterschiedlichen Mutagenesebedingungen durchgeführt, die zur Erzeugung von Bibliotheken mit unterschiedlichen Fehlerraten führen sollten. Dazu wurde ein Ansatz mit 0,3 mM $MnCl_2$ erstellt und ein weiterer mit 0,75 mM. Diese Arbeiten wurden von Sebastian Buest aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jaeger am Institut für Molekulare Enzymtechnologie (Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Die bereitgestellten *epPCR* Produkte wurden zur Klonierung in pEst101* erneut mit den oben genannten Oligonukleotiden amplifiziert (3.3.3), durch Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.3.2) und Ethanolpräzipitation (3.2.2.1) gereinigt und anschließend mit *Sfi*I verdaut (3.3.1). Nach einer weiteren Reinigung mittels Extraktion und Fällung erfolgte die Ligation (3.3.2) in den ebenfalls mit *Sfi*I verdauten Vektor pEst101*. Das Vektorfragment wurde dazu vorher durch eine Sucroседichtegradientenzentrifugation (3.2.8) von den herausgeschnittenen DNA-Fragmenten und dem Restriktionsenzym separiert. Als Kontrolle erfolgte eine analoge Klonierung der synthetischen Sequenz ohne Zufallsmutagenese. Der entstandene Vektor wurde pEst101 genannt, die erzeugten Bibliotheken erhielten die Namen pEst101_0,3ep bzw. pEst101_0,75ep, entsprechend der verwendeten $MnCl_2$ Konzentrationen. Eine schematische Übersicht der beschriebenen Klonierungen ist in Abbildung 4.19 dargestellt.

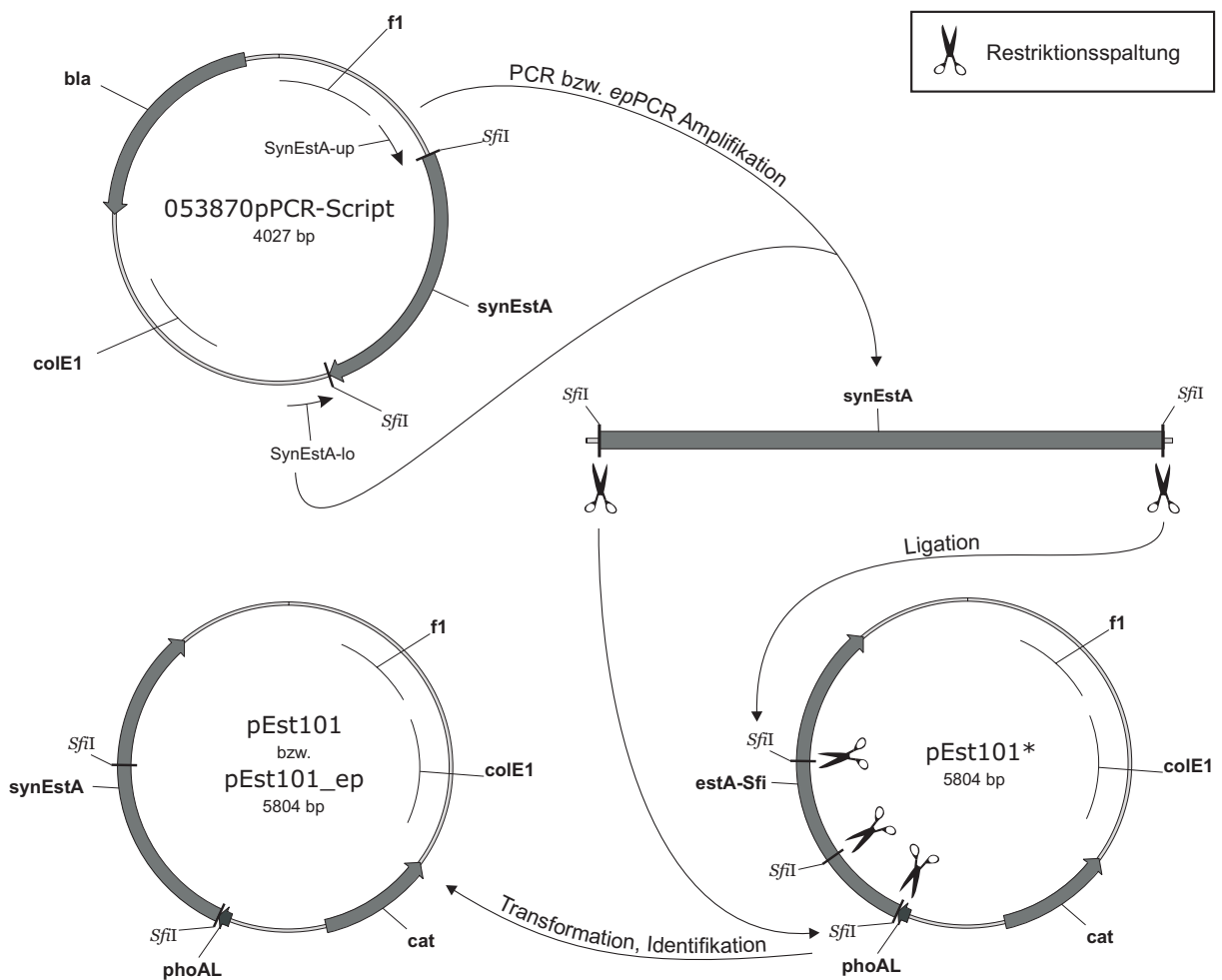


Abb. 4.19: Klonierungsschema von pEst101 und den pEst101 Bibliotheken.

Zur Erzeugung hoher Transformanzahlen wurden je Bibliothek zwölf Ligationsansätze erstellt. Transformiert (3.1.4) wurden *E. coli* Zellen des Stammes JM109(pRep4). Die Anzahl der Transformanten betrug $6,8 \times 10^7$ bei pEst101_0,3ep und $4,0 \times 10^7$ bei pEst101_0,75ep. Die Überprüfung der Klonierungen erfolgte erneut mittels Restriktions- und Nukleotidsequenzanalysen von Einzelklonen. Die daraus abgeleiteten Mutationsraten beider erzeugter Bibliotheken sind im nachfolgenden Abschnitt aufgeführt.

4.2.2.4 Charakterisierung der erzeugten EstA Enzymbibliotheken

Zur Charakterisierung der im vorhergehenden Kapitel erzeugten *SynEstA* Enzymbibliotheken pEst101_0,3ep und pEst101_0,75ep wurde Plasmid-DNA von je 10 Transformanten präpariert (3.2.6) und einer Restriktionsanalyse mit *Sfi*I unterzogen (3.3.1). Im Falle der Bibliothek pEst101_0,3ep zeigte dabei ein Klon die beiden charakteristischen Banden des Akzeptorplasmids pEst101*. Bei der pEst101_0,75ep Bibliothek konnte bei allen analysierten Transformanten das klonierte Fragment nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der Mutationsraten wurden Nukleotidsequenzanalysen von je 10 Einzelklonen beider Bibliotheken in Auftrag gegeben (Fa. SeqLab), die das klonierte Fragment beinhalteten. Die Auswertungen ergaben bei der mit 0,3 mM MnCl₂ erzeugten Bibliothek 31 Fehleinbauten auf 6825 sequenzierte Basen. Das entspricht einer Mutationsrate von 0,45 % und somit ca. 5 Basenaustauschen pro kloniertem Fragment (1063 bp). Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen deutete im Mittel auf 2 Aminosäureaustausche pro Variante hin. Die mit 0,75 mM MnCl₂ erzeugte Bibliothek zeigte erwartungsgemäß eine deutlich höhere Mutationsrate: Auf 8056 sequenzierte Basen wurden 66 Replikationsfehler gezählt. Das entspricht einer Mutationsrate von 0,82 % und ca. 9 Basenaustauschen pro kloniertem Fragment. Hierbei ergaben sich durch Betrachtung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen durchschnittlich 4 Aminosäuresubstitutionen pro Variante.

Zur Bestimmung der Anteile oberflächenpräsentationsfähiger Varianten wurden induzierte Zellen (3.6.1) beider Bibliotheken immunhistochemisch mit einem Kaninchen anti-EstA Antikörperserum markiert (3.6.2). Als Positivkontrolle dienten induzierte Zellen die das nicht mutagenisierte *SynEstA* („*SynEstA* Wildtyp“) präsentierten (pEst101). Die Negativkontrolle bildeten Zellen mit dem Plasmid pBBR1MCS (2.2.2). Die Markierungskaskade wurde komplettiert mit biotinyliertem anti-Kaninchen Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat. Die Analysen erfolgten durchflußzytometrisch (3.6.5). Die zur Analyse notwendige Region wurde so in das Fluoreszenz-emissionshistogramm gelegt, daß die Verteilungskurve markierter Zellen der Positivkontrolle möglichst vollständig erfasst wurde. Abbildung 4.20 fasst die Ergebnisse zusammen.

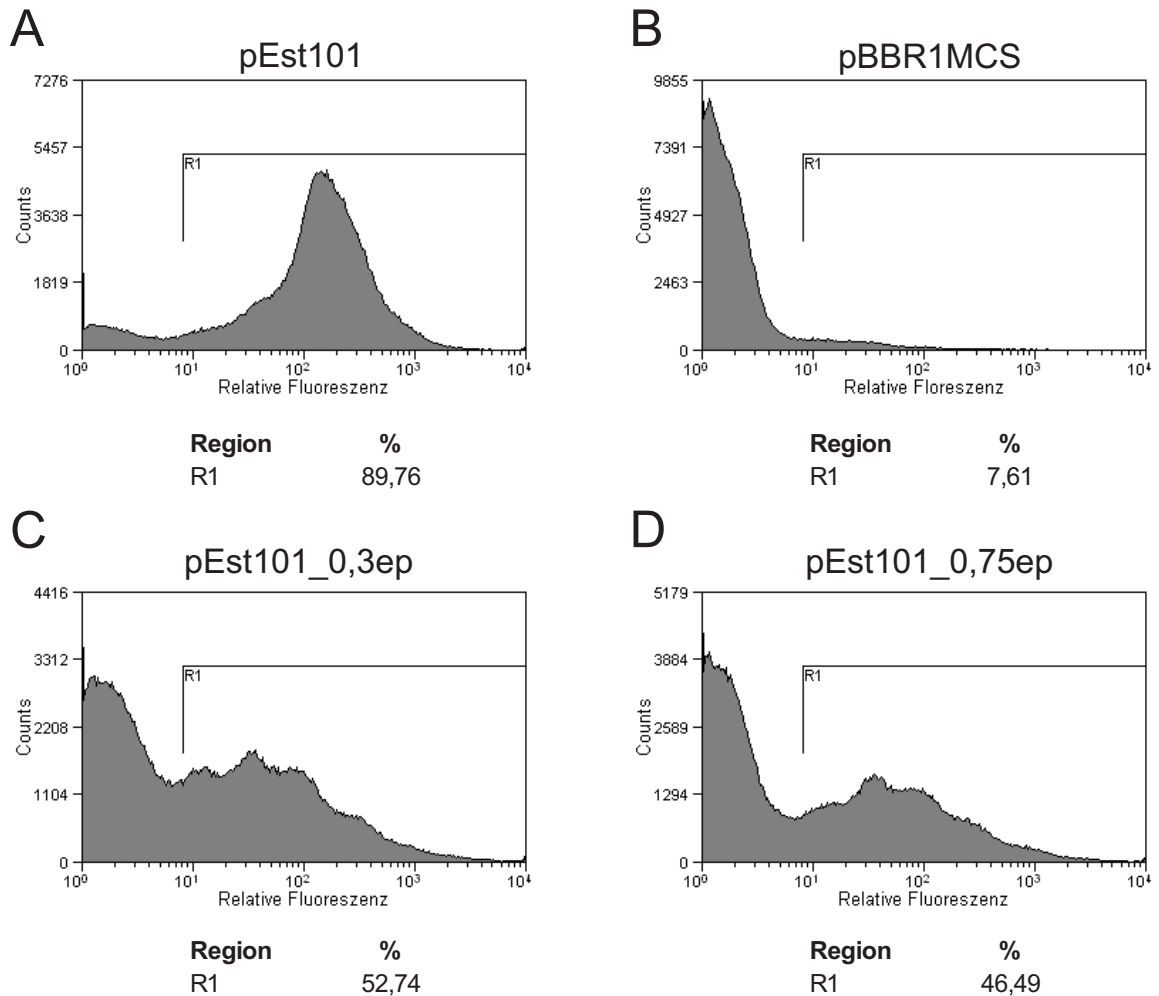


Abb. 4.20: Durchflußzytometrische Analyse der erzeugten *SynEstA* Bibliotheken pest101_0,3ep (C) und pEst101_0,75ep (D). FACS-Histogramme. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz pro Zellen und die Zellzahl (Counts). Nachgewiesen wurde die Oberflächenpräsentation von *SynEstA* mittels anti-EstA Antikörper. Als Kontrollen dienten „*SynEstA* Wildtyp“ präsentierende Zellen (pEst101, A) und Zellen mit Leervektor (pBBR1MCS, B).

Abbildung 4.20 zeigt, daß im Falle der mit 0,3 mM MnCl_2 erzeugten Bibliothek ca. 53 % und bei der mit 0,75 mM MnCl_2 erzeugten Bibliothek ca. 47 % der Zellen *SynEstA* auf ihrer Oberfläche präsentieren. Bemerkenswert ist außerdem das Auftreten mehrerer Fluoreszenzspitzen unterschiedlicher Intensitäten bei beiden Bibliotheken, während bei der *SynEstA* Wildtyp Kontrolle nur eine Fluoreszenzspitze zu erkennen ist. Dies ist eine phänotypische Indikation für die genetische Diversität der vermessenen Klone und deutet daraufhin, daß sich unterschiedliche Mutationsmuster auch auf die Anzahl oberflächenpräsentierter Esterasemoleküle pro Zelle auswirken.

Zur Charakterisierung der esterolytischen Aktivitäten beider Bibliotheken erfolgte die Bestimmung der Hydrolyseraten gegenüber Oktansäure-p-Nitrophenylester im Vergleich zum *SynEstA* Wildtyp (3.5.2.1). Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 4.21 dargestellt.

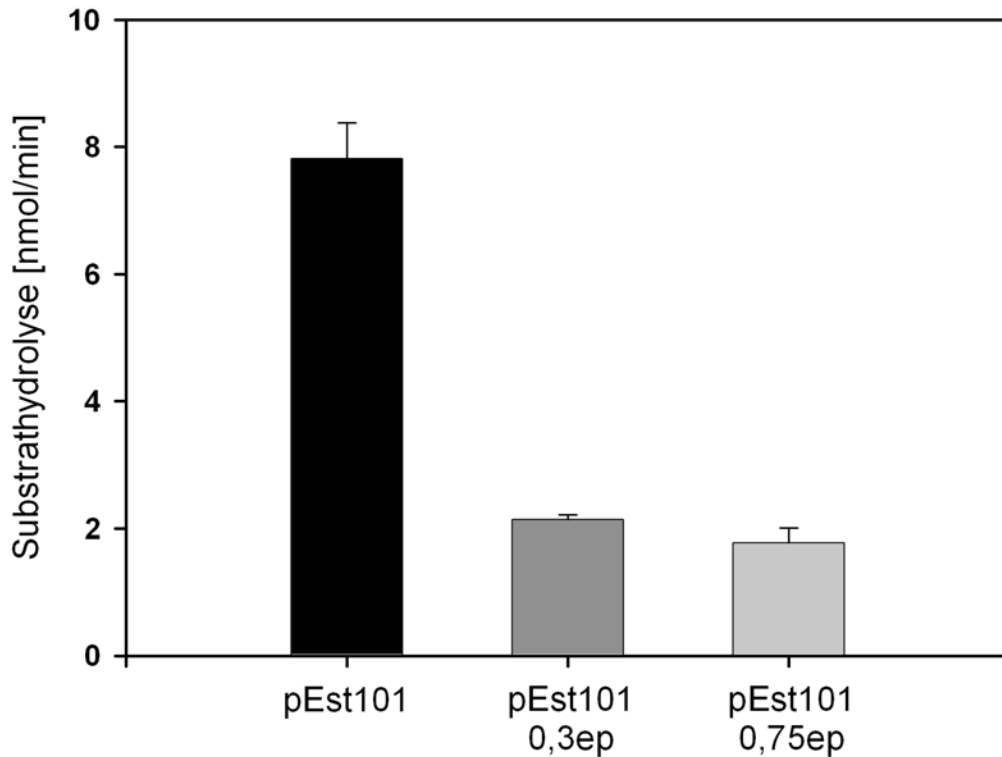


Abb. 4.21: Substratumsätze des *SynEstA* Wildtyps und der erzeugten *SynEstA* Bibliotheken gegenüber Oktansäure-p-Nitrophenylester. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer OD_{600} von 0,4 (Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen von Messungen, die zweimal durchgeführt wurden).

Beide Bibliotheken zeigten mehr als 20 % der esterolytischen Aktivität des *SynEstA* Wildtyps. Die mit 0,3 mM $MnCl_2$ fehlerinduzierte Bibliothek zeigte dabei mit ca. 27 % der Aktivität des Wildtyps eine leicht höhere Hydrolyserate als die mit 0,75 mM $MnCl_2$ erzeugte (ca. 23 %), obwohl erstere laut Restriktionsanalyse 10 % Klone beinhaltet, die das esterolytisch inaktive Akzeptorplasmid pEst101* beherbergen. Dies deutet auf eine höhere Anzahl esterolytisch defizienter Klone in der mit 0,75 mM $MnCl_2$ erzeugten Bibliothek hin. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Messungen der Anteile *SynEstA* präsentierender Zellen, bei denen auch die mit 0,75 mM $MnCl_2$ erzeugte Bibliothek einen geringeren Anteil positiver Klone aufwies (Abb. 4.19) und mit der durch Nukleotidsequenzanalyse bestimmten höheren Mutationsrate dieser Bibliothek, wie sie mit der höheren $MnCl_2$ Konzentration auch beabsichtigt war.

4.2.3 Isolierung und Charakterisierung von *SynEstA* Varianten mit veränderter Enantioselektivität

4.2.3.1 Vorversuche zur zwei-Farben Markierung mit enantiomeren Tyramidestern

Vor einer Anwendung der zwei-Farben Markierung zur Isolierung von *SynEstA* Varianten mit veränderter Enantioselektivität wurde in Vorversuchen die Zeitabhängigkeit einer Markierungsreaktion mit den enantiomeren Tyramidestern der 2-Methyldekansäure und *SynEstA* als Zielenzym untersucht. Dies sollte zur Abschätzung der für die Sortierungen zu verwendenden Reaktionszeit dienen. Dadurch sollte gewährleistet werden, daß nach Ablauf der Reaktionszeit von beiden Substraten noch ein Überschuss vorhanden ist und unspezifische Markierungen möglichst gering gehalten werden. Die Untersuchung der Substrathydrolysen entsprechender p-Nitrophenylesterderivate (Abb. 4.17) deuteten daraufhin, daß die enantiomeren Ester der 2-Methyldekansäure mit ca. 20 % der Effizienz des Oktansäure-p-Nitrophenylesters hydrolysiert werden. Eine den Oktansäure-Tyramidestern entsprechende Markierungseffizienz *SynEstA* präsentierender Zellen sollte also durch eine ca. 5-fach längere Reaktionszeit erreicht werden. Die Reaktionszeiten der Markierungen mit den Oktansäure-Tyramidestern betragen 5 min (Abb. 4.11 & 4.12). Zur Überprüfung der Zeitabhängigkeit der Markierungen wurden *SynEstA* präsentierende Zellen des Stammes JM109(pEst101) nach Methode 3.6.3 mit unterschiedlichen Reaktionszeiten und beiden enantiomeren 2-MDA-Tyramidestern jeweils getrennt und im 1:1-Gemisch markiert. Als Kontrolle dienten erneut Esterase defiziente Zellen der Spezies JM109(pBBR1MCS). Die verschiedenen Reaktionszeiten betragen 5 min, 30 min und 60 min. Die Analyse der verschiedenen Markierungen erfolgte durchflußzytometrisch (3.6.5). Zum Vergleich der Markierungen mit denen des Oktansäure-Biotin-Tyramidesters wurden in den Fluoreszenzmissionshistogrammen die Grenzen der Analyseregionen wie in Abschnitt 4.2.1.2 (Abb. 4.11) gewählt. Die Ergebnisse der Markierungen mit dem (*R*)-2-MDA-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester sind in Abbildung 4.22 wiedergegeben. Abbildung 4.23 stellt die *FACS*-Histogramme der Markierungen mit dem (*S*)-2-MDA-Biotin-Tyramidester dar. Die Ergebnisse der Markierungen mit dem 1:1-Gemisch beider enantiomerer Tyramidester sind in Abbildung 4.24 zusammengefasst.

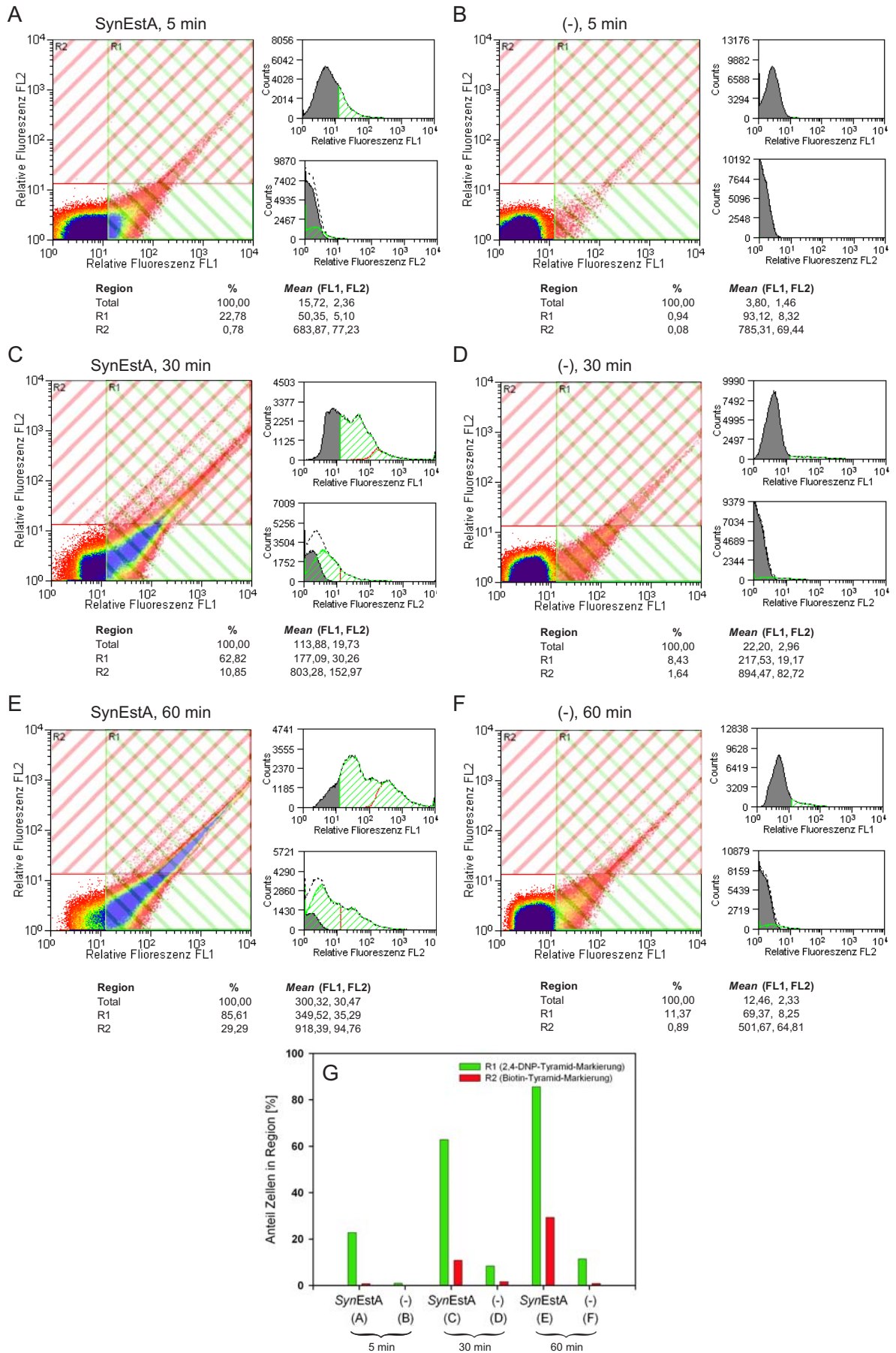


Abb. 4.22: Markierungen von *E. coli* Zellen mit (R)-2-MDA-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester und verschiedenen Reaktionszeiten. Die Beschreibung befindet sich auf Seite 88.

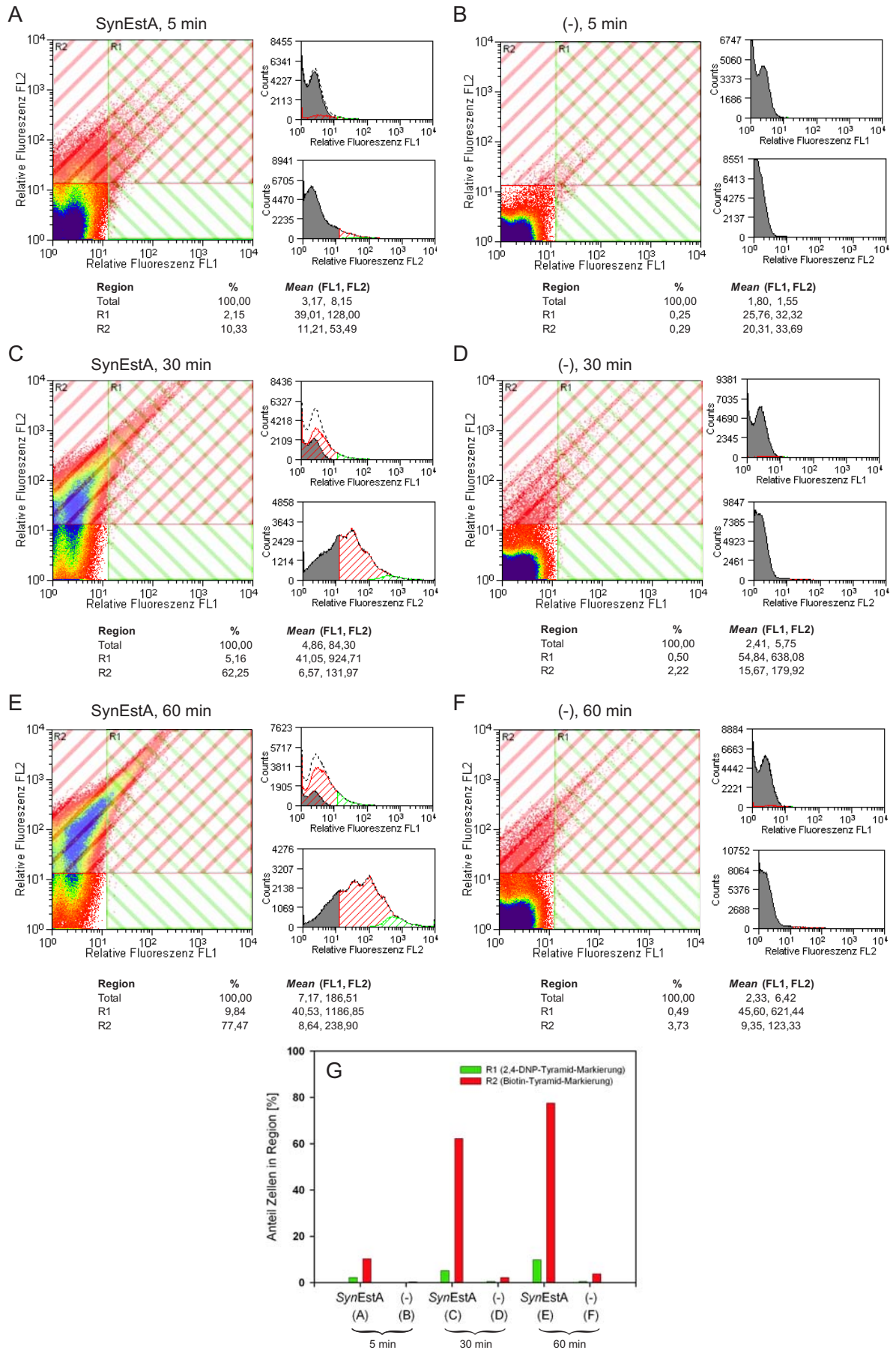


Abb. 4.23: Markierungen von *E. coli* Zellen mit (S)-2-MDA-Biotin-Tyramidester und verschiedenen Reaktionszeiten. Die Beschreibung befindet sich auf Seite 88.

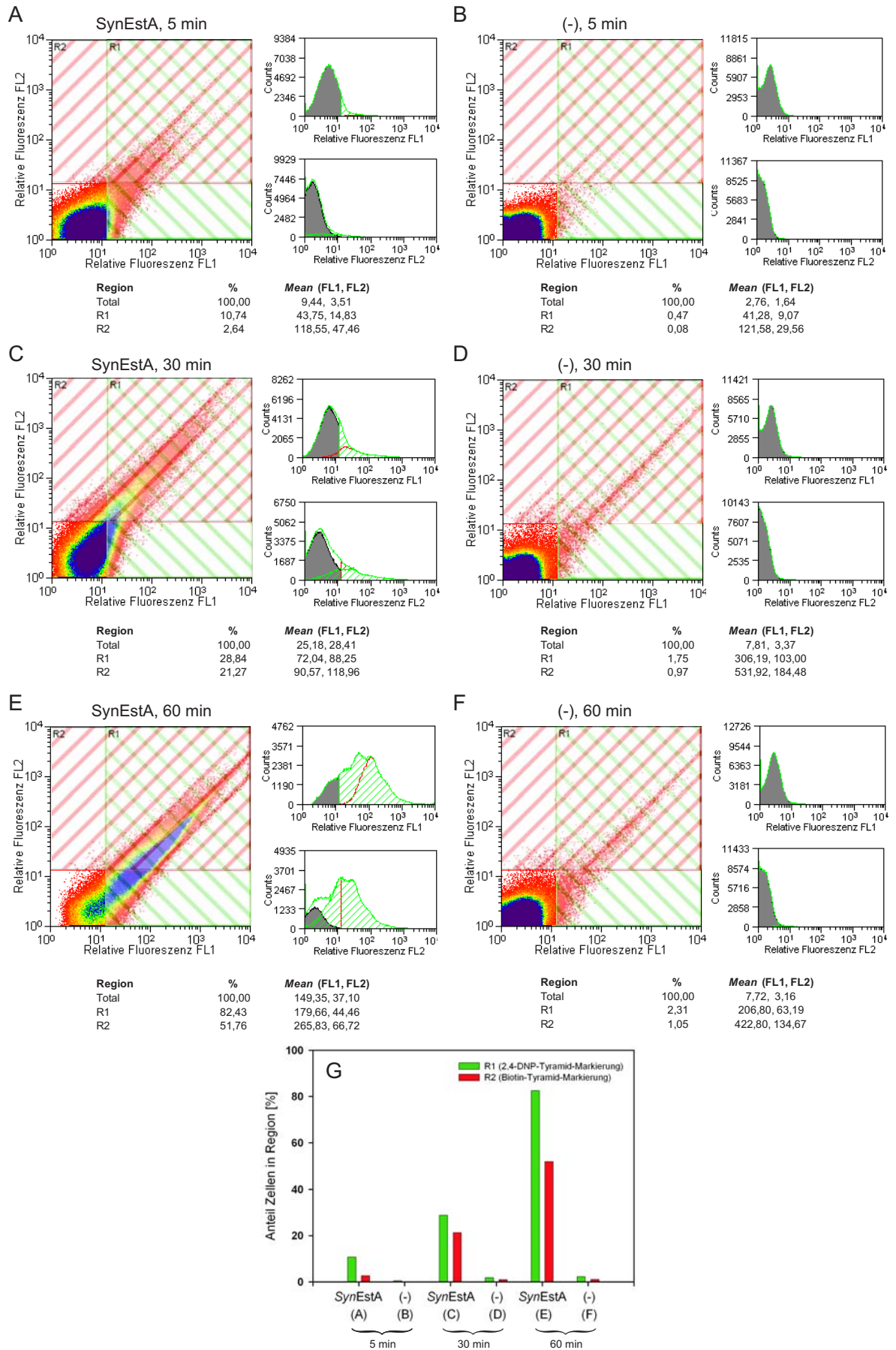


Abb. 4.24: Zwei-Farben Markierungen von *E. coli* Zellen mit einem 1:1-Gemisch beider enantiomerer Tyramidester und verschiedenen Reaktionszeiten. Die Beschreibung befindet sich auf der nächsten Seite.

Abb. 4.22 – 4.24: (vorherige Seiten) Markierungen von *E. coli* Zellen mit den enantiomeren Tyramidestern der 2-Methyldekansäure und verschiedenen Reaktionszeiten. **4.22:** (*R*)-2-MDA-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester (S. 85), **4.23:** (*S*)-2-MDA-Biotin-Tyramidester (S. 86), **4.24:** 1:1-Gemisch beider enantiomerer Tyramidester (S. 87). *FACS*-Histogramme. Markiert wurden EstA präsentierende Zellen (**A**, **C**, **E**) und esterolytisch inaktive Kontrollzellen (**B**, **D**, **F**). Die Reaktionszeiten betragen 5 min (**A**, **B**), 30 min (**C**, **D**) und 60 min (**E**, **F**). Aufgetragen sind die Anzahl der für beide Kanäle gemessenen Ereignisse (*Counts*) und die zugehörigen relativen Fluoreszenzen. Die zur Analyse eingefügten Regionen repräsentieren die für die jeweilige Markierung spezifischen Fluoreszenzemissionsbereiche: **R1** (grün): 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Markierung, **R2** (rot): Biotin-Tyramid-Markierung. *Mean* bezeichnet die mittleren relativen Fluoreszenzen pro Zelle im entsprechenden Bereich. (**G**) Zusammenfassung der Ergebnisse in Form der prozentualen Anteile der Gesamtergebnisse in den entsprechenden Regionen ((-): Kontrollzellen).

Die durchflußzytometrischen Analysen zeigten, daß die Markierungseffizienzen mit beiden enantiomeren 2-MDA-Tyramidestern im Vergleich zu denen der Oktansäure-Tyramidester deutlich geringer sind. Mit letzteren befanden sich bereits nach 5 min Reaktionszeit mehr als 80 % der markierten Zellen in der jeweils markierungsspezifischen Region (Abb. 4.11). Derartige Ergebnisse konnten mit den enantiomeren Tyramidestern der 2-Methyldekansäure erst nach 60 min erreicht werden. Die Bestimmung der Hydrolyseraten analoger *p*-Nitrophenylesterderivate zeigte eine ca. 5-fach effizientere Hydrolyse des Oktansäureesters gegenüber den enantiomeren 2-MDA-Estern (Abb. 4.17). Dies deutet an, daß sich auf Basis von *p*-Nitrophenylesterderivaten ermittelte Hydrolyseraten nicht direkt auf die Markierungseffizienzen analoger Tyramidester übertragen lassen. Die Esterase-defizienten Kontrollzellen zeigten erneut lediglich einen leichten Hintergrund an unspezifischer Markierung, der bei fünfminütiger Reaktionszeit geringer ausfällt als bei den Oktansäure-Tyramidestern (Abb. 4.11), was vermutlich auf eine höhere Stabilität der 2-Methyldekansäureester in wässriger Lösung zurückzuführen ist. Die unspezifischen Markierungen nehmen jedoch mit zunehmender Reaktionszeit zu und sind im Falle des (*R*)-2-MDA-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidesters insgesamt ausgeprägter. Nach 30 min sind bereits ca. 8 % der Kontrollzellen mit 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Konjugat markiert und ca. 2 % mit Biotin-Tyramid-Konjugat. Bei den Markierungen mit dem Substratgemisch ist erneut eine Verschiebung der Gesamtverteilung in Richtung Fluoreszenz FL1 (entspricht der Deposition des 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Konjugats) zu erkennen, wie sie bereits bei der Gemischmarkierung mit den unterschiedlichen Oktansäure-Tyramidestern zu beobachten war (Abb. 4.12).

4.2.3.2 Durchmusterung der mit 0,3 mM MnCl₂ erzeugten *SynEstA* Bibliothek

Für ein Modellanreicherungs experiment zur Isolierung von *SynEstA* Varianten mit veränderter Enantioselektivität wurde zuerst die mit 0,3 mM MnCl₂ erzeugte Bibliothek durchmustert. Dazu wurden induzierte Zellen (3.6.1) in 4 Ansätzen nach Methode 3.6.3 mit einem 1:1-Gemisch beider enantiomerer Tyramidester der 2-Methyldekansäure markiert. Um den Hintergrund an unspezifischer Markierung durch Spontanhydrolyse möglichst gering zu halten, wurde eine Reaktionszeit von 5 min gewählt. Die Selektionsregionen für die *FACS*-Sortierung (3.6.5) wurden anhand einer Diagonalen durch das Fluoreszenzemissionshistogramm so gelegt, daß markierte Zellen einen Überschuss eines der Fluorophormoleküle,

die zum Nachweis der beiden unterschiedlichen Tyramid-Konjugate verwendet wurden, auf ihrer Zelloberfläche gekoppelt haben mußten, um aussortiert zu werden. Die Region R1 repräsentierte dabei eine überwiegende Markierung mit Alexafluor488, was auf eine präferentielle Hydrolyse des (*R*)-2-MDA-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidesters zurückzuführen sein sollte. Region R2 sollte dagegen nur Zellen beinhalten, die vorwiegend mit R-Phycoerythrin markiert waren und somit eine Präferenz für das (*S*)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure in Form des Biotin-Tyramidesters aufweisen sollten. Zur Überprüfung der Anreicherung wurden von den aussortierten Zellen beider Richtungen Aliquots entnommen und erneut durchflußzytometrisch vermessen. Die Fluoreszenzmissionshistogramme der Sortierung sind in Abbildung 4.25 dargestellt.

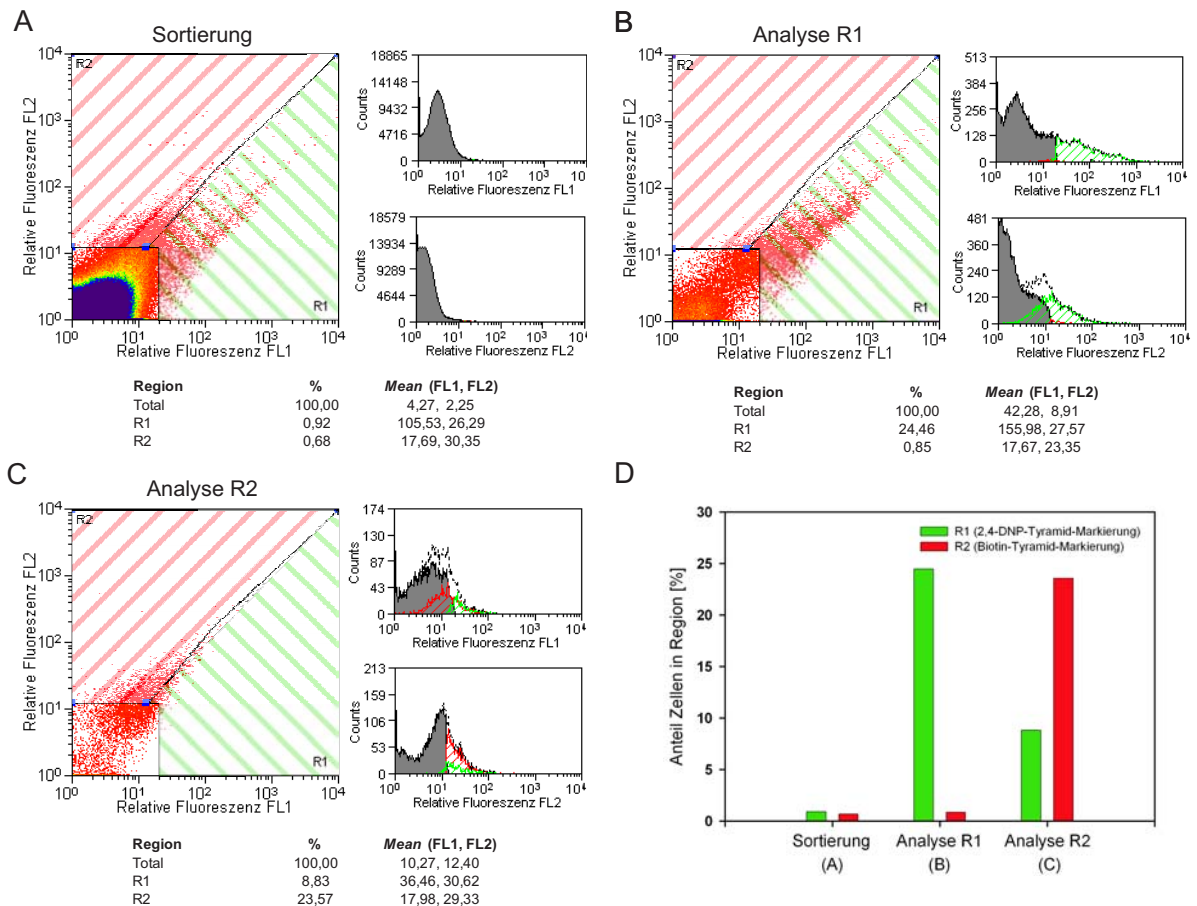


Abb. 4.25: Sortierung der mit 0,3 mM MnCl_2 erzeugten *SynEstA* Bibliothek auf veränderte Enantioselektivität. Markiert wurde mit einem 1:1-Gemisch aus (*R*)-2-MDA-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester und (*S*)-2-MDA-Biotin-Tyramidester. Gezeigt sind die *FACS*-Histogramme der Sortierung (**A**) sowie der Analysen der nach Präferenz für das (*R*)-Enantiomer (**B**) und das (*S*)-Enantiomer (**C**) der 2-Methyldekansäure aussortierten Zellen nach der Sortierung. Aufgetragen sind die Anzahl der für beide Kanäle gemessenen Ereignisse (*Counts*) und die zugehörigen relativen Fluoreszenzen. Die zur Sortierung eingefügten Regionen repräsentieren Bereiche, die einem Überschuss an Markierung eines der beiden Tyramid-Konjugate entsprechen. **R1** (grün): 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Markierung, **R2** (rot): Biotin-Tyramid-Markierung. *Mean* bezeichnet die mittleren relativen Fluoreszenzen pro Zelle im entsprechenden Bereich. (**D**) Zusammenfassung der Ergebnisse in Form der prozentualen Anteile der Gesamtresultate in den entsprechenden Regionen.

Beide Selektionsregionen beinhalteten jeweils ca. 1 % der fluoreszierenden Zellen. Insgesamt wurden ca. $7,3 \times 10^8$ Zellen sortiert. Das entsprach in etwa der 10-fachen Menge der Transformanten dieser Bibliothek und sollte gewährleisten, daß möglichst jeder Klon

betrachtet wurde. Aussortiert wurden durch Region R1 ca. $1,1 \times 10^6$ Zellen und durch Region R2 ca. $7,4 \times 10^5$ Zellen. In beiden Fällen stieg der Anteil der Zellen in den entsprechenden Regionen von ca. 1 % auf ca. 25 % nach der Sortierung. Bei den Zellen, die nach Präferenz für das (*S*)-Enantiomer aussortiert wurden (Region R2) waren nach der Sortierung jedoch noch ca. 9 % im Bereich der Region R1 ((*R*)-Enantiomer). Zur Vermehrung der aussortierten Zellen beider Selektionsrichtungen wurden diese getrennt auf Selektivagarplatten ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden zusätzlich Verdünnungsplattierungen durchgeführt. Diese ergaben eine Lebendzellzahl von ca. $3,2 \times 10^5$ für die aussortierten Klone der Region R1 und ca. $2,2 \times 10^5$ für die Region R2. Das entsprach in beiden Fällen einer Überlebensrate von ca. 30 %.

Für eine weitere Sortierungsrunde wurden die Zellen beider Sortierungen abgeerntet und separat voneinander angezogen und induziert. Die Markierungen mit dem 1:1-Gemisch der enantiomeren 2-MDA-Tyramidester erfolgten wie bei der ersten Sortierung, jedoch nun für beide Populationen getrennt voneinander. Die Reaktionszeit betrug wiederum 5 min. Als Selektionsfenster dienten die gleichen Regionen wie bei der ersten Sortierung. Sortiert wurden aus beiden Populationen nur solche Zellen, die in der Region auftraten, auf der die jeweilige Population nach der ersten Sortierung basierte. Auch hier erfolgte zur Überprüfung der Anreicherungen eine durchflußzytometrische Analyse der aussortierten Zellen. Abbildung 4.26 zeigt die Histogramme dieser zweiten Sortierungsrunde.

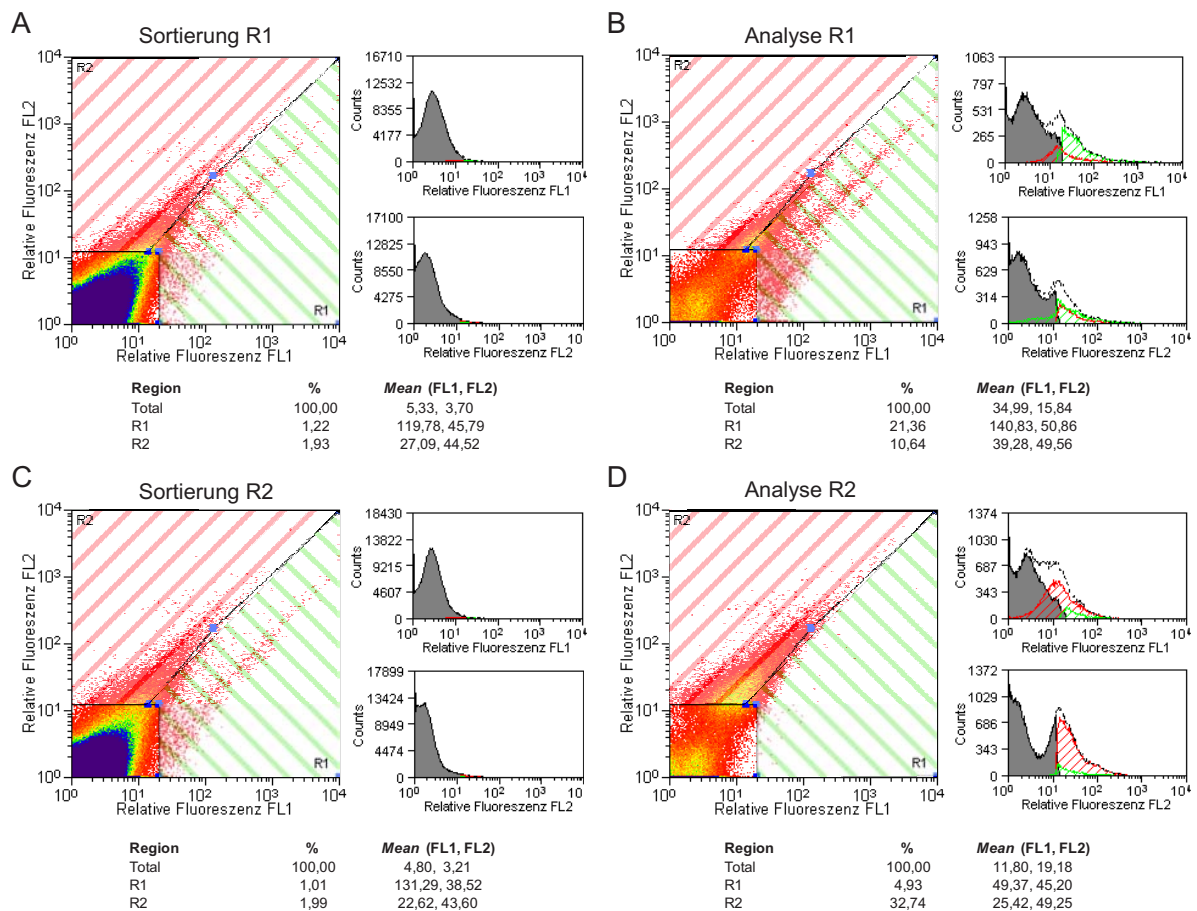


Abb. 4.26: Fortsetzung und Beschreibung auf der nächsten Seite.

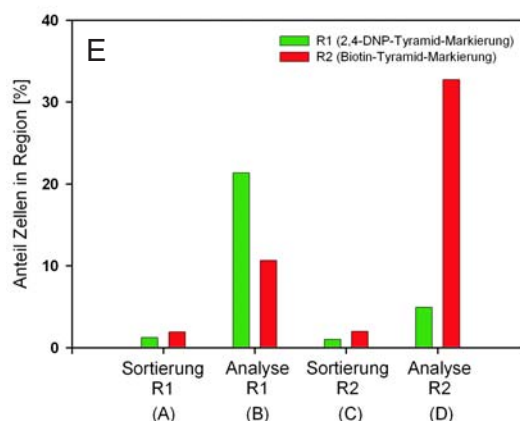


Abb. 4.26: Zweite Sortierungsrunde der mit 0,3 mM MnCl_2 erzeugten *SynEstA* Bibliothek. Markiert wurden die isolierten und vermehrten Zellen der ersten Runde mit einem 1:1-Gemisch aus (*R*)-2-MDA-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester und (*S*)-2-MDA-Biotin-Tyramidester. Gezeigt sind die *FACS*-Histogramme der Sortierungen (**A**, **C**) sowie der Analysen (**B**, **D**) der nach Präferenz für das (*R*)-Enantiomer (**A**, **B**) und das (*S*)-Enantiomer (**C**, **D**) der 2-Methyldekansäure sortierten Zellen nach der Sortierung. Aufgetragen sind die Anzahl der für beide Kanäle gemessenen Ereignisse (*Counts*) und die zugehörigen relativen Fluoreszenzen. Die zur Sortierung eingefügten Regionen repräsentieren Bereiche die einem Überschuss an Markierung eines der beiden Tyramid-Konjugate entsprechen. **R1** (grün): 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Markierung, **R2** (rot): Biotin-Tyramid-Markierung. *Mean* bezeichnet die mittleren relativen Fluoreszenzen pro Zelle im entsprechenden Bereich. (**E**) Zusammenfassung der Ergebnisse in Form der prozentualen Anteile der Gesamtereignisse in den entsprechenden Regionen.

Für die Selektion auf eine Präferenz für den Ester der (*R*)-2-Methyldekansäure wurden insgesamt ca. $6,0 \times 10^7$ Zellen sortiert. Isoliert wurden ca. $9,0 \times 10^5$ Zellen. Dies entsprach ca. 1,2 % in der entsprechenden Region R1. Trotz der vorangegangenen Anreicherung fiel ein Anteil von ca. 2 % in die Region R2, welche die Präferenz für das (*S*)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure repräsentierte. Nach der Sortierung stieg der Anteil der Zellen in Region R1 auf ca. 21 %. Von diesen wurden abschließend 3 mal je 144 Klone auf Selektivagarplatten vereinzel (3.6.5). Die Zellen der Sortierung auf eine Präferenz für den Ester der (*S*)-2-Methyldekansäure wurden auf analoge Weise durch Region R2 sortiert. In dieser traten ebenfalls ca. 2 % der markierten Zellen auf. Region R1 beinhaltete noch ca. 1 % der markierten Zellen. Sortiert wurden insgesamt ca. $5,2 \times 10^7$ Zellen, davon wurden ca. $1,2 \times 10^6$ isoliert. Nach der Sortierung traten ca. 33 % der vermessenen Zellen in Region R2 und nur noch ca. 5 % in Region R1 auf. Von ersteren wurden ebenfalls 3 x 144 auf Selektivagarplatten vereinzel.

Die aussortierten und vereinzelten Klone dieser zweiten Anreicherungsrunde wurden über Nacht bei 37°C angezogen. Bei einer anschließenden Auszählung der Platten ergaben sich von insgesamt 432 vereinzelten Zellen pro Selektionsrichtung etwa 34 % angewachsene Kolonien für die isolierten Zellen der Region R1 ((*R*)-Präferenz) und etwa 40 % für die der Region R2 ((*S*)-Präferenz). Von den Platten beider Selektionsrichtungen wurden jeweils 10 Klone separat angezogen und induziert. Zur groben Abschätzung der vorhandenen Enantioselektivitäten erfolgten Endpunktbestimmungen der Substrathydrolysen mit den *p*-Nitrophenylesterderivaten beider Enantiomere der 2-Methyldekansäure (3.5.2.4). Die Einschätzungen erfolgten durch den Vergleich des Quotienten aus $\text{OD}_{410(R)}/\text{OD}_{410(S)}$ eines jeden Klons mit dem des *SynEstA* Wildtyps. Von den 20 getesteten Klonen zeigte dabei ein

Klon aus der Population, die nach (*R*)-Präferenz aussortiert wurde, eine vom Wildtyp abweichende Enantioselektivität. Das $OD_{410(R)}/OD_{410(S)}$ -Verhältnis von 1,5 des Klons pEst101_0,3ep_2F4 deutete auf eine Inversion der Enantioselektivität hin (*SynEstA* Wildtyp = 0,5). Eine genauere Charakterisierung dieses Klons ist in Abschnitt 4.2.3.4 beschrieben. Die restlichen Klone zeigten bei den Endpunktbestimmungen keine signifikanten Abweichungen vom Wildtyp.

4.2.3.3 Durchmusterung der mit 0,75 mM $MnCl_2$ erzeugten *SynEstA* Bibliothek

In einem zweiten Anreicherungsansatz mit den enantiomeren Tyramidestern der 2-Methyldekansäure wurde die mit 0,75 mM $MnCl_2$ erstellte *SynEstA* Bibliothek durchmustert. Hierbei wurde die Selektionsstrategie jedoch leicht modifiziert. In einer ersten Sortierungsrunde sollte die Bibliothek nun erst auf die Oberflächenpräsentation von *SynEstA* hin angereichert werden. Auf diese Art sollte der Anteil *SynEstA* präsentierender Zellen für eine spätere Markierung und Durchmusterung erhöht werden, da in dieser Bibliothek ein Überschuss (ca. 55 %) an *SynEstA* defizienten und damit für die Durchmusterung uninteressanten Zellen vorhanden war (Abb. 4.20).

Dazu wurden induzierte Zellen (3.6.1) der Bibliothek mit einem Kaninchen anti-EstA Antikörper markiert. Der Nachweis der Markierung geschah mittels biotinyliertem anti-Kaninchen Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat (3.6.2). Als Kontrollen dienten Wildtyp *SynEstA* präsentierende Zellen der Spezies JM109(pEst101) und Zellen ohne Oberflächenpräsentation (JM109(pBBR1MCS)). Die Anreicherungen wurden mittels *FACS*-Sortierung durchgeführt (3.6.5). Das Sortierfenster wurde dafür anhand der Kontrollen so gelegt, daß möglichst viele Zellen der Positiv- und möglichst wenige der Negativkontrolle in der entsprechenden Region auftraten. Dadurch ergaben sich für die Bibliothek ca. 45 % der markierten Zellen in der Selektionsregion (Abb. 4.27 C). Sortiert wurden insgesamt $1,0 \times 10^8$ Zellen, davon wurden $4,8 \times 10^7$ isoliert und anschließend einer Resortierung unterzogen. Bei dieser traten ca. 66 % der vermessenen Zellen im Sortierfenster auf (Abb. 4.27 D). Von $2,9 \times 10^7$ sortierten Zellen wurden nun $1,8 \times 10^7$ isoliert. Die folgende Überprüfung der Resortierung ergab abschließend ca. 83 % Zellen im Sortierfensterfenster (Abb. 4.27 E). Die aussortierten Zellen wurden auf Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C vermehrt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden erneut zusätzliche Verdünnungsplattierungen angefertigt. Diese ergaben ca. $1,5 \times 10^7$ isolierte Klone nach Resortierung, was einer Überlebensrate von ca. 83 % entsprach. Zur Überprüfung der Anreicherung erfolgte nach Vermehrung und Induktion der sortierten Zellen eine erneute Markierung mit dem anti-EstA Antikörper. Die Histogramme der anti-EstA Sortierung sind in Abbildung 4.27 zusammengefaßt.

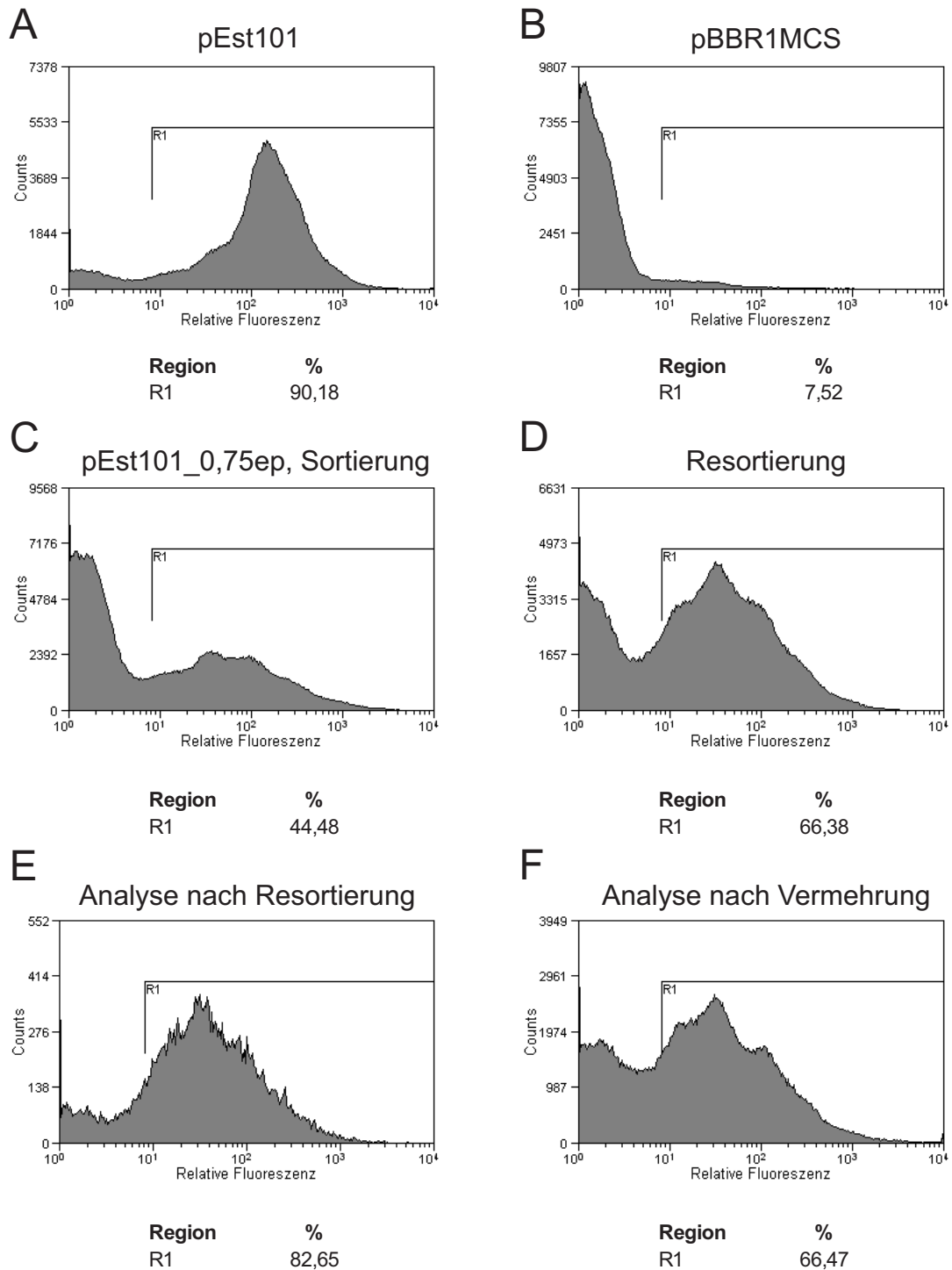


Abb. 4.27: Sortierung der mit 0,75 mM $MnCl_2$ erzeugten *SynEstA* Bibliothek mit einem anti-EstA Antikörper. FACS-Histogramme. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz pro Zelle und die Zellzahl (*Counts*). Als Kontrollen dienten Wildtyp *SynEstA* präsentierende Zelle (**A**) und Zellen ohne Oberflächenpräsentation (**B**). Nach Sortierung (**C**) und Resortierung (**D**) erfolgte eine Messung der aussortierten Zellen (**E**). **R1** bezeichnet das zur Sortierung verwendete Sortierfenster. Die aussortierten Zellen wurden zur Überprüfung der Anreicherung nach Vermehrung und Induktion erneut mit anti-EstA Antikörper markiert (**F**).

Bei der durchflußzytometrischen Analyse traten ca. 66 % der aussortierten und neu angezogenen Zellen in der für die Sortierung verwendeten Region auf (Abb. 4.27, F). Die Differenz von ca. 12 % zum Histogramm der Überprüfung der Resortierung beruht

möglicherweise auf unspezifischer Markierung durch den verwendeten anti-EstA Antikörper, der bei der Negativkontrolle schon eine Hintergrundmarkierung von ca. 8 % erzeugte. Dies führt zwangsläufig auch zur Isolierung falsch-positiver Zellen. Da zumindest eine Anreicherung von ca. 20 % im Vergleich zur Ausgangsbibliothek erreicht werden konnte, wurde auf eine weitere Vorsortierung mit dem anti-EstA Antikörper verzichtet. Zur Überprüfung der Wirkung dieser Anreicherung auf die Enzymaktivität wurde zusätzlich die Hydrolyserate der selektierten Population gegenüber Oktansäure-p-Nitrophenylester bestimmt (3.5.2.1). Das Ergebnis ist in Abbildung 4.28 dem *SynEstA* Wildtyp und der unsortierten Bibliothek gegenübergestellt.

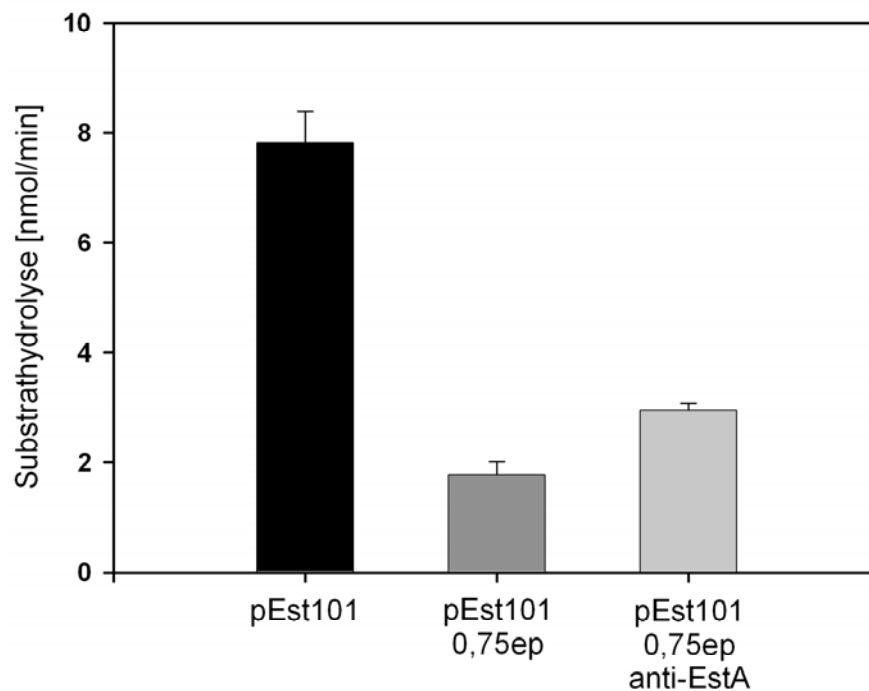


Abb. 4.28: Substratumsätze der mit 0,75 mM $MnCl_2$ erzeugten *SynEstA* Bibliothek vor und nach Sortierung mit einem anti-EstA Antikörper im Vergleich zum *SynEstA* Wildtyp (pEst101). Als Substrat diente Oktansäure-p-Nitrophenylester. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer OD_{600} von 0,4 (Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen von Messungen, die zweimal durchgeführt wurden).

Die Bestimmung der esterolytischen Aktivität bestätigte ebenfalls die Anreicherung. Die anti-EstA sortierte Bibliothek zeigte dabei ca. 15 % mehr Aktivität als die unsortierte, obwohl lediglich auf Präsentation und nicht auf Aktivität angereichert wurde.

Für die eigentliche Durchmusterung auf veränderte Enantioselektivität wurden induzierte Zellen der anti-EstA angereicherten Bibliothek dann mit dem 1:1-Gemisch der beiden enantiomeren 2-MDA-Tyramidester markiert (3.6.3). Die Markierungszeit betrug erneut 5 min. Die Regionen für die durchflußzytometrische Sortierung (3.6.5) wurden hierbei jedoch so limitierend gelegt, daß ausschließlich Ereignisse mit einer homogenen Fluorophormarkierung in einer der entsprechenden Regionen auftreten sollten, was bei beiden Regionen 0,01 % der markierten Zellen entsprach. Insgesamt sortiert wurden $6,8 \times 10^7$ Zellen. Dies entsprach in etwa der 5-fachen Menge an Zellen, die bei der anti-EstA Sortierung isoliert wurden. Damit sollte wiederum gewährleistet werden, daß möglichst alle dieser Klone

betrachtet wurden. Die Fluoreszenzemissionshistogramme dieser Sortierung sind in Abbildung 4.29 wiedergegeben.

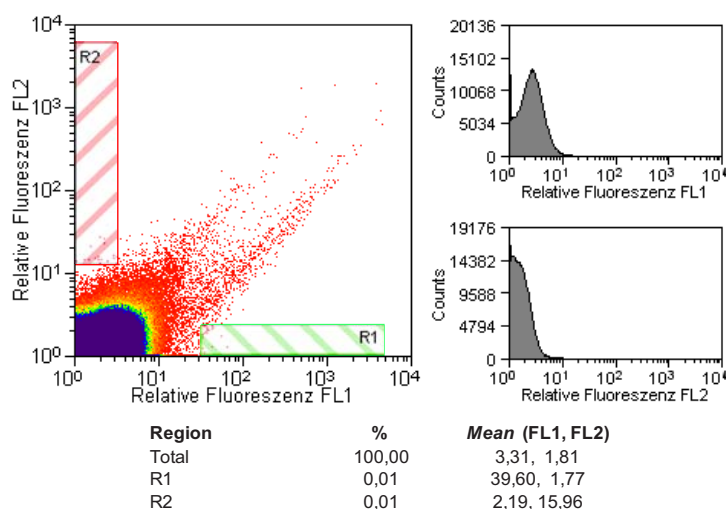


Abb. 4.29: Sortierung der mit 0,75 mM MnCl₂ erzeugten *SynEstA* Bibliothek auf veränderte Enantioselectivität. Markiert wurde mit einem 1:1-Gemisch aus (*R*)-2-MDA-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester und (*S*)-2-MDA-Biotin-Tyramidester. FACS-Histogramme. Aufgetragen sind die Anzahl der für beide Kanäle gemessenen Ereignisse (*Counts*) und die zugehörigen relativen Fluoreszenzen. Die zur Sortierung eingefügten Regionen repräsentieren distinkte Bereiche einer jeweiligen Markierungsart. **R1** (grün): 2,4-Dinitrophenyl-Tyramidmarkierung, **R2** (rot): Biotin-Tyramidmarkierung. *Mean* bezeichnet die mittleren relativen Fluoreszenzen pro Zelle im entsprechenden Bereich.

Isoliert wurden ca. 3600 Klone durch Region R1, die erneut die Präferenz für das (*R*)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure repräsentierte und ca. 2300 Klone in Region R2, die entsprechend eine Präferenz für das (*S*)-Enantiomer darstellte. Aufgrund dieser geringen Anzahlen wurde auf eine Überprüfung der Anreicherung und Resortierung verzichtet. Die isolierten Klone beider Sortierungsrichtungen wurden getrennt voneinander ausplattiert und über Nacht bei 37°C vermehrt. Die anschließende Auszählung der Platten ergab 86 angewachsene Kolonien bei der Sortierung auf Präferenz für das (*R*)-Enantiomer und 52 Kolonien bei der für das (*S*)-Enantiomer. Dies entspricht in beiden Fällen ca. 2 % der Anzahl aussortierter Ereignisse.

Von jeder Sortierungsrichtung wurden dann 35 Einzelklone separat angezogen und induziert (3.6.1). Die Abschätzung der Enantioselectivitäten erfolgte mittels Endpunktbestimmungen der esterolytischen Eigenschaften gegenüber p-Nitrophenylesterderivaten beider Enantiomere der 2-Methyldekansäure (3.5.2.4). Von den 35 getesteten Klonen der (*R*)-Sortierung zeigten dabei 4 Klone erneut eine Inversion der Enantioselectivität mit einer Präferenz für das (*R*)-Enantiomer, 4 Klone waren esterolytisch inaktiv, die restlichen 27 zeigten die Enantioselectivität des Wildtyps. Bei den getesteten Klonen der (*S*)-Sortierung waren 6 enzymatisch inaktiv, von den restlichen 29 Klonen zeigte keiner eine vom Wildtyp abweichende Enantioselectivität für eines der beiden Enantiomere. Die genauere Charakterisierung der isolierten Klone mit invertierter Enantioselectivität (pEst101_0,75ep_A5, pEst101_0,75ep_B11, pEst101_0,75ep_D10 und pEst101_0,75ep_D11) ist Gegenstand des nächsten Abschnitts.

4.2.3.4 Charakterisierung isolierter Einzelklone

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Isolierung von insgesamt 5 *SynEstA* Varianten aus zwei Bibliotheken unterschiedlicher Fehlerraten beschrieben, die bei Endpunktbestimmungen der Hydrolyseraten mit p-Nitrophenylesterderivaten beider Enantiomere der 2-Methyldekansäure im Vergleich zum Wildtyp eine Inversion der Enantioselektivität aufwiesen. Zur eingehenderen Charakterisierung dieser Varianten wurden zunächst genaue Bestimmungen der Substratumsätze gegenüber den enantiomeren p-Nitrophenylesterderivaten der 2-Methyldekansäure durchgeführt sowie die Ableitung der daraus resultierenden apparenten *E*-Werte (3.5.2.4). Als Kontrolle diente der *SynEstA* Wildtyp. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.30 wiedergegeben.

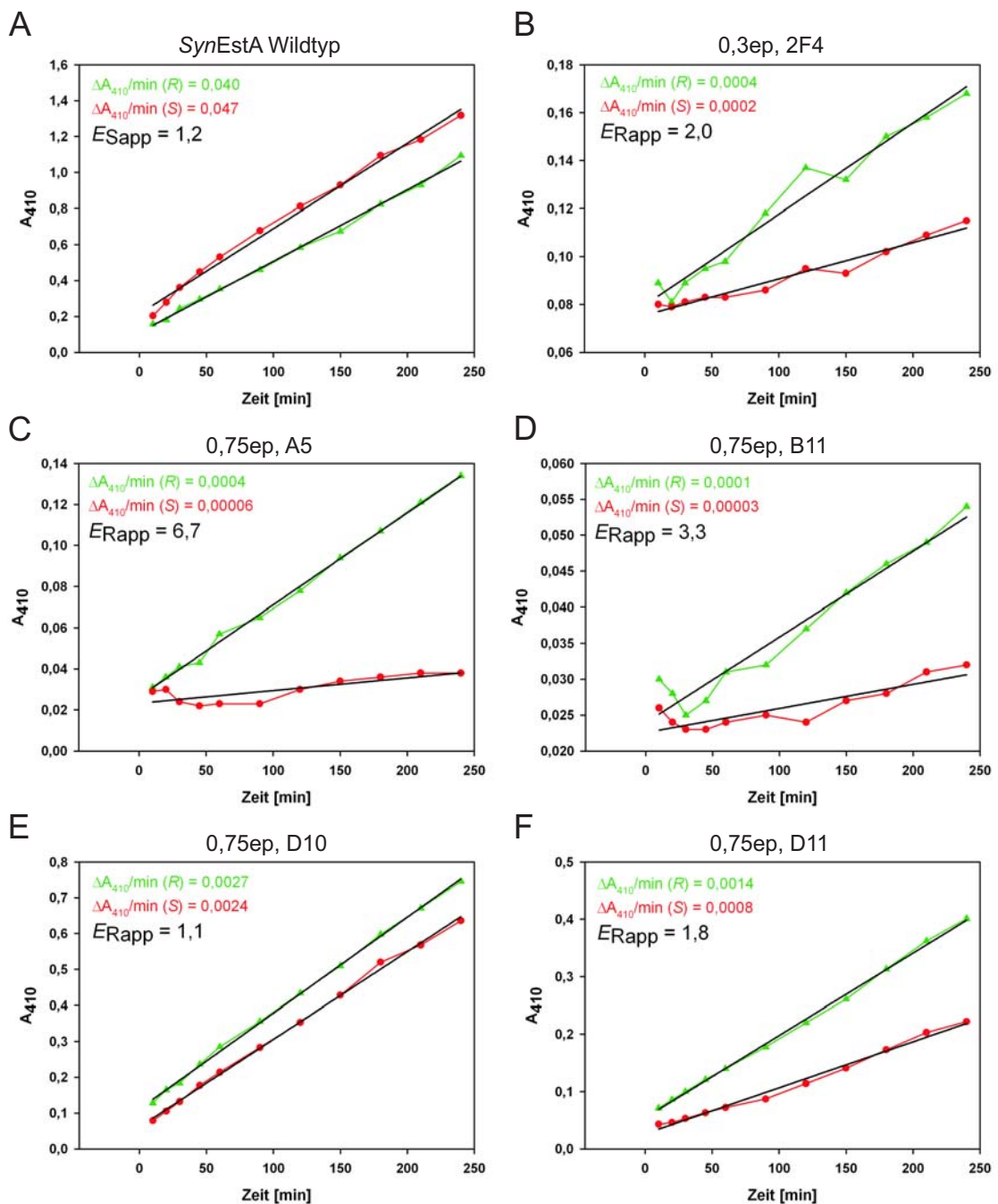


Abb. 4.30: Die Beschreibung befindet sich auf der nächsten Seite.

Abb. 4.30: (vorherige Seite) Bestimmung der Substratumsätze der beiden enantiomeren p-Nitrophenylester der 2-Methyldekansäure. Grün: (*R*)-Enantiomer, rot: (*S*)-Enantiomer. Gemessen wurden der *SynEstA* Wildtyp (A) sowie die isolierten Klone pEst101_0,3ep_2F4 (B), pEst101_0,75ep_A5 (C), pEst101_0,75ep_B11 (D), pEst101_0,75ep_D10 (E) und pEst101_0,75ep_D11 (F). Aufgetragen sind die Zeit gegen die Absorption bei 410 nm (A_{410}). Die Steigungen der Regressionsgeraden sind mit $\Delta A_{410}/\text{min}$ angegeben. E_{app} gibt die abgeleiteten apparenten *E*-Werte wieder. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer OD_{600} von 0,4.

Die Bestimmung der apparenten *E*-Werte bestätigte bei allen getesteten Varianten die bereits beobachtete Inversion der Enantioselektivität. Während für den *SynEstA* Wildtyp trotz des zur Insertion der *SfiI* Erkennungsstelle eingeführten Aminosäureaustausches (G353L) ein identischer E_{app} -Wert von 1,2 für das (*S*)-Enantiomer bestimmt wurde wie bei dem EstA Wildtyp, zeigten alle gemessenen isolierten Varianten eine Präferenz für das (*R*)-Enantiomer. Die höchste Selektivität zeigte dabei die Variante pEst101_0,75ep_A5 mit einem E_{Rapp} -Wert von 6,7, gefolgt von der Variante pEst101_0,75ep_B11 mit 3,3 und pEst101_0,3ep_2F4 mit 2. Die Varianten pEst101_0,75ep_D10 und pEst101_0,75ep_D11 zeigten eine nur sehr leicht ausgeprägte Enantiopräferenz für das (*R*)-Enantiomer mit E_{Rapp} -Werten von 1,1 und 1,8. Zum Vergleich der gemessenen Aktivitäten gegenüber den enantiomeren Estern mit der Gesamtaktivität erfolgte zusätzlich für jeden isolierten Klon und den *SynEstA* Wildtyp die Bestimmung der Hydrolyseraten gegenüber dem Standardsubstrat Oktansäure-p-Nitrophenylester. Abbildung 4.31 fasst die Ergebnisse zusammen.

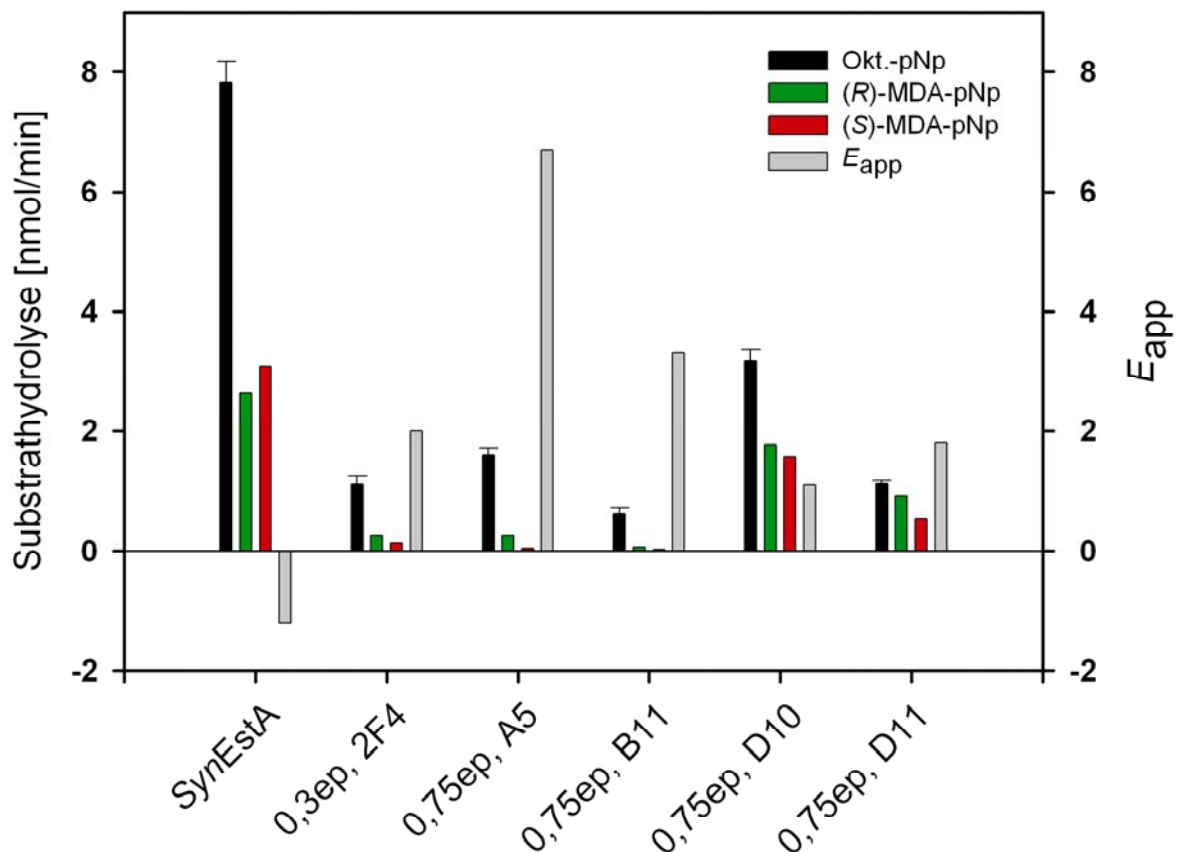


Abb. 4.31: Substratumsätze des *SynEstA* Wildtyps und der isolierten Varianten gegenüber Oktansäure-p-Nitrophenylester (schwarz), (*R*)-2-MDA-p-Nitrophenylester (grün) und (*S*)-2-MDA-p-Nitrophenylester (rot). Die Ergebnisse repräsentieren jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer OD_{600} von 0,4. (Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen von Messungen, die zweimal durchgeführt wurden). Die errechneten apparenten *E*-Werte sind in grau dargestellt. Positive E_{app} -Werte repräsentieren eine Präferenz für das (*R*)-Enantiomer, negative für das (*S*)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure.

Die katalytischen Daten der Hydrolyseraten zeigen deutlich, daß bei allen isolierten Varianten die Gesamtaktivitäten signifikant reduziert waren. So zeigte der esterolytisch aktivste Klon pEst101_0,75ep_D10 gegenüber dem Oktansäure-p-Nitrophenylester lediglich noch ca. 41 % der Aktivität des *SynEstA* Wildtyps. Dieser Klon hatte mit einem E_{Rapp} -Wert von 1,1 auch die geringste Enantioselektivität. Bei der Variante pEst101_0,75ep_B11 waren sogar nur noch ca. 8 % der Wildtypaktivität zu messen. Die Variante mit dem höchsten E_{Rapp} -Wert pEst101_0,75ep_A5 zeigte immerhin noch ca. 21 % der Wildtypaktivität. Eine direkte Korrelation zwischen Enantioselektivität und Gesamtaktivität ist deshalb bei diesen Varianten nicht zu erkennen. Bemerkenswert sind außerdem die Diskrepanzen beim Vergleich der Hydrolyseraten der verschiedenen Substrate einer Variante. Während die Variante pEst101_0,75ep_A5 das präferierte (*R*)-Enantiomer mit gerade ca. 16 % der Effektivität des Standardsubstrats hydrolysiert, spaltet die Variante pEst101_0,75ep_D11 selbiges Enantiomer mit ca. 82 % der gegenüber dem Oktansäure-p-Nitrophenylester gemessenen Aktivität.

Differenzen in der Gesamtaktivität können unterschiedliche Ursachen haben. Aufgetretene Mutationen könnten entweder die katalytischen Eigenschaften der isolierten Varianten beeinflussen oder die Effizienz der Zelloberflächenpräsentation. So könnte letzteres zu einer Reduktion der Anzahl oberflächenpräsentierter Moleküle führen, was ebenfalls eine Verminderung der zu messenden Gesamtaktivität zur Folge hätte. Zur Überprüfung der Oberflächenpräsentationseffizienzen wurden deshalb mit induzierten Zellen der isolierten Klone Immunfluoreszenzmarkierungen mit einem Kaninchen anti-EstA Antikörper durchgeführt (3.6.2). Als Kontrollen dienten erneut Zellen, die den *SynEstA* Wildtyp präsentierten und solche ohne Oberflächenpräsentation (JM109(pBBR1MCS)). Die Analysen erfolgten in gewohnter Weise durchflußzytometrisch (3.6.5). Die resultierenden *FACS*-Histogramme sind in Abbildung 4.32 dargestellt.

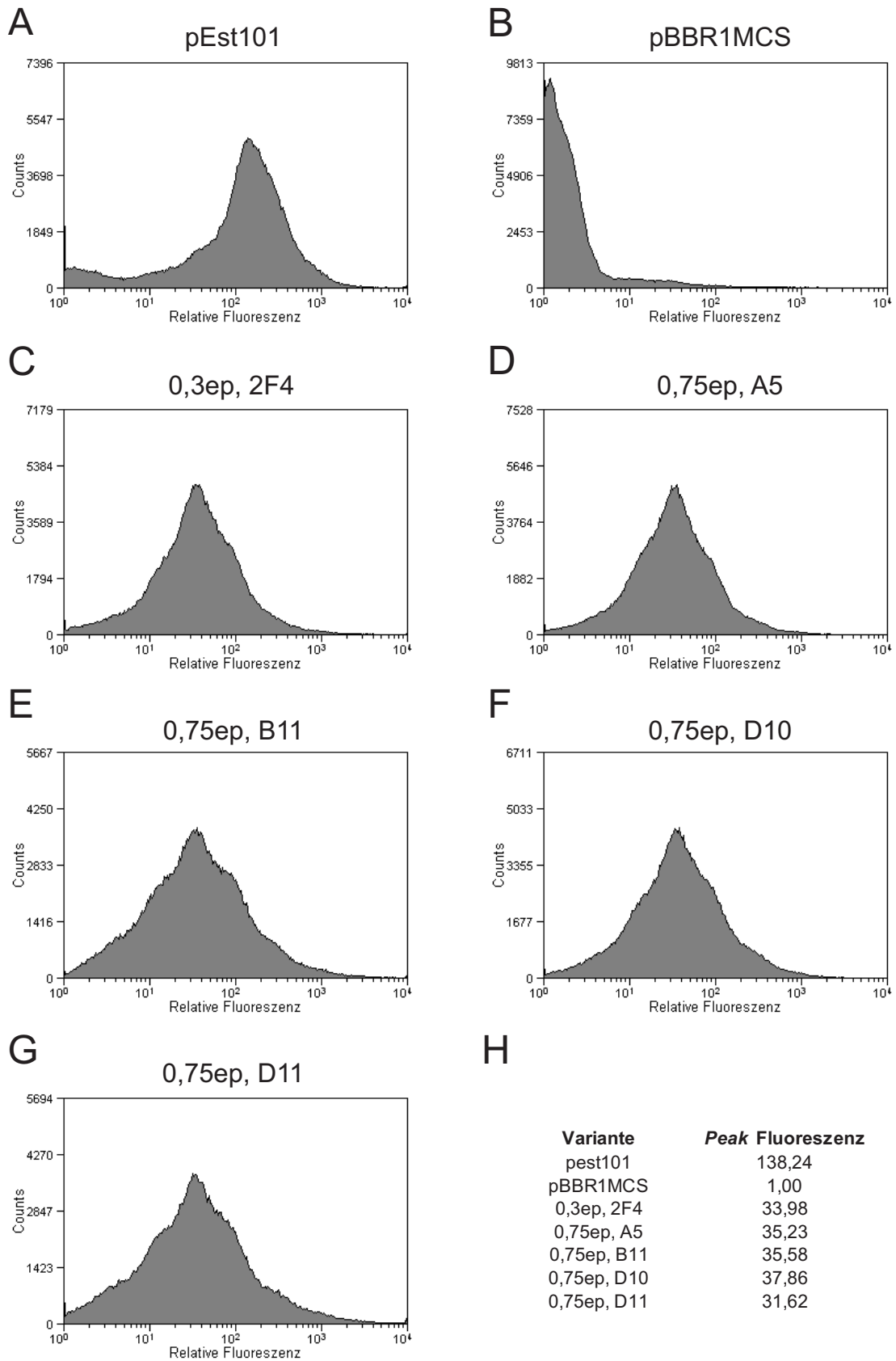


Abb. 4.32: Anti-EstA Markierungen der isolierten Klone pEst101_0,3ep_2F4 (C), pEst101_0,75ep_A5 (D), pEst101_0,75ep_B11 (E), pEst101_0,75ep_D10 (F) und pEst101_0,75ep_D11 (G). FACS-Histogramme. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz pro Zelle und die Zellzahl (Counts). Als Kontrollen dienten *SynEstA* präsentierende Zellen (pEst101, A) und Zellen mit Leervektor (pBBR1MCS, B). Die zugehörigen Peak Fluoreszenzen, die mit der Anzahl oberflächenpräsentierter Moleküle pro Zelle korrelieren, sind gegeben in (H).

Abbildung 4.32 läßt erkennen, daß alle isolierten Klone *SynEstA* auf ihrer Oberfläche präsentierten. Bemerkenswerterweise zeigten alle im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche Reduktion der *Peak* Fluoreszenz, die mit der Anzahl oberflächenpräsentierter Moleküle pro Zelle korreliert (Abb. 4.32 H). Diese Reduktionen scheinen mit Faktoren von ca. 3 - 4 bei allen Varianten relativ ähnlich zu sein. Das deutet daraufhin, daß ein Effekt einer oder mehrerer Mutationen auf die Oberflächenpräsentationseffizienz also bei allen Varianten gegeben zu sein scheint. Damit ließe sich zwar die Reduktion der Gesamtaktivität aller isolierter Varianten gegenüber dem Wildtyp erklären, jedoch nicht die Differenzen untereinander. Möglich ist auch, daß alle Varianten eine oder mehrere identische Mutationen beinhalten, die unabhängig von katalytischen Eigenschaften allein für die Reduktion der Oberflächenpräsentationseffizienz verantwortlich sind. Derartige Mutationen könnten sich durch evolutive Drücke, z. B. durch eine Erhöhung der Überlebensrate während der Markierungs- bzw. Sortierungsprozedur durchgesetzt haben. Ebenfalls möglich, wenn auch eher unwahrscheinlich, ist die Hypothese, daß sich während der Amplifikation unter Mutagenesebedingungen ein initiales Fehlerereignis in Form eines Amplifikationsprodukts in weiteren Amplifikationszyklen durchgesetzt hat und so Abkömmlinge entstanden sind, die neben identischen Mutationen noch weitere unterschiedliche beinhalten.

Zur Klärung dieser Fragen und zur eindeutigen Charakterisierung der den Eigenschaften der isolierten Varianten zu Grunde liegenden Mutationen wurden die betreffenden Plasmide präpariert (3.2.6) und Nukleotidsequenzanalysen der Gene der isolierten Varianten in Auftrag gegeben (Fa. SeqLab). Die Anzahlen und Arten der aufgetretenen Mutationen sowie die daraus resultierenden Aminosäureaustausche sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Variante	Mutationen	Aminosäureaustausche
0,3ep, 2F4	T136C, T553C, C580A, A694C	S46P, W185R, P194T, I232L
0,75ep, A5	G12A, G175A, T553C, G715A, T914C	G59S, W185R, G239S, L305P
0,75ep, B11	T44C, C378T, C488G, C563A,	L15P, A163G, P188Q
0,75ep, D10	T449C	L150P
0,75ep, D11	C2T, G364A, A440G, T573C, C633T	A1V, G122S, N147S

Tab. 4.2: Ergebnisse der Nukleotidsequenzanalysen der isolierten Varianten in Form der detektierten Mutationen und der daraus resultierenden Aminosäureaustausche.

Zur besseren Übersicht und Lokalisation der aus den verschiedenen Mutationen resultierenden Substitutionen in der Aminosäuresequenz sind die isolierten Varianten und der *SynEstA* Wildtyp in Abbildung 4.33 aneinander gelegt.

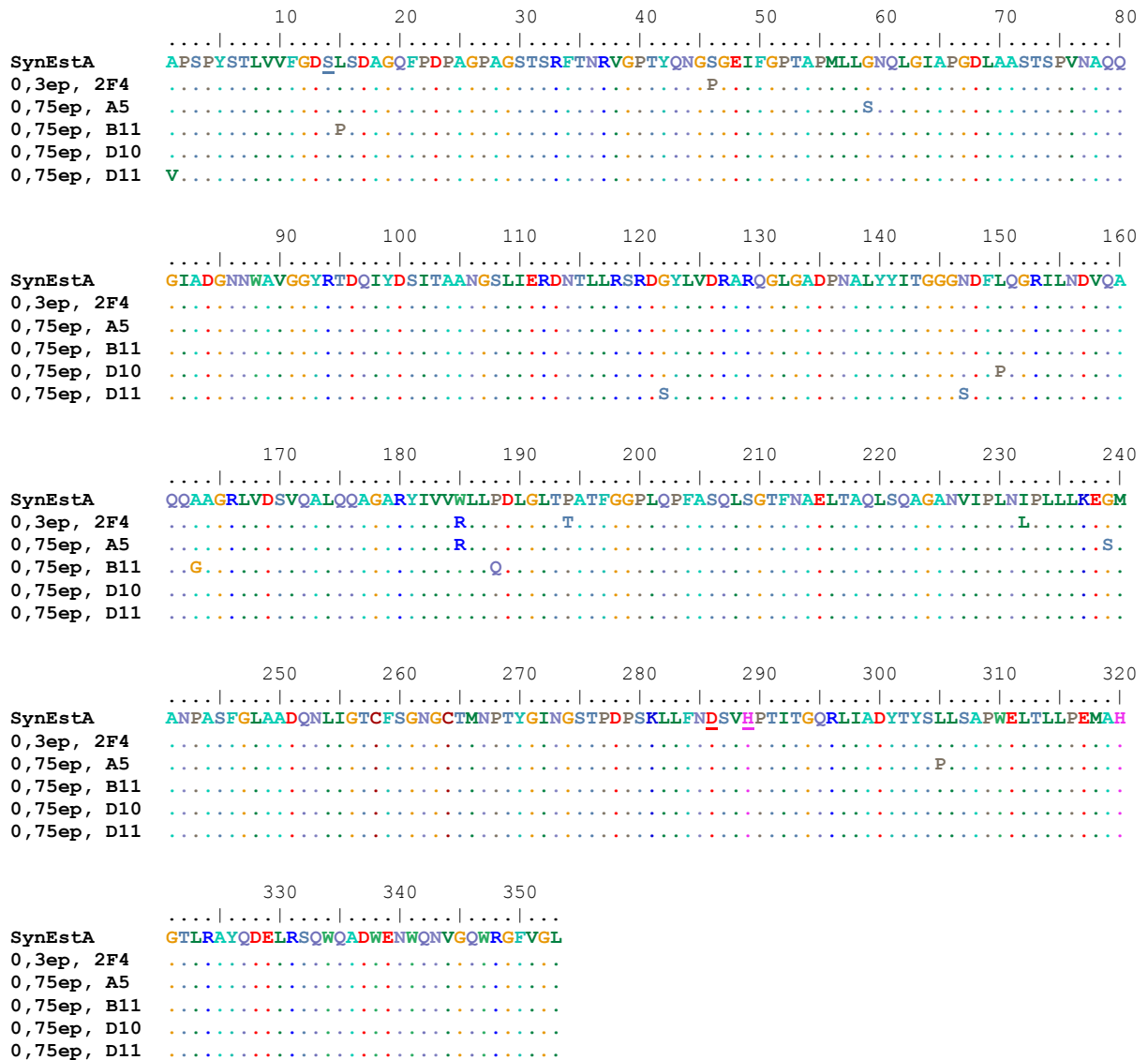


Abb. 4.33: Aminosäuresequenzen der isolierten Klone im Vergleich zum *SynEstA* Wildtyp. Punkte deuten Wildtyp Aminosäuren an. Die Aminosäuren der katalytischen Triade (S14, D286, H289) sind unterstrichen.

Bei der Analyse der unterschiedlichen Mutationen sind folgende Auffälligkeiten festzustellen: Es sind keine Mutationen aufgetreten die sämtlichen Varianten gemeinsam sind. Die in Abbildung 4.32 zu erkennenden Reduktionen der Oberflächenpräsentationseffizienzen besitzen also keinen gemeinsamen Ursprung. Abgesehen von Variante pEst101_0,75ep_B11 mit einer Substitution an Position 15 im GDSLS-Konsensusmotiv (L15P), direkt neben dem katalytisch aktivem Serinrest, liegt kein Austausch in der Sequenz unmittelbarer benachbart zu einem der Reste der katalytischen Triade. Die Varianten pEst101_0,3ep_2F4 und pEst101_0,75ep_A5 beinhalten beide auffälligerweise eine identische Substitution an Position 185, bei der ein Tryptophanrest gegen einen Argininrest ausgetauscht ist. Die Varianten pEst101_0,75ep_D10 und pEst101_0,75ep_D11, die beide eine nur leichte Enantioselektivität aufwiesen, beinhalten beide einen Austausch im Abstand von nur drei Aminosäuren an den Positionen 150 (L150P) und 147 (N147S). Bei der Variante pEst101_0,75ep_D10, die die niedrigste Enantioselektivität aufwies ($E_{Rapp} = 1,1$), ist dies sogar die einzige Substitution. Bemerkenswert ist außerdem, daß von insgesamt 15 Substitutionen in den 5 isolierten

Varianten 4 Austausch zu einem Prolinrest führten. Da eine Kristallstruktur von EstA bis zum Ende dieser Arbeit nicht verfügbar war, ist es jedoch nur schwer möglich, Hypothesen über die molekularen Mechanismen der Effekte der einzelnen Austausche auf die Substratspezifität aufzustellen (siehe Diskussion, Abschnitt 4.2.5).

Abschließend wurde überprüft, ob und in welchem Maße sich die gemessenen katalytischen Eigenschaften und invertierten Enantioselektivitäten der isolierten Varianten auf Markierungsreaktionen mit den enantiomeren Tyramidestern der 2-Methyldekansäure auswirken. Dazu wurden entsprechende Markierungen mit induzierten Zellen aller isolierter Klone und dem 1:1-Gemisch beider Substrate durchgeführt (3.6.3). Als Kontrollen dienten wieder Zellen, die den *SynEstA* Wildtyp auf der Oberfläche präsentierten und Zellen ohne Oberflächenpräsentation (JM109(pBBR1MCS)). Als Reaktionszeit wurden erneut 5 min gewählt, um unspezifische Hintergrundmarkierungen möglichst gering zu halten. Außerdem entsprach dies auch der Markierungszeit, die zur Isolierung der Varianten eingesetzt wurde. Die Auswertungen erfolgten durchflußzytometrisch (3.6.5). Die zur Analyse verwendeten Regionen wurden anhand der Negativkontrolle so in das Fluoreszenzmissionshistogramm gelegt, daß beide Bereiche weniger als 0,1 % der Ereignisse beinhalteten. Die Region R1 repräsentierte dabei wieder eine Präferenz für das (*R*)-Enantiomer, R2 entsprechend für das (*S*)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure. Abbildung. 4.34 fasst die Ergebnisse zusammen.

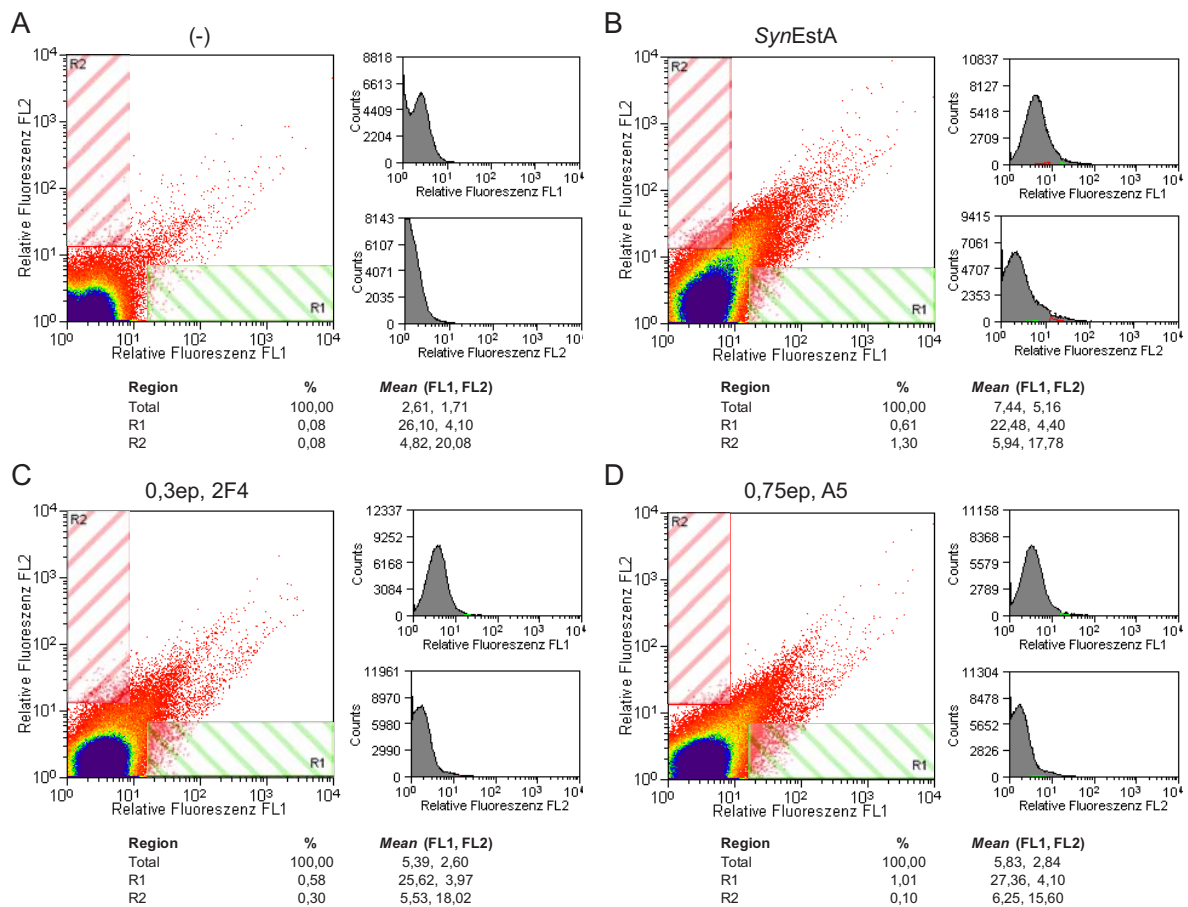


Abb. 4.34: Fortsetzung und Beschreibung auf der nächsten Seite.

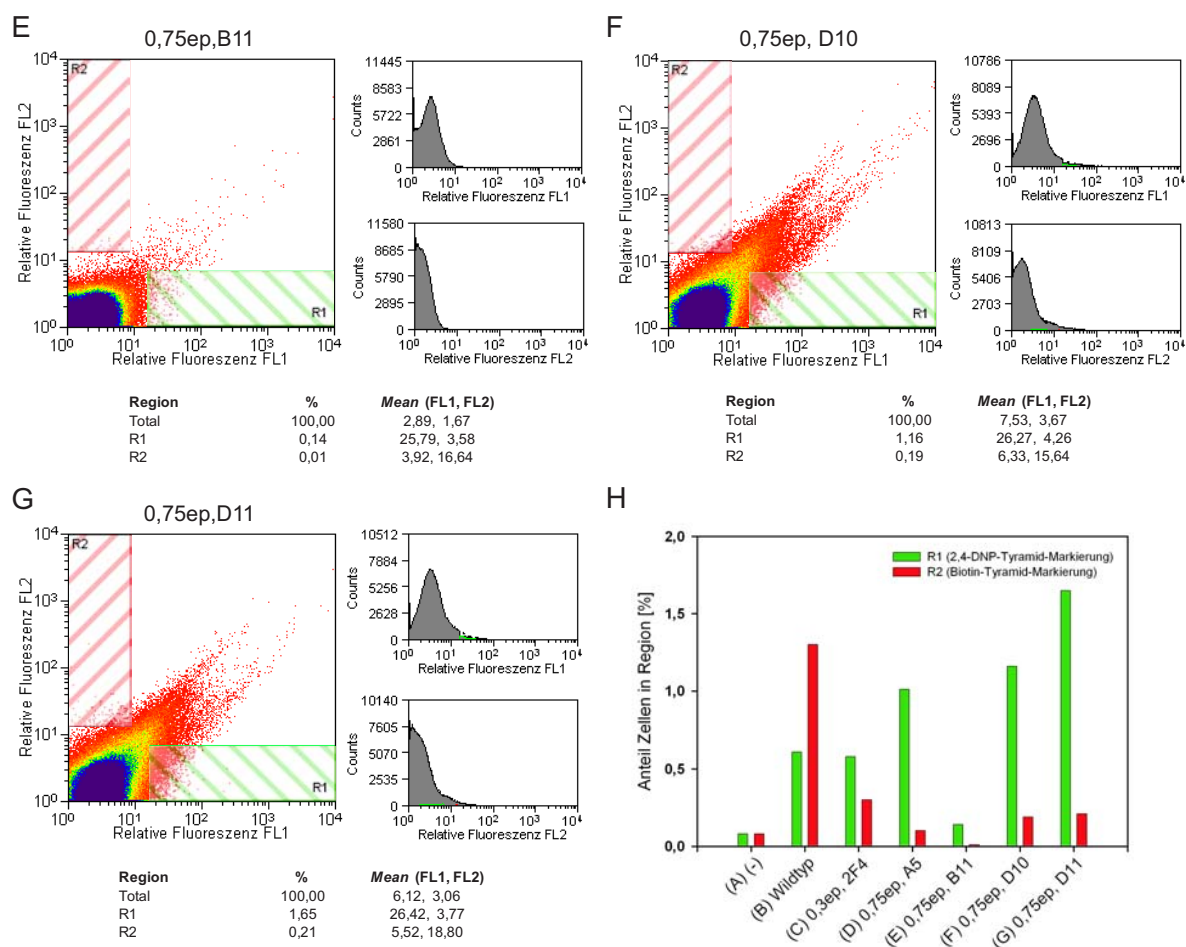


Abb. 4.34: Zwei-Farben Markierung der isolierten Klone mit einem 1:1-Gemisch aus (*R*)-2-MDA-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester und (*S*)-2-MDA-Biotin-Tyramidester. FACS-Histogramme. Als Kontrollen dienten Zellen ohne Oberflächenpräsentation (A) und Zellen die den *SynEstA* Wildtyp präsentierten (B). Markiert wurden die Varianten pEst101_0,3ep_2F4 (C), pEst101_0,75ep_A5 (D), pEst101_0,75ep_B11 (E), pEst101_0,75ep_D10 (F) und pEst101_0,75ep_D11 (G). Die zur Analyse eingefügten Regionen repräsentieren die für die jeweilige Markierung spezifischen Fluoreszenzmissionsbereiche. R1 (grün): 2,4-Dinitrophenyl-Tyramidmarkierung, R2 (rot): Biotin-Tyramidmarkierung. Mean bezeichnet die mittleren relativen Fluoreszenzen pro Zelle im entsprechenden Bereich. (H) Zusammenfassung der Ergebnisse in Form der prozentualen Anteile der Gesamt ereignisse in den entsprechenden Regionen.

Aus Abbildung 4.34 ist ersichtlich, daß sich die veränderten katalytischen Eigenschaften und Enantioselektivitäten der isolierten Varianten in der Tat auf die Markierungsreaktionen mit den enantiomeren Tyramidestern der 2-Methyldekansäure auswirken. So zeigte der *SynEstA* Wildtyp als einzige Variante mit einer Präferenz für das (*S*)-Enantiomer auch die einzige Population markierter Zellen, bei der mehr Ereignisse in der diesem Enantiomer entsprechenden Region R2 auftraten als in Region R1 (Abb. 4.34 B). Bei allen isolierten Varianten ist dies umgekehrt. Auch die mit den enantiomere p-Nitrophenylesterderivaten bestimmten Hydrolyseraten (Abb. 4.31) sind tendenziell mit den Ergebnissen der Markierungsreaktionen vergleichbar. So zeigte die Variante mit den höchsten Hydrolyseraten pEst101_0,75ep_D10, abgesehen von dem *SynEstA* Wildtyp, auch die am stärksten ausgeprägte Gesamtmarkierung (Abb. 4.34 F), gefolgt von pEst101_0,75ep_D11 (Abb. 4.34 G), der auch bei den Hydrolyseraten der enantiomeren p-Nitrophenylester die zweitstärkste Aktivität zeigte. Die Variante mit den am wenigsten markierten Zellen war

pEst101_0,75ep_B11 (Abb. 4.34 E). Auch das stimmt mit den zuvor bestimmten Hydrolyse-raten überein. Eine direkte Korrelation aus den Beträgen der bestimmten apparenten E -Werte und den Ereignisverteilungen der gemessenen Markierungen läßt sich jedoch nicht erkennen. So sollte die Differenz zwischen den Beträgen der Ereignisse in den Regionen R1 und R2 bei der selektivsten Variante (pEst101_07ep_A5, $E_{\text{Rapp}} = 6,7$, Abb. 4.34 D) am höchsten und dementsprechend bei der unselektivsten Variante (pEst101_07ep_D11, $E_{\text{Rapp}} = 1,1$, Abb. 4.34 G) am geringsten sein. Tatsächlich sind diese Differenzen bei beiden Varianten fast identisch. Dies bedeutet, daß sich zwar grundsätzliche Präferenzen für ein bestimmtes enantiomeres Substrat abbilden lassen, geringe Unterschiede innerhalb einer bestehenden Selektivität jedoch offensichtlich nicht mehr detektierbar sind. Dies war aber anhand der Ergebnisse der Markierungsexperimente mit unterschiedlichen Substratverhältnissen (Abb. 4.13) auch nicht zu erwarten.

4.2.4 Erzeugung und Charakterisierung von *SynEstA* Varianten mit veränderter Enantioselektivität durch ortsspezifische Zufallsmutagenese

Im vorangegangenen Kapitel wurde die Isolierung und Charakterisierung von *SynEstA* Varianten mit veränderter Enantioselektivität beschrieben. Nukleotidsequenzanalysen der isolierten Varianten offenbarten einen Aminosäureaustausch an Position 185, der bei zwei Varianten ($E_{\text{Rapp}} = 2,0$ & $6,7$) aus verschiedenen Anreicherungsexperimenten und unterschiedlichen Bibliotheken auftrat. Dieser Austausch stellt bei beiden Varianten (pEst101_0,3ep_2F4 und pEst101_0,75ep_A5) die Substitution des an dieser Stelle vorhandenen Tryptophanrests gegen einen Argininrest dar. Da beide Varianten jedoch noch jeweils 3 weitere Aminosäureaustausche beinhalten und sich auch im Betrag der bestimmten apparenten E -Werte unterscheiden ($E_{\text{Rapp}} = 2,0$ & $6,7$), war die Rolle dieser Substitution an Position 185 für die Veränderung der Enantioselektivität unklar. Offene Fragen waren folgende: Spielt der Austausch an dieser Position überhaupt eine Rolle für die beobachtete Inversion der Enantioselektivität? Theoretisch wäre es möglich, wenn auch äußerst unwahrscheinlich, daß beide Varianten zufällig diesen Austausch tragen und die veränderte Enantioselektivität den jeweils anderen Substitutionen zuzuschreiben ist. Sollte dies nicht der Fall sein und die Position 185 tatsächlich einen Einfluß auf die vorliegende Enantioselektivität haben, stellt sich die Frage, ob der in beiden Varianten aufgetretene Argininrest für eine Inversion der Enantioselektivität essentiell ist oder ob auch andere Substitutionen an dieser Position die Selektivität beeinflussen und vielleicht sogar noch weiter erhöhen können.

Zur Beantwortung dieser Fragen und genaueren Untersuchung des Einflusses der Aminosäureposition 185 auf die Enantioselektivität von *SynEstA* wurden Varianten erzeugt, die an dieser Position randomisiert sind, d. h. Substitutionen durch alle möglichen Aminosäurereste beinhalten. Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Erzeugung einer solchen Bibliothek. Die Charakterisierung von Einzelklonen dieser Bibliothek ist Gegenstand von Abschnitt 4.2.4.2.

4.2.4.1 Erzeugung und Untersuchung einer *SynEstA* Bibliothek mit Randomisierung an Position 185

Die Erzeugung einer *SynEstA* Bibliothek mit Randomisierung an Aminosäureposition 185 erfolgte mittels *SOE*-PCR. Dazu wurden mit dem Plasmid 053870pPCR-Script (2.2.8) als Matrize zwei PCR Ansätze durchgeführt (3.3.3). PCR 1 erfolgte mit den Oligonukleotiden *SynEstA-lo* und *SynEstA-Mut-SOE1-up* (2.4). Letzteres wurde mit zufälligen Nucleotidtriphosphaten an den drei Positionen synthetisiert, die für Tryptophan 185 kodierend sind. Dabei wurde die dritte Position so randomisiert, daß ausschließlich G und C an dieser Stelle eingebaut werden konnten. Auf diese Art sollte gewährleistet werden, daß unter Erhalt der Möglichkeit alle 20 proteinogenen Aminosäuren zu adressieren, das Auftreten von Stop-Kodonen reduziert ist. PCR 2 erfolgte mit den Oligonukleotiden *SynEstA-up* und *SynEstA-Mut-SOE2-lo* (2.4). Das daraus resultierende DNA-Fragment besaß am 3'-Ende eine Überlappung von 20 bp mit dem Fragment der ersten PCR. Beide Amplifikationsprodukte wurden mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.3.2) und Ethanolpräzipitation (3.2.2.1) gereinigt und anschließend durch die eigentlichen *SOE*-PCR (3.3.3) fusioniert. Das Volllängen *SOE*-PCR Produkt wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt (3.2.5). Durch die Verwendung der Oligonukleotide *SynEstA-up* und *SynEstA-lo* wurden ebenfalls die *SfiI* Erkennungsstellen, die auf dem Plasmid 053870pPCR-Script die kodierende Sequenz der synthetischen aminoterminalen Domäne von *SynEstA* flankieren, amplifiziert. Die Klonierung in das Akzeptorplasmid pEst101* erfolgte somit wieder über das Restriktionsenzym *SfiI*. Dazu wurde das entstandene *SOE*-PCR Produkt mit *SfiI* gespalten (3.3.1) und erneut durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt. Die Ligation (3.3.2) erfolgte in den *SfiI* verdauten und Sucrosedichtegradienten gereinigten Vektor pEst101* (Abschnitt 4.2.2.3). Die resultierende Bibliothek wurde pEst101_185mut genannt. Eine schematische Darstellung der Klonierung ist in Abbildung 4.35 gezeigt.

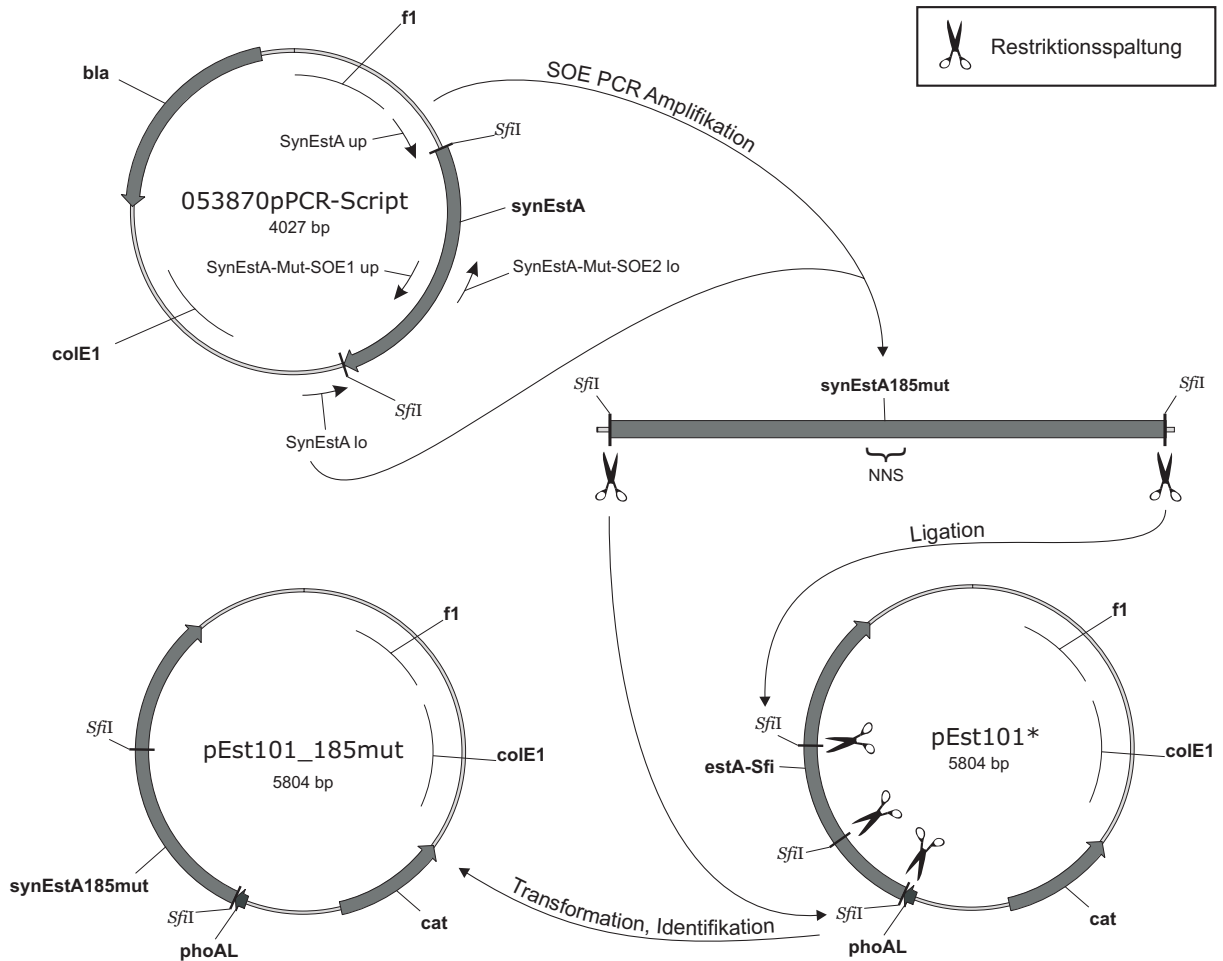


Abb. 4.35: Klonierungsschema der *SynEstA* Bibliothek „pEst101_185mut“.

Die Transformation (3.1.4) der erzeugten Bibliothek erfolgte mit dem *E. coli* Stamm JM109(pRep4) (2.2.7). Durch Verdünnungsplattierungen wurde eine Anzahl von 5×10^7 Transformanten bestimmt. Zur Überprüfung der Klonierung wurden 10 Transformanten angezogen, Plasmid wurde präpariert (3.2.6) und einer Restriktionsanalyse mit *Sfi*I unterzogen (3.3.1). Die gelelektrophoretische Auswertung der Spaltungen zeigte, daß alle 10 Transformanten das klonierte Fragment beinhalten. Es folgte eine Untersuchung des Anteils an *SynEstA* präsentierenden Zellen in der erzeugten Bibliothek durch eine Markierung induzierter Zellen (3.6.1) mit einem anti-EstA Antikörperserum aus dem Kaninchen (3.6.2) und anschließender durchflußzytometrischer Analyse (3.6.5). Abbildung 4.36 zeigt das Ergebnis.

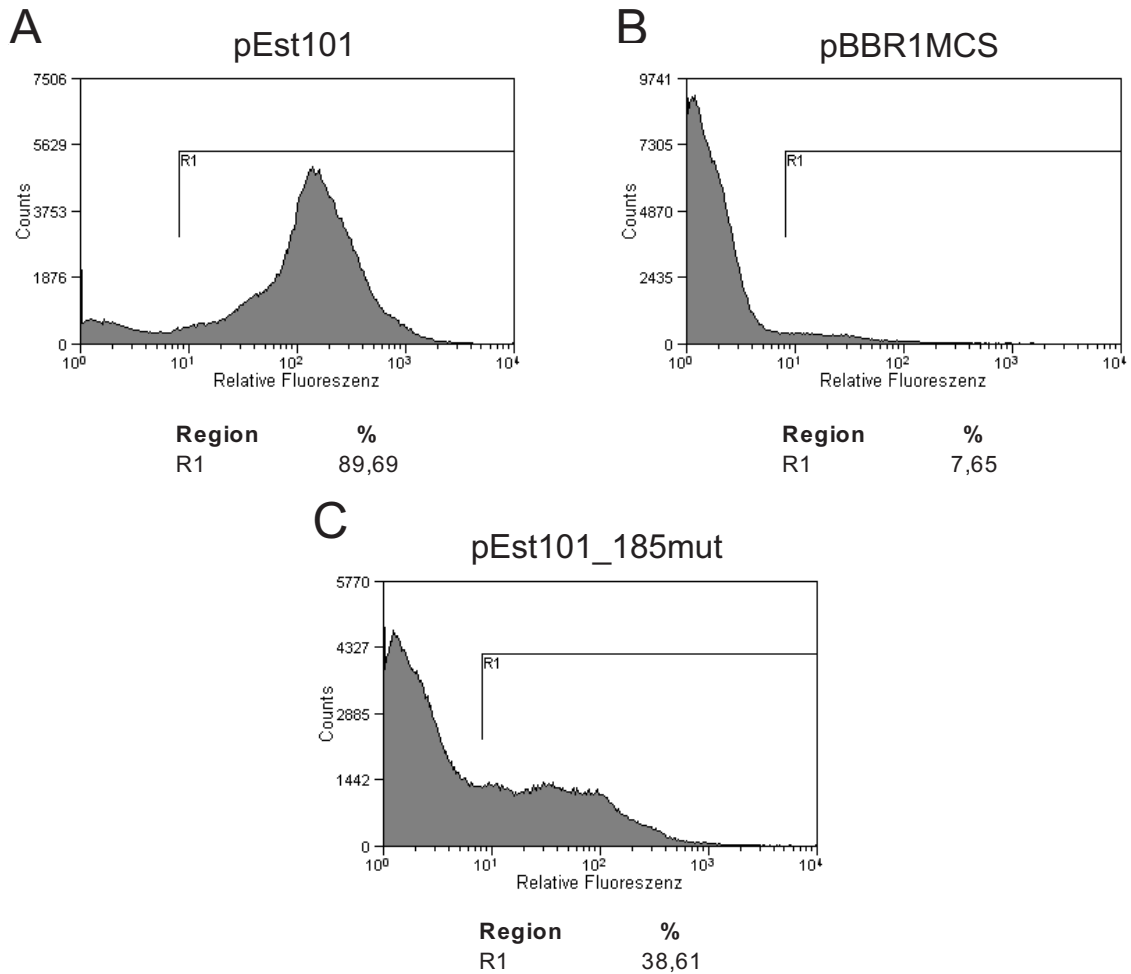


Abb. 4.36: Durchflußzytometrische Analyse der erzeugten *SynEstA* Bibliothek pest101_185mut (C). FACS-Histogramme. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz pro Zelle und die Zellzahl (Counts). Nachgewiesen wurde die Oberflächenpräsentation von *SynEstA* mittels anti-EstA Antikörper. Als Kontrollen dienten *SynEstA* präsentierende Zellen (pEst101, A) und Zellen mit Leervektor (pBBR1MCS, B).

Wie in Abbildung 4.36 zu erkennen, deutet die anti-EstA Markierung daraufhin, daß sich in der erzeugten Bibliothek ca. 39 % Zellen befinden, die *SynEstA* auf ihrer Oberfläche präsentieren. Da aufgrund der eingeschränkten Randomisierung theoretisch nur sehr wenige Stop-Kodone aufgetreten sein sollten, deutet dieser verhältnismäßig geringe prozentuale Anteil daraufhin, daß gewisse Aminosäuresubstitutionen an Position 185 zum Ausbleiben einer Zelloberflächenpräsentation führen. Auch das Auftreten zusätzlicher Mutationen könnte für den geringen prozentualen Anteil verantwortlich sein.

Zur zusätzlichen esterolytischen Charakterisierung der erzeugten Bibliothek wurden induzierte Zellen einer Bestimmung der Hydrolyserate mit Oktansäure-p-Nitrophenylester als Substrat unterzogen (3.5.2.1). Das Ergebnis ist in Abbildung 4.37 der Hydrolyserate des *SynEstA* Wildtyps gegenübergestellt.

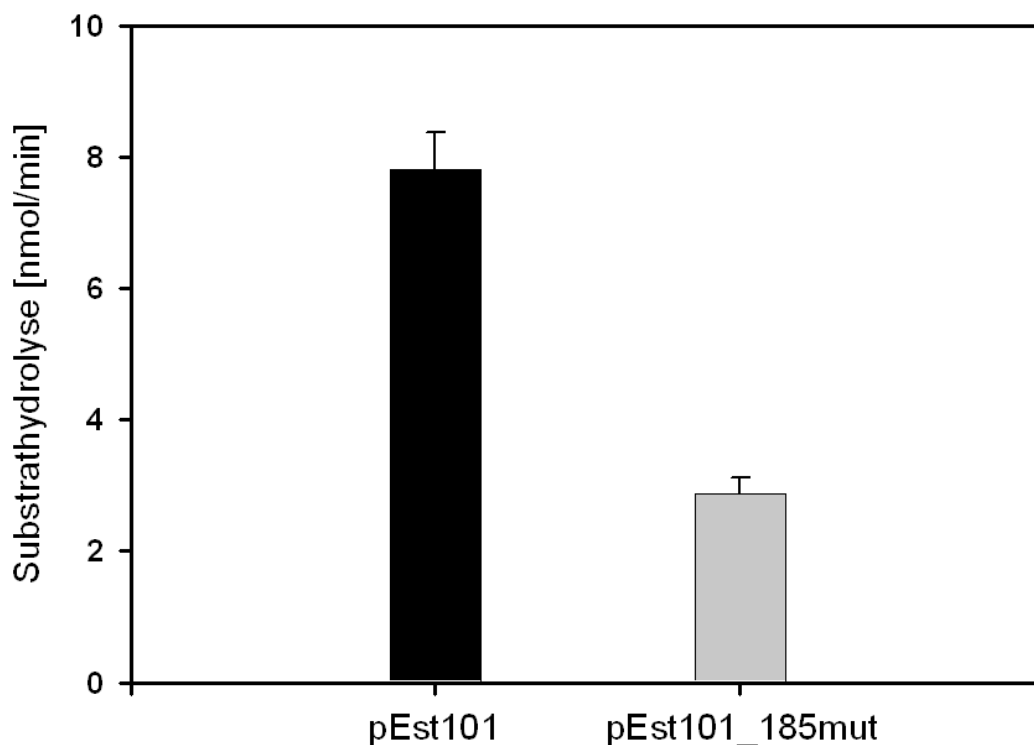


Abb. 4.37: Substratumsatz der erzeugten *SynEstA* Bibliothek „pEst101_185mut“ im Vergleich zum *SynEstA* Wildtyp (pEst101). Als Substrat diente Oktansäure-p-Nitrophenylester. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer OD_{600} von 0,4 (Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen von Messungen, die zweimal durchgeführt wurden).

Durch die esterolytische Bestimmung stellte sich heraus, daß die erzeugte Bibliothek noch ca. 37 % der Aktivität des *SynEstA* Wildtyps aufwies. Dies korrelierte zwar verhältnismäßig genau mit der Bestimmung des Anteils von Zellen mit oberflächenpräsentierten *SynEstA* Molekülen (Abb. 4.36, ca. 38 %), läßt sich jedoch nur übertragen, wenn die Aktivität jeder oberflächenpräsentierter Variante gegenüber Oktansäure-p-Nitrophenylester gleich der des Wildtyps ist. Letzteres ist allerdings eher unwahrscheinlich.

4.2.4.2 Charakterisierung von Einzelklonen

Zur Untersuchung der Rolle der Position 185 bezüglich einer Veränderung der Enantioselektivität von *SynEstA* wurden 60 Einzelklone separat angezogen und induziert (3.6.1). Es folgten zur groben Abschätzung der Enantioselektivitäten Endpunktbestimmungen der Hydrolyseraten mit p-Nitrophenylesterderivaten der beiden Enantiomere der 2-Methyldekansäure (3.5.2.4). Dabei stellte sich heraus, daß 7 Klone eine Präferenz für das (*R*)-Enantiomer aufwiesen. 24 Klone waren esterolytisch inaktiv und 29 zeigten die Enantioselektivität des Wildtyps. Die 7 Klone mit Präferenz für das (*R*)-Enantiomer (pEst101_185mut_7, 12, 23, 38, 43, 44 und 55) wurden dann einer genaueren Bestimmung der Hydrolyseraten und der apparenten *E*-Werte unterzogen (3.5.2.4). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.38 dargestellt.

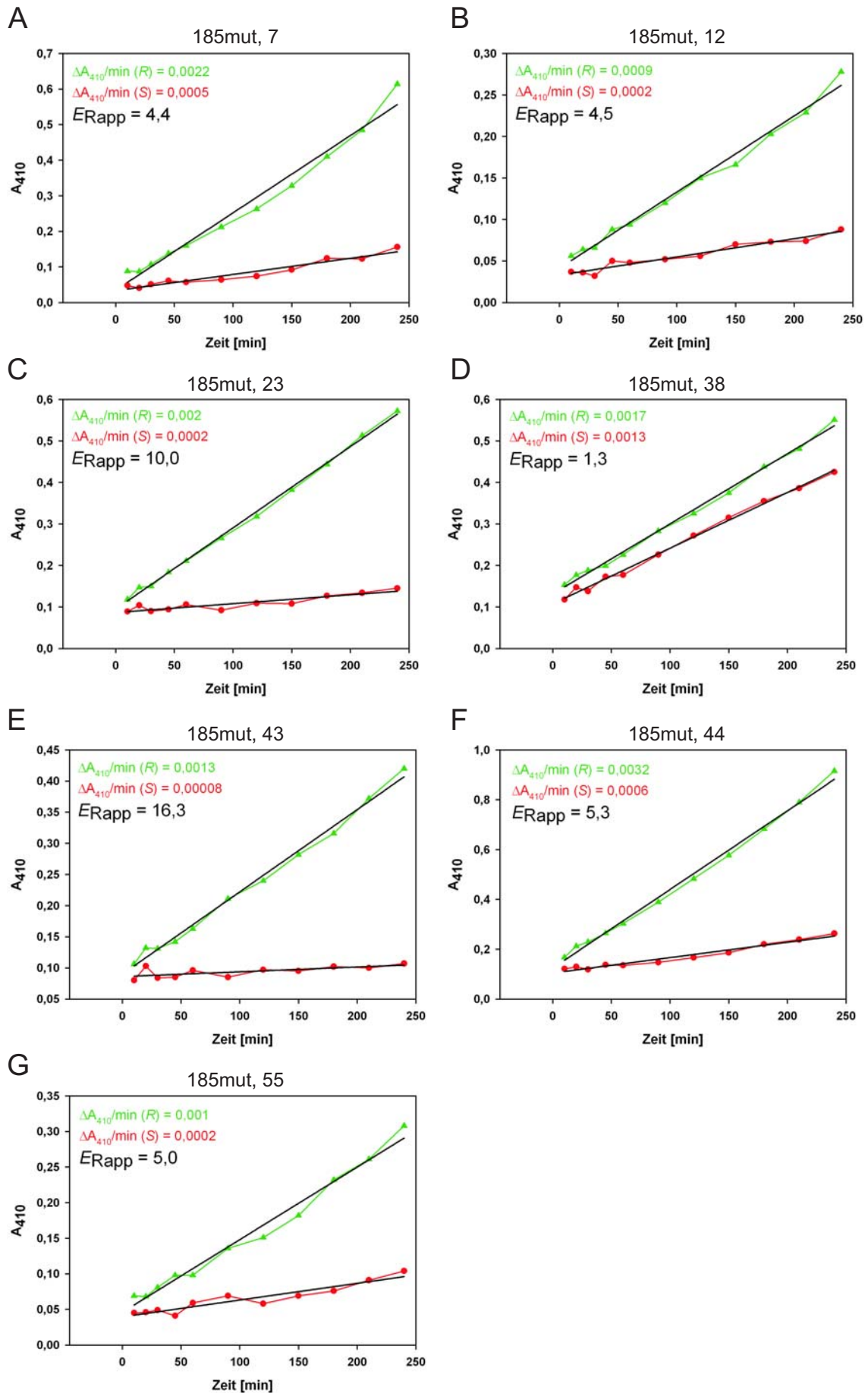


Abb. 4.38: Die Beschreibung befindet sich auf der nächsten Seite.

Abb. 4.38: (vorherige Seite) Bestimmung der Substratumsätze der beiden enantiomeren p-Nitrophenylester der 2-Methyldekansäure. Grün: (*R*)-Enantiomer, rot: (*S*)-Enantiomer. Gemessen wurden die Varianten pEst101_185mut_7 (**A**), pEst101_185mut_12 (**B**), pEst101_185mut_23 (**C**), pEst101_185mut_38 (**D**) pEst101_185mut_43 (**E**), pEst101_185mut_44 (**F**) und pEst101_185mut_55 (**G**). Aufgetragen sind die Zeit gegen die Absorption bei 410 nm (A_{410}). Die Steigungen der Regressionsgeraden sind mit $\Delta A_{410}/\text{min}$ angegeben. E_{app} gibt die abgeleiteten apparenten E -Werte wieder. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer OD_{600} von 0,4.

Die Ergebnisse der Bestimmungen der E_{app} -Werte bestätigten bei allen getesteten Klonen die Präferenz für das (*R*)-Enantiomer. Die Beträge schwankten jedoch deutlich von $E_{\text{Rapp}} = 1,3$ bei der Variante pEst101_185mut_38 (Abb. 4.38 D) bis hin zu $E_{\text{Rapp}} = 16,3$ bei Variante pEst101_185mut_43 (Abb. 4.38 E). Zum Vergleich der Aktivitäten erfolgten zusätzlich mit induzierten Zellen jeder Variante Bestimmungen der Gesamtaktivität mit Oktansäure-p-Nitrophenylester als Substrat (3.5.2.1). Abbildung 4.39 faßt die Ergebnisse zusammen.

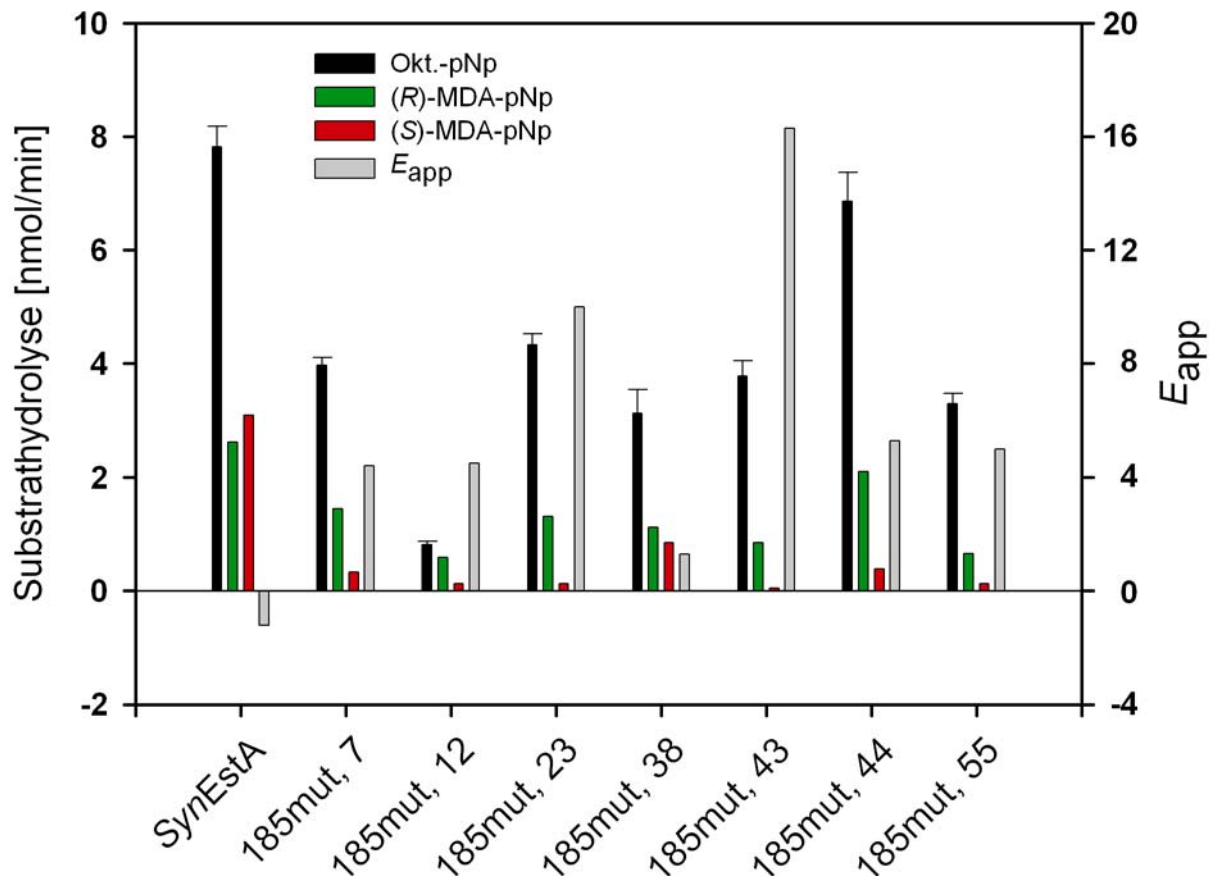


Abb. 4.39: Substratumsätze des *SynEstA* Wildtyps und der ausgewählten Varianten der pEst101_185mut Bibliothek gegenüber Oktansäure-p-Nitrophenylester (schwarz), (*R*)-2-MDA-p-Nitrophenylester (grün) und (*S*)-2-MDA-p-Nitrophenylester (rot). Die Ergebnisse repräsentieren jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer OD_{600} von 0,4. (Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen von Messungen, die zweimal durchgeführt wurden). Die errechneten apparenten E -Werte sind in grau dargestellt. Positive E_{app} -Werte repräsentieren eine Präferenz für das (*R*)-Enantiomer, negative für das (*S*)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure.

Abbildung 4.39 zeigt, daß sämtliche Varianten mit invertierter Enantioselektivität erneut eine Reduktion der Gesamtaktivität im Vergleich zum *SynEstA* Wildtyp aufwiesen. Dieser Befund wurde bereits bei den isolierten Varianten der Anreicherungsexperimente beobachtet (Abb. 4.31). Auch bei den nun vermessenen Varianten ist wieder keine eindeutige Korrelation zwischen Enantioselektivität und Gesamtaktivität zu erkennen, da der selektivste Klon (pEst101_185mut_43) wieder nicht der am wenigsten aktive war (und umgekehrt).

Zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Reduktion der Gesamtaktivität und Oberflächenpräsentationseffizienz wurden induzierte Zellen aller Varianten einer Immunfluoreszenzmarkierung mit dem anti-EstA Antikörperserum unterzogen (3.6.2) und durchflußzytometrisch analysiert (3.6.5). Die Fluoreszenzemissions-histogramme dieser Messungen sind in Abbildung 4.40 wiedergegeben.

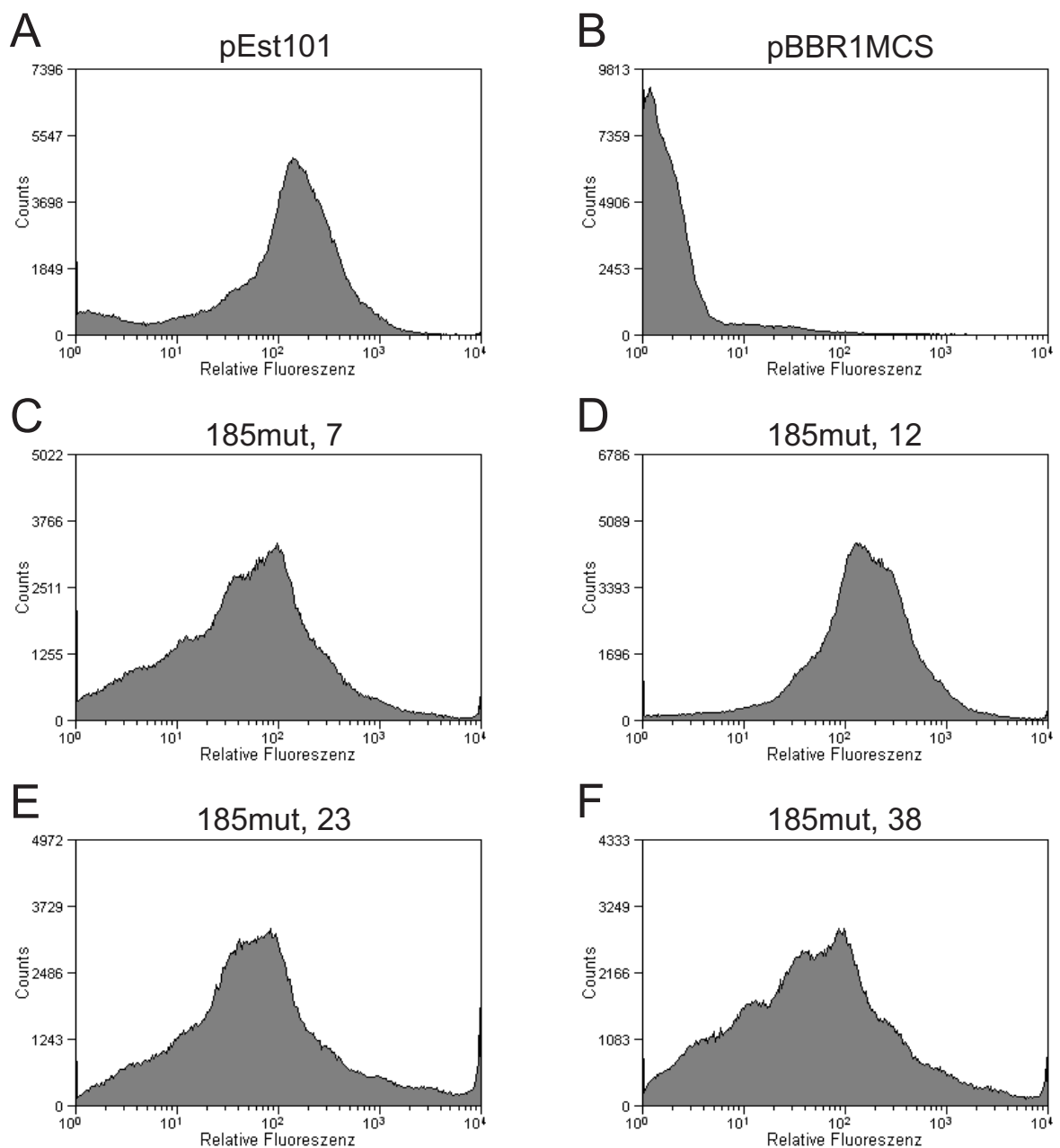


Abb. 4.40: Fortsetzung und Beschreibung auf der nächsten Seite.

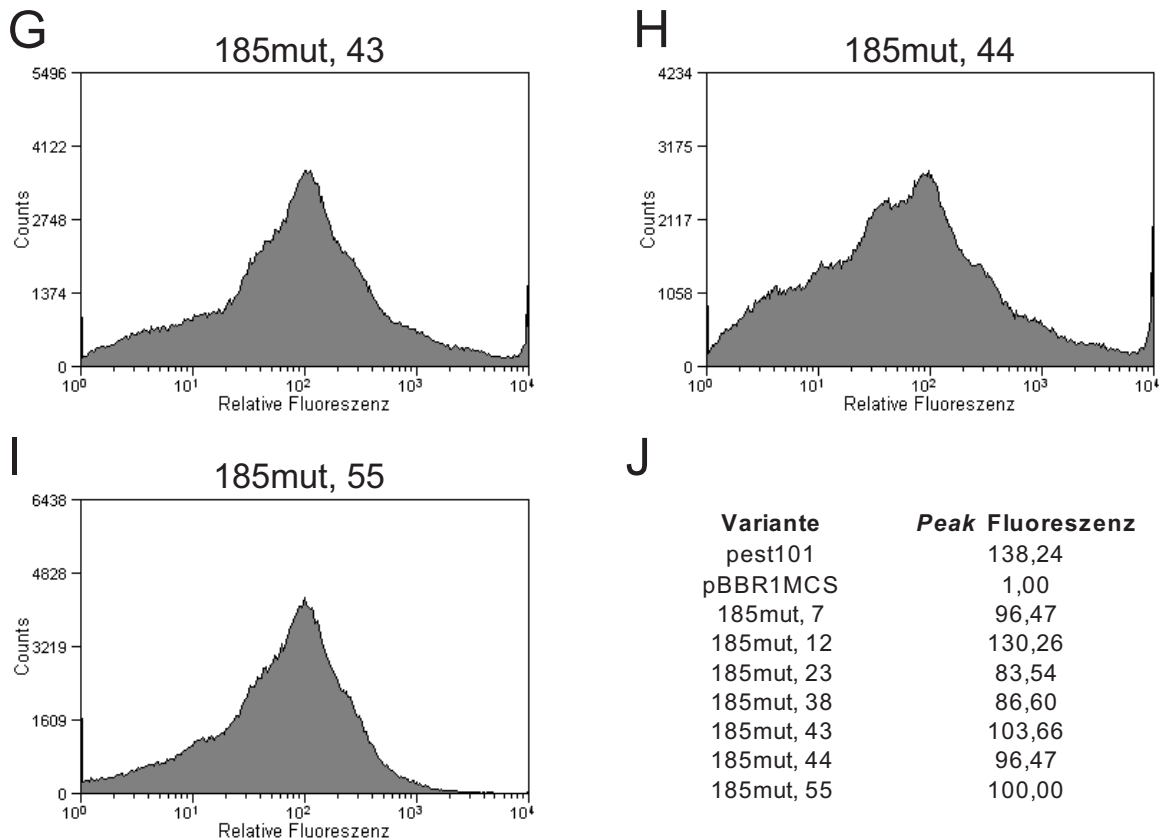


Abb. 4.40: Anti-EstA Markierungen der Varianten pEst101_185mut_7 (C), pEst101_185mut_12 (D), pEst101_185mut_23 (E), pEst101_185mut_38 (F) pEst101_185mut_43 (G), pEst101_185mut_44 (H) und pEst101_185mut_55 (I). FACS-Histogramme. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz pro Zelle und die Zellzahl (Counts). Als Kontrollen dienten *SynEstA* präsentierende Zelle (pEst101, A) und Zellen mit Leervektor (pBBR1MCS, B). Die zugehörigen Peak Fluoreszenzen, die mit der Anzahl oberflächenpräsentierter Moleküle pro Zelle korrelieren, sind gegeben in (J).

Wie schon bei den isolierten Klonen der Anreicherungsexperimente (Abb. 4.32) konnte bei den nun untersuchten Varianten in allen Fällen eine Reduktion der Oberflächenpräsentationseffizienz im Vergleich zum *SynEstA* Wildtyp beobachtet werden, wenn auch weniger stark ausgeprägt (Abb. 4.40 J). Ein Zusammenhang mit der Reduktion der katalytischen Gesamtaktivität war jedoch erneut nicht festzustellen. So zeigte sogar der katalytisch am wenigsten aktive Klon (pEst101_185mut_12), abgesehen vom Wildtyp, die höchste Nettoakkumulation von *SynEstA* Molekülen auf der Zelloberfläche.

Zum Vergleich der gemessenen phänotypischen Eigenschaften mit den zugrundeliegenden genotypischen Unterschieden erfolgte die Präparation der betreffenden Plasmide (3.2.6) und die Bestimmung der kodierenden Sequenzen der Varianten mittels Nukleotidsequenzanalyse (Fa. SeqLab). Die aufgetretenen Mutationen sowie die für Position 185 kodierende Triplettszusammensetzung und die daraus resultierenden Aminosäureaustausche sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Variante	Mutationen	185	Aminosäureaustausche
185mut, 7	G550A, T553C , G555C	CGG	V184I, W185R
185mut, 12	G211A, T553A , T654A, C698T, A711G	AGG	A71T, W185R , P233L
185mut, 23	G12A, A506C, T553A , G708A, T743C	AGG	D169A, W185R , L249P
185mut, 38	A427G, T446C, T553A , G554C , G555C , T750C	ACC	T143A, F149S, W185T
185mut, 43	T553A , G671A, G787A	AGG	W185R , G224D, G263S
185mut, 44	T421C, T553A	AGG	Y141H, W185R
185mut, 55	T553A , C618G, A713G, C749G, T850C	AGG	W185R , E238G, A250G, F284L

Tab. 4.3: Ergebnisse der Nukleotidsequenzanalysen der pEst101_185mut Varianten mit Präferenz für das (*R*)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure in Form der detektierten Mutationen, der Tripletzzusammensetzung an Position 185 (185) und der daraus resultierenden Aminosäureaustausche. Die für Position 185 relevanten Austausche sind hervorgehoben. Das Basentriplett des Wildtyps an Position 185 ist TGG.

Die Nukleotidsequenzanalysen offenbarten, daß mit einer Ausnahme alle analysierten Varianten mit Präferenz für das (*R*)-Enantiomer die Argininsubstitution an Position 185 beinhalteten. Die Ausnahme, Variante pEst101_185mut_38, besaß an dieser Position einen Austausch gegen einen Threoninrest. Leider zeigten alle Varianten neben der randomisierten Position noch weitere Mutationen und Aminosäureaustausche. Dies erschwert die Zuordnung der gemessenen katalytischen Eigenschaften zu einer bestimmten Aminosäureposition. Da jedoch 6 von 7 Klonen die Argininsubstitution an Position 185 beinhalteten, ist trotz der zusätzlichen Austausche davon auszugehen, daß dieser Position eine Schlüsselrolle bei der Enantioselektivität von *SynEstA* zukommt (siehe Diskussion, Abschnitt 4.2.5).

Zur besseren Übersicht und Lokalisation der aus den verschiedenen Mutationen resultierenden Substitutionen in der Aminosäuresequenz sind die verschiedenen Varianten und der *SynEstA* Wildtyp in Abbildung 4.41 aneinander gelegt.

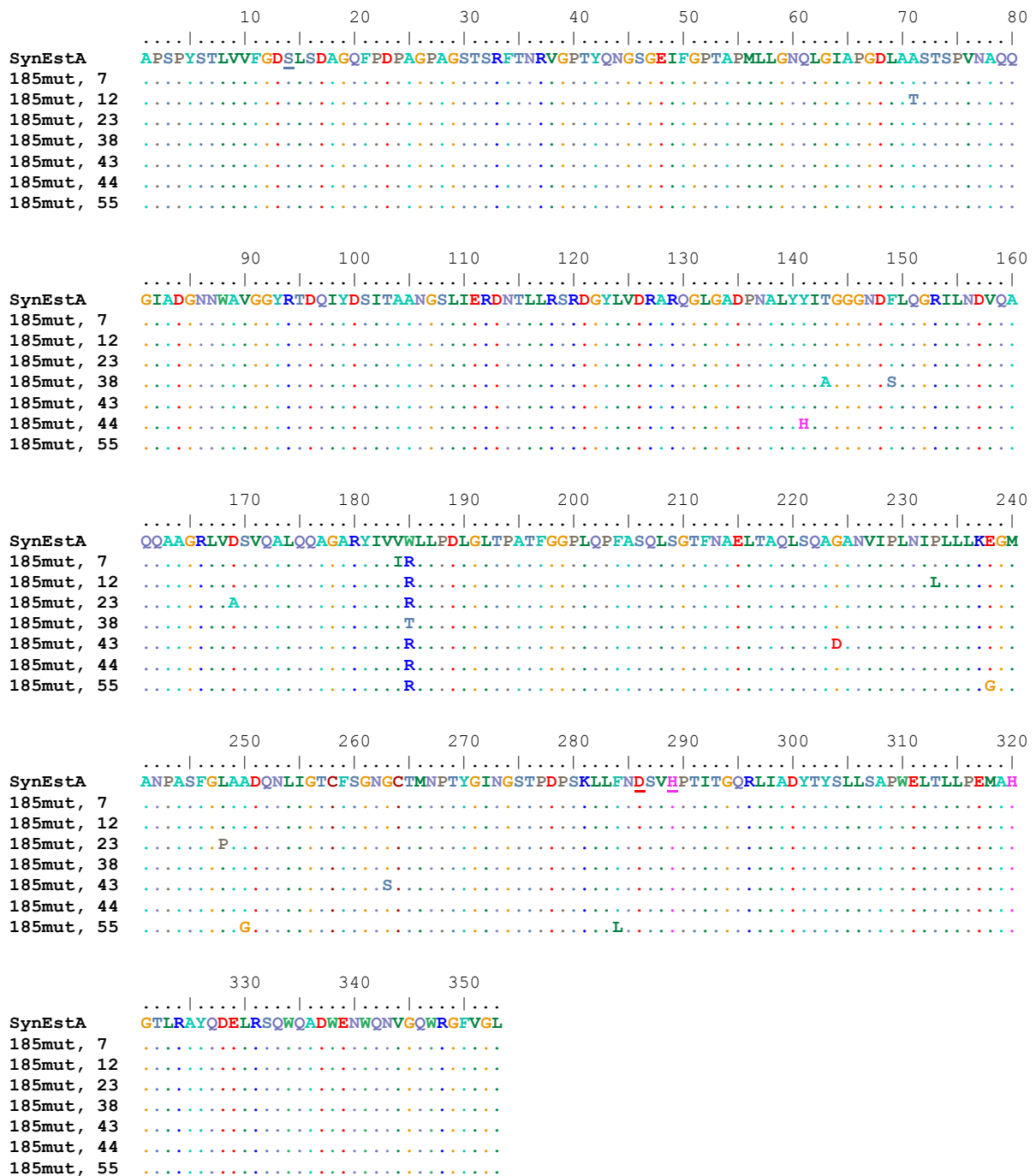


Abb. 4.41: Aminosäuresequenzen der pEst101_185mut Varianten mit Präferenz für das (*R*)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure im Vergleich zum SynEstA Wildtyp. Punkte deuten Wildtyp Aminosäuren an. Die Aminosäuren der katalytischen Triade (S14, D286, H289) sind unterstrichen.

Abschließend wurde untersucht, wie sich eine Enantiopräferenz für das (*R*)-Enantiomer mit einem Betrag des E_{Rapp} -Werts von 16,3 auf eine Markierung mit den enantiomeren Tyramidestern auswirkt. Dazu wurden induzierte Zellen der Variante pEst101_185mut_43 mit dem 1:1-Gemisch der enantiomeren Tyramidester markiert (3.6.3). Die Reaktionszeit betrug 5 min. Als Kontrollen dienten Zellen, die den SynEstA Wildtyp auf der Oberfläche präsentierten (JM109(pEst101)) und Zellen ohne Oberflächenpräsentation (JM109(pBBR1-MCS)). Als Analyseregionen wurden zur Vergleichbarkeit die selben Bereiche gewählt, die

schon bei den Testmarkierungen der bei den Durchmusterungen isolierten *SynEstA* Varianten verwendet wurden (Abb. 4.34). Die Region R1 repräsentierte wie gehabt die Präferenz für das (*R*)-Enantiomer, R2 für das (*S*)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure. Abbildung 4.42 fasst die Ergebnisse zusammen.

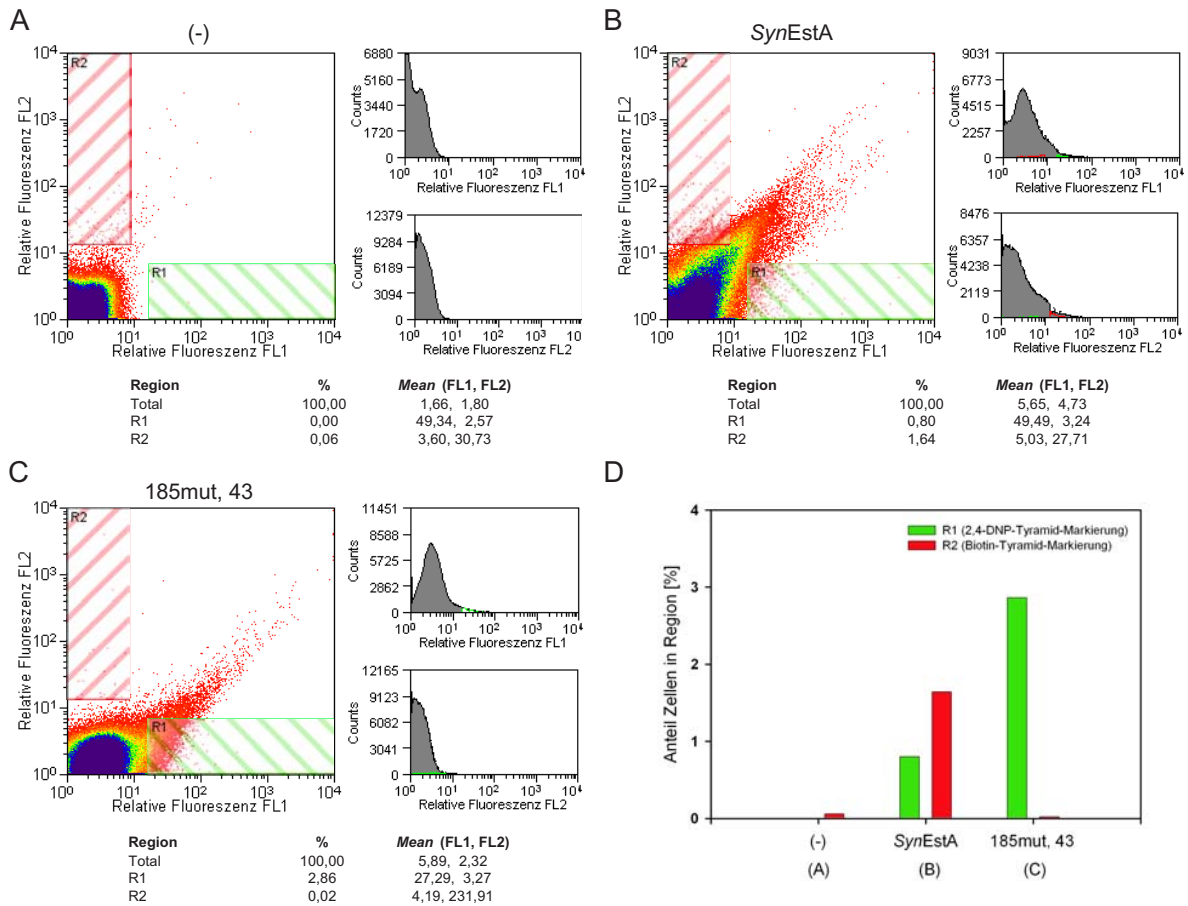


Abb. 4.42: Zwei-Farben Markierung der Variante pEst101_185mut_43 (C) mit einem 1:1-Gemisch aus (*R*)-2-MDA-2,4-Dinitrophenyl-Tyramidester und (*S*)-2-MDA-Biotin-Tyramidester. *FACS*-Histogramme. Als Kontrollen dienen Zellen ohne Oberflächenpräsentation (A) und Zellen, die den *SynEstA* Wildtyp präsentierten (B). Die zur Analyse eingefügten Regionen repräsentieren die für die jeweilige Markierung spezifischen Fluoreszenzemissionsbereiche. **R1** (grün): 2,4-Dinitrophenyl-Tyramidmarkierung, **R2** (rot): Biotin-Tyramidmarkierung. *Mean* bezeichnet die mittleren relativen Fluoreszenzen pro Zelle im entsprechenden Bereich. (D) Zusammenfassung der Ergebnisse in Form der prozentualen Anteile der Gesamtereignisse in den entsprechenden Regionen.

Bei diesen Markierungen ließ sich nun eine sehr deutliche Verschiebung der fluoreszierenden Population der Variante pEst101_185mut_43 im Vergleich zum Wildtyp erkennen. Die Differenzen der Ereignisse in Region R1 betragen ca. 2 %, in Region R2 ca. 1,6%, was im Falle der Variante bedeutet, daß so gut wie keine Zellen in Region R2 aufgetreten sind. Dies bedeutet jedoch vermutlich auch, daß sich noch höhere Enantio-selektivitäten auf diese Art der Markierung nicht mehr abbilden lassen.

4.2.5 Zusammenfassung und Diskussion zur Isolierung von Esterase Varianten mit veränderter Enantioselektivität

Das vorangegangene Kapitel beschreibt die Hochdurchsatz-Isolierung und Charakterisierung von Esterase Varianten mit veränderter Substratspezifität mittels *E. coli* Zelloberflächenpräsentation und substratspezifischer zwei-Farben Markierung.

Auf diese Weise konnten in einem Modellanreicherungs experiment mit enantiomeren Tyramidestern der 2-Methyldekansäure aus zwei Bibliotheken unterschiedlicher Fehlerraten (ca. 2 & ca. 4 Aminosäuresubstitutionen pro Enzym) und Transformantenzahlen ($6,8 \times 10^7$ & $4,0 \times 10^7$) insgesamt 5 Varianten der *P. aeruginosa* Esterase EstA mit invertierten Enantioselektivitäten von $E_{\text{Rapp}} = 1,1$ bis $E_{\text{Rapp}} = 6,7$ (Wildtyp: $E_{\text{Sapp}} = 1,2$) isoliert werden. Die Analyse der Nukleotidsequenzen der isolierten Varianten führte zur Identifizierung eines für die Enantioselektivität entscheidenden „hot spots“. Nach Sättigungsmutagenese an dieser Position wurde schließlich eine Variante mit invertierter Enantioselektivität und einem E_{Rapp} -Wert von 16,3 erhalten.

Obwohl hydrolytische Enzyme der Klassen Lipasen und Esterasen in den letzten Jahren aufgrund ihrer biotechnologischen Relevanz^[58,257] vielfach die Objekte enzymatischer Optimierungen waren,^[116,258,259] ist die Anzahl der dis *dato* beschriebenen Beispiele für erfolgreich durchgeführte Modifikationen von Enantioselektivitäten verhältnismäßig überschaubar.^[260]

Das erste Beispiel wurde 1997 von REETZ, JAEGER und Mitarbeitern anhand der *P. aeruginosa* Lipase LipA (PAL) und dem chiralen Modellsubstrat 2-Methyldekansäure beschrieben. Nach vier Runden gerichteter Evolution mit Enzymbibliotheken von ca. zwei Aminosäureaustauschen pro Enzym und insgesamt ca. 8000 einzeln durchmusterten Klonen (Abb. 1.6) konnte eine Variante mit einem verbesserten E -Wert von 11,3 für das (*S*)-Enantiomer (Wildtyp: $E_{\text{S}} = 1,1$) identifiziert werden.^[147] Gesättigte Mutagenese an den Positionen der Aminosäureaustausche der identifizierten Varianten und folgende kombinatorische Verfahren führten letztlich zur Identifizierung einer Variante mit einem E_{S} -Wert von >51 . Dazu wurden insgesamt ca. 40.000 Klone mit beiden Enantiomeren des Modellsubstrats jeweils einzeln untersucht.^[148,151]

HENKE und BORNSCHEUER beschrieben die Identifizierung einer Variante der *P. fluorescens* Esterase (PFE), die mit einem E -Wert von 6,6 fast eine Verdopplung der Enantioselektivität des Wildtyps ($E = 3,5$) für das (*R*)-Enantiomer des Modellsubstrats 3-Phenylbutansäure aufwies.^[146] In einem anderen Ansatz führte die einzelne Durchmusterung von 7000 Klonen einer PFE Bibliothek mit 1 bis 2 Mutationen pro Gen zur Identifizierung einer Variante mit erhöhter Enantioselektivität für die alkoholische Komponente eines Acetylestere. Diese Variante beinhaltete 3 Aminosäuresubstitutionen und zeigte eine Selektivität für das (*S*)-Enantiomer des But-3-yn-2-ols mit einem E -Wert von 89 (Wildtyp: $E_{\text{S}} = 3$), jedoch mit Reduktion der spezifischen Aktivität um den Faktor 10.000 im Vergleich zum Wildtyp. Durch Sättigungsmutagenese an den drei Substitutionspositionen und Durchmusterung der resultierenden Varianten, konnte letztlich eine Variante mit zwei

Austauschen und einem E_S -Wert von 96 sowie einer nur leicht reduzierten spezifischen Aktivität identifiziert werden.^[261]

REETZ und Mitarbeitern gelang durch ein semi-rationales Verfahren (*CAST*) mit der Durchmusterung von 5 Bibliotheken, bei denen jeweils 2 unterschiedliche Positionen in der Substratbindetasche randomisiert waren, die Identifizierung von 8 Varianten der *P. aeruginosa* Lipase LipA, die im Gegensatz zum Wildtyp in der Lage waren, sterisch anspruchsvolle Substrate zu hydrolysieren. Dazu wurden 11 derartige Substrate in insgesamt 165.000 Einzelreaktionen getestet. Die paarweise Kombination der Substitutionen der Variante mit dem besten katalytischen Profil mit sechs anderen Varianten führte schließlich zur Identifizierung einer Variante mit einer Enantioselektivität von $E = 49$ gegenüber einem sterisch anspruchsvollen chiralen Substrat, das vom Wildtyp gar nicht hydrolysiert wurde.^[132]

Die erste durch gerichtete Evolution beschriebene Inversion von Enantioselektivität eines lipolytischen Enzyms wurde ebenfalls durch REETZ und Mitarbeitern anhand der *P. aeruginosa* Lipase LipA und dem Modellsubstrat 2-Methyldekansäure beschrieben. Durch die einzelne Durchmusterung von 15.000 Klonen einer Bibliothek von ca. 2 bis 3 Aminosäuresubstitutionen pro Enzym konnten zwei Varianten mit invertierter Enantioselektivität identifiziert werden ($E_R = 2,0$ & $E_R = 1,1$; Wildtyp: $E_S = 1,1$). Weitere Runden gerichteter Evolution auf Basis der jeweils besten Varianten sowie die Kombination der Substitutionen mittels *DNA-shuffling*^[149] und die einzelne Durchmusterung von insgesamt ca. 45.000 Klonen führten letztlich zu einer Variante mit 11 Aminosäureaustauschen und einer Selektivitätsinversion mit einem E_R -Wert von 30,0.^[152]

KOGA und Mitarbeiter beschrieben die Inversion der Enantioselektivität der Lipase aus *Burkholderia cepacia* gegenüber den Enantiomeren p-Nitrophenylestern der 3-Phenylbutansäure. Durch die strukturbasierte Mutagenese von 4 Positionen in der Substratbindetasche des Enzyms und die einzelne Durchmusterung von ca. 12.000 Klonen konnten zwei Varianten mit invertierter Enantioselektivität identifiziert werden ($E_R = 33$ & $E_R = 38$; Wildtyp: $E_S = 33$).^[153]

IVANCIC und Mitarbeitern gelang die Inversion der Enantioselektivität der Esterase EstB aus *Burkholderia gladioli* gegenüber den Enantiomeren des Methyl- β -hydroxyisobutyrate. Die Durchmusterung von ca. 75.000 Klonen einer Enzybibliothek von ca. 4 Aminosäuresubstitutionen pro Enzym führte zur Identifizierung von drei Varianten mit im Vergleich zum Wildtyp herabgesetzter Enantioselektivität für das (*S*)-Enantiomer des getesteten Substrats ($E_S = 3,3$, $E_S = 3,1$ $E_S = 3,4$, Wildtyp: $E_S = 6,1$). Alle drei Varianten beinhalteten Substitutionen an einer identischen Position. Eine folgende Sättigungsmutagenese an dieser Position brachte eine Variante mit invertierter Enantioselektivität und einem E_R -Wert von 1,5 hervor. Durch strukturbasierte Mutagenese von 19 Aminosäuren in der Umgebung des katalytischen Zentrums, gefolgt von Sättigungsmutagenese weiterer, dadurch identifizierter „hot spot“ Positionen, konnte letztlich eine Variante mit invertierter Enantioselektivität und einem E_R -Wert von 28,9 gefunden werden.^[154]

Alle diese Arbeiten basierten auf der Untersuchung einzelner Klone zur Identifizierung von Varianten mit veränderter Enantioselektivität. Diese Art der Durchmusterung ist trotz Automatisierung extrem zeit- und arbeitsintensiv und hat eine massive Limitierung der Anzahl maximal analysierbarer Varianten zur Folge, was gerade bei Bibliotheken höherer Mutationsraten dazu führt, daß nur ein Bruchteil der möglichen Varianten analytisch erfasst wird. Der Anteil inaktiver Varianten einer Bibliothek liegt bei Experimenten der gerichteten Evolution im Mittel zwischen 50 - 80%.^[9] Diese Tatsache schränkt die Anzahl der analysierten Varianten mit potentiell veränderten katalytischen Eigenschaften weiter ein, da bei Einzelklonuntersuchungen zwangsläufig auch die inaktiven Klone getestet werden.

Um die maximale Anzahl möglicher Varianten in analysierbaren Grenzen zu halten, nutzen semi-rationale Ansätze strukturelle Informationen des betreffenden Enzyms zur Mutagenese bestimmter potentiell für die Enantioselektivität entscheidender Aminosäurepositionen und schränken somit den zu betrachtenden Sequenzraum ein.^[132,153,154,169] Derartigen Verfahrensweisen sind jedoch nur Enzyme zugänglich, für die strukturelle Informationen bereits vorliegen. Abgesehen davon wurden bereits in zahlreichen Arbeiten Aminosäuresubstitutionen in der Peripherie (bezogen auf das aktive Zentrum) eines Enzyms identifiziert, die einen entscheidenden Einfluß auf die Enantioselektivität hatten.^[146,148,152,154,261] Solche sind in der Regel durch rationale Ansätze nicht zu erfassen, da sich weitreichende strukturelle Effekte einer eingeführten Substitution auch mit bioinformatischen Methoden nach wie vor nicht zuverlässig vorhersagen lassen.^[116] Zudem gibt es Hinweise, daß Enzymvarianten mit veränderten Eigenschaften besonders häufig in Bibliotheken mit sehr hohen Mutationsraten auftauchen, da die effektive Größe einer Bibliothek nicht der Anzahl der Transformanten entspricht, sondern der Anzahl einzigartiger Sequenzen. ARNOLD und Kollegen konnten anhand einer Bibliothek eines scFv Antikörperfragments (242 Aminosäuren) von 10^6 Transformanten mit einem Mittel von einer Aminosäuresubstitution pro Variante zeigen, daß die meisten der 2178 möglichen Varianten ca. 100 mal auftraten, was die effektive Größe der Bibliothek um den Faktor 100 reduzierte. Bei einer Nukleotidmutation pro Kodon sind aufgrund des konservativen Charakters des genetischen Codes im Mittel 5,7 verschiedene Aminosäuresubstitutionen zugänglich. Für eine Bibliothek eines Protein von 242 Aminosäuren ergibt das 1379 zugängliche einzigartige Sequenzen, was bei 10^6 Transformanten einer Reduktion der effektiven Größe der Bibliothek um den Faktor 10^3 entspricht. Höhere Mutationsraten führen dagegen zu einer Erweiterung des Sequenzraums und damit zu einer Erhöhung der Anzahl einzigartiger Sequenzen. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die statistisch vorhergesagte Akkumulation der Anzahl inaktiver Varianten durch hohe Mutationsraten ca. um den Faktor 10^3 von der tatsächlich beobachteten abweicht. Die Autoren erklären dieses Phänomen durch kompensatorische Effekte zusätzlicher Austausche, die aufgetretene negative Wirkungen anderer Substitutionen „abfangen“ können.^[158] Trotzdem erhöht sich neben der Anzahl einzigartiger Sequenzen bei der Verwendung sehr hoher Mutationsraten auch die Anzahl inaktiver Varianten drastisch. Die Wahl der „optimalen“ Mutationsrate ist also nicht zuletzt abhängig von der Effektivität des verwendeten Durchmusterung- bzw. Anreicherungsverfahrens.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren zur Identifizierung und Isolierung von Varianten lipolytischer Enzyme mit veränderter Enantioselektivität unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Arbeiten im Wesentlichen dadurch, daß es nicht auf einer einzelnen Durchmusterung von Bibliotheken beruht, sondern auf der direkten Anreicherung von Varianten mit veränderter Enantioselektivität. Während erstere auf der einzelnen Analyse jeder individuellen Variante basiert, wird die hier beschriebene Anreicherung mit einer großen Anzahl an Varianten simultan durchgeführt. Da die Identifizierung und Anreicherung positiver Varianten sowohl auf Aktivität wie auch auf Selektivität beruht, fallen katalytisch inaktive Klone prinzipiell durch das „Selektionsraster“. Dadurch ermöglicht das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren auch die Sortierung großer Enzymbibliotheken mit hohen Mutationsraten.

Bis *dato* ist im Bezug auf veränderte Enantioselektivität lediglich ein Beispiel eines ähnlichen Anreicherungsverfahrens beschrieben. DRÖGE und Mitarbeitern gelang die Isolierung einer Variante der *B. subtilis* Lipase LipA mit invertierter Enantioselektivität durch die Verwendung enantiomerenreiner Phosphonat-Inhibitoren. Derartige Substrate können von dem katalytisch aktiven Serinrest eines lipolytischen Enzyms nukleophil angegriffen werden, was zur Ausbildung des ersten Übergangszustands führt (Abb. 1.3 B). Letzterer kann jedoch nicht wieder durch ein Wassermolekül aufgelöst werden, was die katalytische Inaktivierung des Enzyms zur Folge hat („Suizid-Substrat“). Die für eine Anreicherung nötige Genotyp-Phänotyp-Kopplung wurde mittels Präsentation der Varianten auf Bakteriophagen realisiert. Zur Erzeugung einer LipA Bibliothek erfolgte die strukturbasierte gesättigte Mutagenese der Aminosäurepositionen 16 bis 20, die einen zum aktiven Zentrum des Enzyms benachbarten Abschnitt darstellten. Das Prinzip der Anreicherung basierte auf der Immobilisierung der „Suizid-Substrate“ (*R*)- & (*S*)-1,2-*O*-Isopropyliden-*sn*-Glycerol (IPG) als *p*-Nitrophenylesterderivate an zwei festen Phasen. Die Phagen-präsentierte Bibliothek (5×10^4 Transformanten) wurde dazu zuerst zur festen Phase des (*S*)-Enantiomers gegeben. Nach kurzer Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen, gebundene Phagen wurden enzymatisch von der Festphase gespalten und in *E. coli* Zellen vermehrt. Anschließend wurde die neue Phagengeneration geerntet, zu der festen Phase des (*R*)-Enantiomers gegeben und erneut kurz inkubiert. Im Anschluß wurden die nicht-gebundenen Phagen (Überstand) gesammelt und unmittelbar zur festen Phase der (*S*)-Enantiomers gegeben. Nach Inkubation wurde diesmal wieder der Überstand verworfen und gebundene Phagen nach Abspaltung von der Matrix in *E. coli* Zellen vermehrt. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Letztlich wurden 15 der so sortierten Varianten katalytisch charakterisiert: 12 zeigten dabei die Enantioselektivität des Wildtyps (33 % *ee* für das (*R*)-Enantiomer), eine Variante zeigte keine Selektivität und zwei Varianten zeigten eine Inversion der Enantioselektivität (*ee* = 32,9 % & 35,3 % für das (*S*)-Enantiomer). Nukleotidsequenzanalysen offenbarten bei diesen beiden Varianten identische Sequenzen und einen einzelnen Aminosäureaustausch. Die kodierenden Sequenzen der Varianten mit Wildtyp Selektivität zeigten zwar unterschiedliche Nukleotidsubstitutionen, kodierten jedoch alle für die Aminosäuresequenz des Wildtyps. Letzterer Befund ist ein deutliches Indiz dafür, daß auch die Wildtyp-Aminosäuresequenz selektiv angereichert wurde.^[169]

Beim direkten Vergleich dieses Anreicherungsverfahrens mit dem in dieser Arbeit beschriebenen werden für ersteres mehrere Nachteile deutlich: (i) Die Substrate sind aufgrund der Immobilisierung an einer festen Phase synthetisch aufwendig. Letztere muß nach jeder Anreicherungsrunde mit neuen Substraten regeneriert werden. (ii) Durch die getrennte Inkubation der zu durchmusternden Varianten mit den beiden Enantiomeren werden kompetitive Substrateffekte nicht berücksichtigt. (iii) Theoretisch genügt der Umsatz eines einzigen Substratmoleküls um eine kovalente Kopplung einer Phagen-präsentierten Variante an der festen Matrix zu bewirken. Dadurch verschiebt sich der evolutive Selektionsdruck zwangsläufig von Selektivität in Richtung Aktivität, was vermutlich den Grund für die Anreicherung der Wildtyp-Aminosäuresequenz darstellt. Das in dieser Arbeit vorgestellte Anreicherungsverfahren nutzt dagegen spezifische Markierungsreaktionen, die aufgrund der unterschiedlichen Architekturen der Alkoholkomponente der Substrate unabhängig voneinander nachzuweisen sind. Dies ermöglicht die simultane Inkubation einer Enzybibliothek mit beiden Enantiomeren des zu betrachtenden Substrats. Der Markierungsgrad eines Klons ist dabei außerdem abhängig von der Anzahl hydrolysiertes Substratmoleküle und steigt somit mit der abgelaufenen Reaktionszeit (Abb. 4.22-4.24). Durch die Nutzung der Durchflußzytometrie wird somit die gekoppelte Selektion auf Aktivität und Selektivität ermöglicht, die sich aufgrund flexibler „Selektionsfenster“ zudem variabel einstellen läßt.

Die Identifizierung veränderter Enantioselektivität basiert bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren auf der Tatsache, daß sich unterschiedliche Tyramid-Konjugationen auf Seiten der Alkoholkomponente der verwendeten Substrate offensichtlich nicht auf deren Zelloberflächen-Kopplungseffizienzen auswirken (Abb. 4.11). Dies scheint zumindest für die in dieser Arbeit verwendeten Biotin- und 2,4-Dinitrophenylreste der Fall zu sein. Dieser Befund ist keineswegs selbstverständlich, da das 2,4-Dinitrophenyl-Tyramid-Konjugat in der als Carbonsäureester angebotenen Form von zwei unterschiedlichen Enzymen als Substrat akzeptiert werden muß, um zu einer kovalenten Markierung der Zelloberfläche zu führen. Da ist zum einen das lipolytische Enzym, welches in der Lage sein muß, die Esterbindung zwischen Tyramid-Konjugat und Säure zu hydrolysieren. Es ist bekannt, daß nicht nur der Carbonsäureanteil eines Esters für die Substratspezifität entscheidend ist. Auch die Struktur der alkoholischen Komponente kann für die Hydrolysierbarkeit eines Esters durch ein gegebenes lipolytisches Enzym von entscheidender Bedeutung sein.^[261] Biotin und 2,4-Dinitrophenol unterscheiden sich sowohl strukturell als auch vom Molekulargewicht deutlich voneinander (Abb. 4.8). Diese Differenzen scheinen jedoch auch auf die Substraterkennung durch das zweite an der kovalenten Markierung beteiligte Enzym, die oberflächenfixierte Meerrettichperoxidase (Abb. 1.9), keinen Einfluß zu haben.

Ein Nachteil des Verfahrens besteht jedoch in der Tatsache, daß sich unterschiedliche Mischungsverhältnisse beider zur Markierung verwendeter Tyramidspezies nicht direkt durch die Verteilungen markierter Ereignisse in durchflußzytometrischen Messungen abbilden lassen (Abb. 4.13). Dies ist vermutlich auf die Überschneidung der Fluoreszenzemissionsspektren der beiden zum Nachweis der unterschiedlichen Markierungen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zurückzuführen. R-Phycoerythrin und Alexafluor488 überschneiden

sich in ihren Emissionsspektren bei 560 nm noch mit ca. 30 % Emissionseffizienz. Die für die durchflußzytometrischen Analysen verwendeten Fluoreszenzemissions-Filter besaßen eine Durchlässigkeit von 510 nm bis 550 nm (530/40) für Fluoreszenzkanal FL 1 (Alexafluor488) und von 570 nm bis 850 nm (570/LP) für Fluoreszenzkanal FL 2 (R-Phycoerythrin). Dies bedeutet insbesondere für Alexafluor488, daß ca. 20 % des Emissionsspektrums in dem Bereich des Filters für die Fluoreszenz FL 2 liegen. Dadurch kommt es zwangsläufig zu Kreuzdetektionen deren Intensitäten vom Grad der Markierungsintensität abhängig sind.^[262] Der Einsatz anderer Fluoreszenzfarbstoffe mit distinkten Emissionsspektren, wie sie z. B. im Falle der *Quantum Dot* Technologie vorliegen,^[263] würde dieses Problem vermutlich umgehen. Jedoch ermöglicht die Anregungswellenlänge von 488 nm des in dieser Arbeit eingesetzten Argon-Lasers lediglich die Verwendung eines eingeschränkten Repertoires von Fluoreszenzfarbstoffen, die allesamt Überschneidungen in ihren Emissionsspektren aufweisen. Auf die Verwendung anderer Anregungswellenlängen, z. B. im ultravioletten Bereich wurde aufgrund höherer technischer Hürden verzichtet.

Bei dem durchgeführten Modellanreicherungs experiment mit den enantiomeren Tyramidestern der 2-Methyldekansäure konnten beide eingesetzten *SynEstA* Bibliotheken in zwei bzw. einer Sortierungsrunde so angereichert werden, daß von 45 einzeln untersuchten Klonen der Sortierungen auf Präferenz für das (*R*)-Enantiomer 5 eine Inversion der Enantioselektivität aufwiesen. Dies entspricht einem Anteil von mehr als 10 %. Bei den beschriebenen Einzeldurchmusterungsexperimenten lagen die „Trefferraten“ im Falle von Verbesserungen bestehender Enantioselektivität zwischen 0,01 %^[261] und 0,36 %, ^[147] im Falle von Selektivitätsinversionen sogar nur zwischen ca. 0,004 %^[154] und ca. 0,01 %.^[152,153] Lediglich bei dem durch DRÖGE und Mitarbeitern beschriebenen Anreicherungs experiment mit Phosphonat-Inhibitoren und Phagen-Präsentation konnten letztlich von 15 aussortierten Klonen 2 Varianten mit invertierter Enantioselektivität identifiziert werden, was einer „Trefferrate“ von ca. 13 % entspricht.^[169] Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß es sich dabei um zwei Klone derselben Variante handelte, und die verwendete Bibliothek semi-rational aufgrund von strukturbasierten Informationen erstellt wurde.

Auch die Enantioselektivitäten und Anzahlen der Aminosäuresubstitutionen der in dieser Arbeit isolierten Varianten mit Werten von $E_{Rapp} = 1,1$ (1 Austausch) bis $E_{Rapp} = 6,7$ (4 Austausche) (Wildtyp: $E_{Sapp} = 1,2$) lassen sich durchaus mit denen anderer Arbeiten zur Identifizierung invertierter Selektivitäten vergleichen: Die beiden von REETZ und Mitarbeitern nach Durchmusterung identifizierten Varianten mit Selektivitätsinversion zeigten Werte von $E_R = 2,0$ (1 Austausch) und $E_R = 1,1$ (4 Austausche) (Wildtyp: $E_S = 1,1$).^[152] Bei IVANCIC und Mitarbeitern führte die Durchmusterung einer Enzybibliothek sogar lediglich zur Identifizierung von Varianten mit geringerer Selektivität ($E_S = 3,3$, 1 Austausch; $E_S = 3,1$, 2 Austausche; $E_S = 3,4$, 2 Austausche) als der Wildtyp ($E_S = 6,1$). Die Identifizierung einer Variante mit invertierter Enantioselektivität konnte erst durch anschließende Sättigungsmutagenese eines „hot spots“ erreicht werden.^[154] Lediglich KOGA und Mitarbeitern gelang nach Durchmusterung auf Anhiob die Identifizierung von zwei Varianten mit invertierter Selektivität und Werten von $E_R = 33$ und $E_R = 38$ (je 4 Substitutionen) (Wildtyp: $E_S = 33$). Hierbei handelte es sich jedoch ebenfalls um eine strukturbasierte Bibliothek.^[153]

Bei genaueren Charakterisierungen der katalytischen Eigenschaften der in dieser Arbeit isolierten Varianten zeigten alle im Vergleich zum *SynEstA* Wildtyp signifikante Reduktionen der Gesamtaktivitäten (Abb. 4.31) und der Oberflächenpräsentationseffizienzen (Abb. 4.32). Letztere konnten jedoch nicht mit den gemessenen Gesamtaktivitäten korreliert werden. Dies deutet an, daß die Reduktionen der Gesamtaktivitäten nicht ausschließlich auf verminderte Oberflächenpräsentationseffizienzen zurückzuführen sind. Obwohl die am wenigsten selektive Variante (pEst101_075ep_D10: $E_{\text{Rapp}} = 1,1$) im Vergleich zum *SynEstA* Wildtyp die geringste Reduktion der Gesamtaktivität aufwies (41 % Wildtypaktivität), konnte auch der Grad der Selektivität nicht direkt mit der Gesamtaktivität in Verbindung gebracht werden, da die selektivste Variante (pEst101_075ep_A5: $E_{\text{Rapp}} = 6,7$; 21 % Wildtypaktivität) nicht die mit der geringsten Gesamtaktivität war (pEst101_075ep_B11: $E_{\text{Rapp}} = 3,3$; 8 % Wildtypaktivität). Die Markierungen mit dem polyklonalen anti-EstA Antikörperserum lieferten jedoch nur eine grobe quantitative Abschätzung der vorhandenen Enzymmengen. Für exakte Untersuchungen der hydrolytischen Aktivitäten erfordert es eine genaue Quantifizierung der Anzahl eingesetzter Enzymmoleküle. Die dazu notwendigen löslichen Produktionen und Reinigungen der katalytischen Domänen des *SynEstA* Wildtyps und der isolierten Varianten wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch noch nicht realisiert. Reduzierte Gesamtaktivitäten bei identifizierten Varianten mit veränderter Substratspezifität sind zudem auch in anderen Arbeiten beschrieben worden. So zeigten die von IVANCIC und Mitarbeitern identifizierten Varianten mit invertierter Enantioselektivität Aktivitäten von ca. 63 % ($E_{\text{Rapp}} = 1,5$) bis ca. 14 % ($E_{\text{Rapp}} = 27,3$) im Vergleich zum Wildtyp.^[154] Die von REETZ und Mitarbeitern identifizierten PAL-Varianten, die im Gegensatz zum Wildtyp in der Lage waren sterisch anspruchsvolle Substrate zu hydrolysieren, zeigten ebenfalls eine geringere Aktivität gegenüber unverzweigten Standardsubstraten.^[132] Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in der strukturellen Veränderung der Substratbindetasche zu finden sein. Eine Vergrößerung dieser könnte zur Folge haben, daß „kleinere“ Substrate zunehmend auf eine für die Hydrolyse unproduktive Weise binden.^[264-267]

Aufgrund der bis *dato* nicht zur Verfügung stehenden Röntgenkristallstruktur von EstA sind Interpretationen der molekularen Mechanismen der Aminosäuresubstitutionen der in dieser Arbeit isolierten Varianten mit invertierter Enantioselektivität schwierig. Anhaltspunkte liefert möglicherweise ein Modell der aminoterminalen Domäne von EstA, welches anhand von Sequenzhomologien angefertigt wurde. Als Matrize für die Modellierung diente die Kristallstruktur der putativen Lipase/Acyltransferase *EfPLip* aus *Enterococcus faecalis*.^[268] Das Modell wurde angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Filip Kovacic aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jaeger am IMET in Jülich. Aufgrund der geringen Größe von *EfPLip* (195 Aminosäuren) konnten allerdings nur 186 Aminosäuren von EstA modelliert werden. Abbildung 4.43 zeigt die modellierte Struktur und die Positionen der Austausche der verschiedenen isolierten Varianten insofern diese im Modell enthalten waren.

der Variante pEst101_0,3ep_2F4 befinden sich im Modell jeweils benachbart zu dem Aspartat- bzw. Histidinrest der katalytischen Triade. Ob und wie sich diese Substitutionen auf letztere auswirken bleibt jedoch spekulativ. Bei allen anderen Substitutionen lassen sich durch Betrachtung des Modells ebenfalls keine weiteren Rückschlüsse ziehen, ob und wie sie die Enantioselektivität des Enzyms beeinflussen können. Es kann sich hierbei um weit reichende Effekte handeln, die sich auch von der Peripherie auf die Gesamtstruktur des Enzyms und somit auf die räumliche Anordnung der Reste im katalytischen Zentrum auswirken können.^[270] Periphere Substitutionen mit Wirkung auf die Enantioselektivität eines Enzyms sind auch in anderen Arbeiten beschrieben worden.^[146,148,152,154,261] Im Falle der *P. aeruginosa* Lipase LipA wurde die Veränderung der Enantioselektivität durch periphere Substitutionen mit einer Erhöhung der Flexibilität des Enzyms erklärt.^[148] Die Position 185, an der bei zwei isolierten Varianten der Tryptophan- gegen einen Argininrest substituiert war, befindet sich im Modell ebenfalls weit vom katalytischen Zentrum entfernt am Ende eines potentiellen β -Faltblattes. Die genaue Wirkung dieser Substitution und der Einführung einer zusätzlichen positiven Ladung auf die Gesamtstruktur der katalytischen Domäne bleibt auch hier spekulativ.

Durch eine gesättigte Mutagenese konnte Position 185 jedoch eindeutig als „hot spot“ mit Einfluß auf die Enantioselektivität von EstA identifiziert werden. Von 60 durchmusterten Einzelklonen konnten 7 Varianten identifiziert werden, die ebenfalls eine Inversion der Enantioselektivität gegenüber den enantiomeren Estern der 2-Methyldekansäure aufwiesen. Die genauere Analyse der enzymatischen Charakteristiken dieser Varianten offenbarte unterschiedliche Gesamtaktivitäten (Abb. 4.39) und unterschiedlich stark ausgeprägte Enantioselektivitäten, deren Beträge sich von $E_{\text{Rapp}} = 1,3$ (pEst101_185mut_38) bis $E_{\text{Rapp}} = 16,3$ (pEst101_185mut_43) erstreckten (Abb. 4.38). Alle Varianten zeigten zudem im Vergleich zum Wildtyp erneut Reduktionen der Gesamtaktivitäten und Oberflächenpräsentationseffizienzen (Abb. 4.40), die sich jedoch wieder nicht miteinander korrelieren ließen. Die Nukleotidsequenzanalysen offenbarten bis auf eine Ausnahme bei allen Varianten an der randomisierten Position 185 eine Substitution des Tryptophanrests durch einen Argininrest (Abb. 4.41). Exakt dieser Austausch trat auch bei den beiden isolierten Varianten der Sortierungsexperimente auf. Die Ausnahme bildete eine Variante mit einem Threoninrest an dieser Position (pEst101_185mut_38). Diese zeigte jedoch auch die geringste Enantioselektivität ($E_{\text{Rapp}} = 1,3$). Damit konnte nicht nur gezeigt werden, daß Position 185 eine Schlüsselrolle für die Enantioselektivität zukommt, die Substitution des Tryptophanrests gegen einen Argininrest scheint auch den höchsten Betrag der invertierter Enantioselektivität zu erzeugen, der durch Modifikation dieser Position zu erreichen ist. Abgesehen davon scheint nicht jeder beliebige Austausch an dieser Position einen detektierbaren Effekt auf die Enantioselektivität zu besitzen: Bei 3 zusätzlich sequenzierten Varianten, die die Selektivität des Wildtyps aufwiesen, zeigte nur eine den Tryptophanrest des Wildtyps an Position 185. Die drei anderen waren dort durch Leucin, Alanin und Lysin substituiert. Letztere Substitution deutet an, daß die Einführung einer zusätzliche positiven Ladung an dieser Position alleine nicht genügt, um eine Inversion der Enantioselektivität zu erzeugen.

Die Nukleotidsequenzanalysen zeigten außerdem das Vorhandensein von bis zu 3 zusätzlichen Substitutionen bei allen 7 Varianten. Diese sind vermutlich der Grund für die Differenzen in Gesamtaktivität, Enantioselektivität und Oberflächenpräsentationseffizienz bei den Varianten, die den Argininrest an Position 185 beinhalten. Bei der Variante mit dem Threoninrest an dieser Position ist damit nicht auszuschließen, daß die geringfügige Selektivitätsinversion einer (oder beider) der zusätzlichen Substitutionen zuzuschreiben ist. Außerdem bleibt unklar, ob die Variante mit der höchsten Enantioselektivität (pEst101_185mut_43, $E_{\text{Rapp}} = 16,3$) diese ausschließlich der Argininsubstitution an Position 185 zu verdanken hat. In diesem Falle hätten die anderen beiden Austausche dieser Variante keinen Einfluß auf die Enantioselektivität. Das hieße jedoch gleichzeitig, daß alle anderen Varianten mit der Argininsubstitution an Position 185 einen oder mehrere zusätzliche Austausche besitzen, die sich negativ auf den Betrag der Enantiopräferenz auswirken. Zur Abschätzung der potentiellen Lage dieser zusätzlichen Substitutionen in der Tertiärstruktur des Enzyms wurden diese ebenfalls, soweit möglich, in dem Sequenzhomologiemodell von EstA annotiert, was in Abbildung 4.44 gezeigt ist.

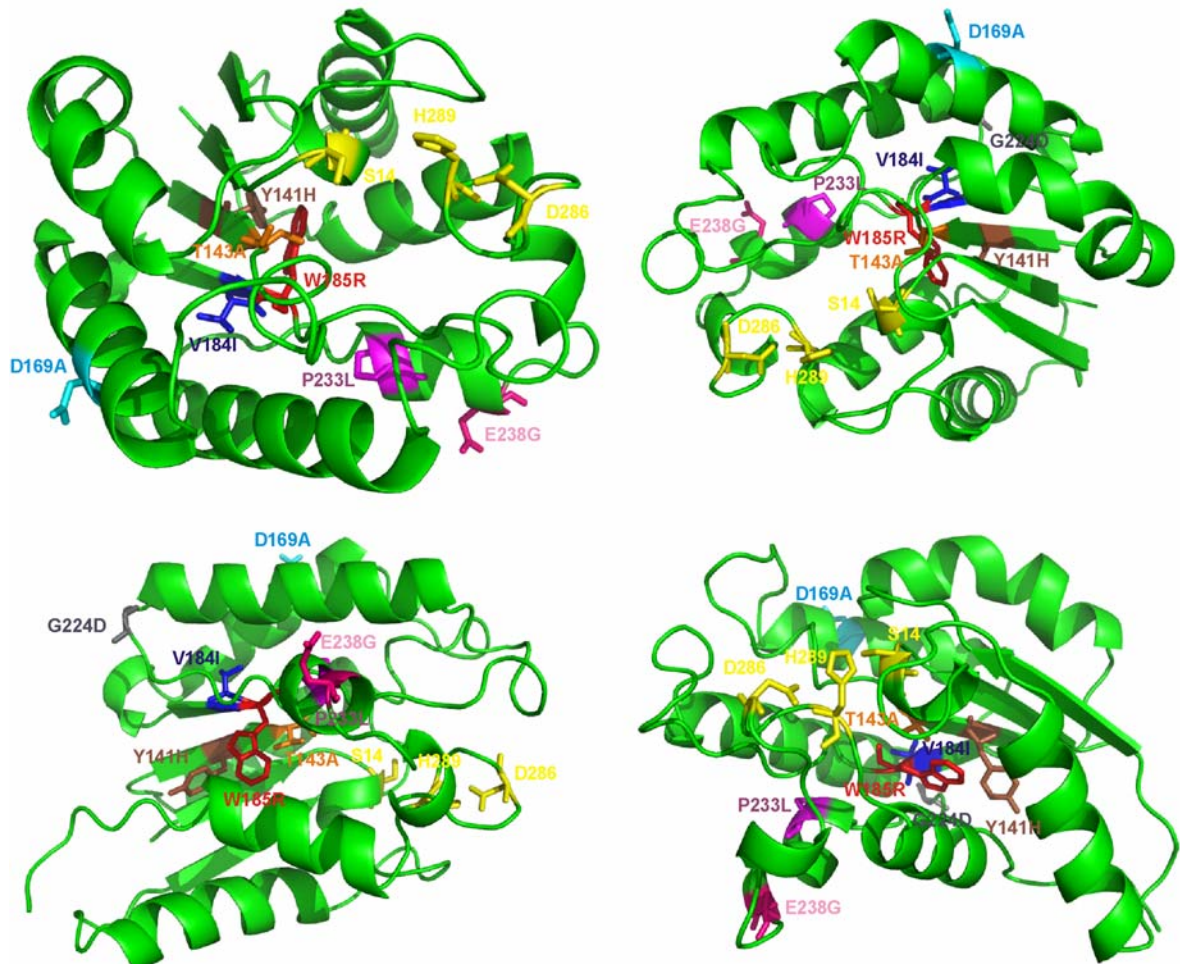


Abb. 4.44: Strukturhomologiemodell der aminoterminalen katalytischen Domäne von *P. aeruginosa* EstA. Unterschiedliche Ansichten. Die Positionen der Austausche der pEst101_185mut Varianten und der katalytischen Triade sind farblich hervorgehoben: **gelb:** Katalytische Triade, **blau:** pEst101_185mut_7, **lila:** pEst101_185mut_12 (A71T nicht abgebildet), **hellblau:** pEst101_185mut_23 (L249P nicht abgebildet), **orange:** pEst101_185mut_38 (F149S nicht abgebildet), **grau:** pEst101_185mut_43 (G263S nicht abgebildet), **braun:** pEst101_185mut_44 und **pink:** pEst101_185mut_55 (A250G und F284L nicht abgebildet). Position 185 ist in **rot** dargestellt.

Das Strukturhomologiemodell deutet an, daß sich keine der annotierbaren zusätzlichen Substitutionen in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum befinden. Drei der zusätzlichen Austausche befinden sich jedoch potentiell benachbart zu Position 185. Dabei handelt es sich um den Threonin gegen Alanin Austausch an Position 143 bei Variante pEst101_185mut_38 ($E_{\text{Rapp}} = 1,3$), den Austausch eines Valinrests gegen einen Isoleucinrest an Position 184 bei Variante pEst101_185mut_7 ($E_{\text{Rapp}} = 4,4$) und den Austausch Tyrosin gegen Histidin an Position 141 bei Variante pEst101_185mut_44 ($E_{\text{Rapp}} = 5,3$). Die beiden letzteren sind die einzigen zusätzlichen Austausche bei diesen Varianten. Die potentielle räumliche Nähe dieser Substitutionen zur Position 185 macht einen negativen Effekt für die, durch den dort vorhandenen Argininrest erzeugte Selektivitätsinversion nicht unwahrscheinlich. Der Austausch des Valinrests an Position 184 gegen einen sterisch anspruchsvolleren Isoleucinrest befindet sich zudem in direkter Nachbarschaft zu Position 185, während die Substitution Tyrosin gegen Histidin an Position 141 eine zusätzliche positive Ladung einführt.

Ob und wie die aufgetretenen zusätzlichen Substitutionen bei der einen oder anderen Variante einen reduzierenden oder potenzierenden Effekt auf die durch Arginin #185 erzeugte Inversion der Enantioselektivität haben, bleibt mit den vorliegenden Ergebnissen letztlich ebenfalls spekulativ. Eine sichere Feststellung des Einflusses der Argininsubstitution an Position 185 auf den Betrag der Enantiopräferenz für das (*R*)-Enantiomer der 2-Methyldekansäure erfordert eine Variante ohne zusätzliche Mutationen.

Die Sättigungsmutagenese an Position 185 führte jedoch letztlich zur weiteren Erhöhung der invertierten Enantioselektivität von $E_{\text{Rapp}} = 6,7$ des besten Klons der Sortierungsexperimente auf $E_{\text{Rapp}} = 16,3$ bei Variante pEst101_185mut_43. Dieser Befund konnte zusätzlich durch gaschromatographische Analysen, durchgeführt von Horst Höbenreich am MPI für Kohlenforschung (Mülheim/Ruhr), bestätigt werden. Dabei zeigte die betreffende Variante einen E_{Rtrue} -Wert von 15,5 und einen *ee*-Wert von 81 % bei 38 % Umsatz.

Die sequentielle Vorgehensweise ((i) Durchmusterung von Bibliotheken nach Varianten mit gewünschten Eigenschaften, (ii) Identifizierung potentieller „hot spot“ Positionen, (iii) Sättigungsmutagenese an „hot spot“ Positionen zur Identifizierung des für die gewünschte Eigenschaft besten Aminosäurerests) ist ein etabliertes Verfahren und hat auch bei verschiedenen anderen Arbeiten zur Steigerung der Enantioselektivität geführt.^[151,261] Bei IVANCIC und Mitarbeitern führte erst die Sättigungsmutagenese zur Identifizierung einer Variante mit invertierter Enantioselektivität. Von 75.000 durchmusterten Klonen konnten davor lediglich drei Varianten mit im Vergleich zum Wildtyp herabgesetzter Selektivität identifiziert werden.^[154] Auch das Auftreten zusätzlicher unerwarteter Substitutionen in Varianten mit durch Sättigungsmutagenese verbesserter Enantioselektivität ist bereits durch KOGA und Mitarbeiter beschrieben worden.^[153] Der grundlegende Unterschied bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren besteht in der Tatsache, daß aufgrund der leistungsstarken Anreicherung, zur Identifizierung von Varianten mit veränderter Selektivität und potentiellen „hot spots“ nur 45 Klone einzeln durchmustert werden mußten und nicht mehrere tausend. Tabelle 4.4 gibt eine Übersicht der jeweils ersten Durchmusterungsrunden

der bisher beschriebenen Arbeiten zur Inversion von Enantioselektivität bei lipolytischen Enzymen im Vergleich zu dem in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren.

Enzym	Mutagenese	S	M	N	I	E_{max}	Wildtyp	Referenz
<i>P. aeruginosa</i> LipA	epPCR	2-3	D	15.000	2	$E_R = 2,0$	$E_R = 1,1$	[152]
<i>B. cepacia</i> Lipase	strukturbasiert	4	D	12.000	2	$E_R = 38,0$	$E_S = 33,0$	[153]
<i>B. gladioli</i> EstB	epPCR	1-4	D	75.000	3	$E_S = 3,1^{(a)}$	$E_S = 6,1$	[154]
<i>B. subtilis</i> LipA	strukturbasiert	1	A	15	2 ^(b)	$ee_S = 35\%^{(c)}$	$ee_R = 33,3\%^{(c)}$	[169]
<i>P. aeruginosa</i> EstA	epPCR	2-4	A	45	5	$E_R = 6,7$	$E_S = 1,2$	Diese Arbeit

Tab. 4.4: Übersicht der ersten Durchmusterungsrunden der beschriebenen Arbeiten zur Inversion von Enantioselektivität bei lipolytischen Enzymen und des in dieser Arbeit vorgestellten Verfahrens. Aufgelistet sind die verwendeten Enzyme, die Art der Mutagenese, die Anzahl der Substitutionen pro Variante (**S**), die verwendete Durchmusterungsmethode (**M**, D: Untersuchung von Einzelklonen, A: Anreicherung), die Anzahl einzeln analysierter Klone (**N**), die Anzahl identifizierter Varianten (**I**), der E -Wert der jeweils selektivsten Variante (E_{max}) und des jeweiligen Wildtyps. ^(a)Bei dieser Arbeit konnten nach Durchmusterung lediglich Varianten mit herabgesetzter Selektivität identifiziert werden. Die Inversion gelang erst durch Sättigungsmutagenese eines „hot spots“. ^(b)Hierbei handelte es sich um zwei identische Varianten. ^(c) E -Werte nicht publiziert.)

Unklar bleibt, warum die Anreicherung mit den enantiomeren Tyramidestern der 2-Methyldekansäure nicht die Isolierung einer Variante mit verbesserter Präferenz für das (*S*)-Enantiomer ermöglichte. Die wahrscheinlichste Ursache liegt dafür vermutlich bei der Wahl des verwendeten Selektionsfensters. Aufgrund der vorliegenden leichten Präferenz des Wildtyps für das (*S*)-Enantiomer wurden vermutlich noch zu viele Klone mit Wildtyp Selektivität in der entsprechenden Region erfasst und somit aussortiert. Eine analytische Markierung der Variante pEst101_185mut_43 ($E_{Rtrue} = 15,5$) mit dem 1:1-Gemisch der enantiomeren Tyramidester zeigte eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich verschobene Population markierter Zellen im *FACS*-Histogramm, bei der so gut wie keine Ereignisse mehr in der für das (*S*)-Enantiomer spezifischen Region auftraten (Abb.4.42). Geringe Unterschiede im Betrag einer bestehenden Selektivität lassen sich also nur mäßig (Abb. 4.34), Inversionen der Enantioselektivität dagegen relativ deutlich abbilden. Dies bedeutet für das Anreicherungsverfahren, daß es offensichtlich einfacher ist, Varianten mit invertierter Selektivität zu identifizieren und isolieren, als solche mit Verbesserung einer bestehenden Präferenz. In der Literatur sind derzeit mehr Beispiele für die Steigerung einer bestehenden Enantioselektivität beschrieben, als für deren Inversion.^[35,106,152] Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß die Inversion einer Selektivität größere strukturelle Änderungen eines Enzyms erfordert als die Erhöhungen einer bestehenden.^[152] Die präferentielle Identifizierung und Isolierung von Varianten mit invertierter Enantioselektivität wird dadurch zum zusätzlichen Vorteil für das in dieser Arbeit vorgestellte Anreicherungsverfahren.

4.3 Indirekte Zelloberflächenpräsentation der *Pseudomonas aeruginosa* Lipase LipA

Der letzte experimentelle Abschnitt dieser Arbeit befasst sich als Exkurs mit einer anderen Art der bakteriellen Zelloberflächenpräsentation eines lipolytischen Enzyms. Die bisher verwendeten Lipasen (Kapitel 4.1) wurden zur Oberflächenpräsentation als Fusionsproteine mit einer esterolytisch inaktiven Variante von EstA (EstA*) produziert (Abb. 4.1). Bei allen getesteten Spezies konnte dadurch die Oberflächenexposition (Abb. 4.4) und katalytische Aktivität (Abb. 4.6) nachgewiesen werden. Dies ist jedoch nur mit Enzymen möglich, die zur korrekten Faltung und Aktivität keine weiteren Faktoren oder Hilfsproteine benötigen. Das folgende Kapitel zeigt einen Weg auf, wie sich auch lipolytische Enzyme die zur korrekten Faltung einen Faltungshelfer benötigen in aktiver Form indirekt auf der Zelloberfläche präsentieren lassen und beschreibt ein Anwendungsbeispiel für eine solche Präsentation.

Vielen Lipasen von biotechnologischer Relevanz benötigen für eine enzymatisch aktive Konformation, abgesehen von allgemeinen periplasmatischen Faltungskatalysatoren wie Dsb Proteinen,^[271,272] zusätzlich spezifische Chaperone, die sogenannten „Lif“-Proteine (*lipase specific foldases*). Diese Lif-Proteine gehören zu einer besonderen Familie sterischer Chaperone, die bei einer Vielzahl Gram-negativer Bakterien auf der periplasmatischen Seite in der Cytoplasmamembran verankert sind.^[273,274]

Ein Modellprotein dieser Familie ist LipH aus *Pseudomonas aeruginosa*.^[274-276] Die Gene dieser Proteine sind üblicherweise in einem Operon mit der adressierten Lipase organisiert.^[274,277] Im Falle von LipH ist dies die *P. aeruginosa* Lipase LipA. Eine schematische Darstellung des Sekretionswegs von LipA befindet sich in Abbildung 4.45.

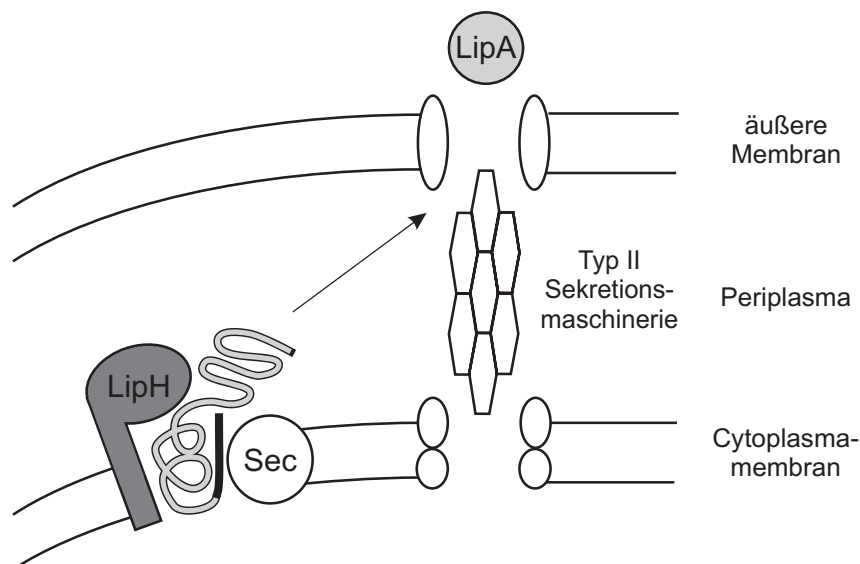


Abb. 4.45: Sekretionsweg der *P. aeruginosa* Lipase LipA. LipA wird im Cytoplasma als Präprotein mit aminoterminaler Signalsequenz synthetisiert. Der Transport ins Periplasma erfolgt durch die Sec-Maschinerie. LipH ist mit einer aminoterminalen α -Helix in der Cytoplasmamembran verankert und vermittelt durch einen unbekanntem Mechanismus die Faltung von LipA in die katalytisch aktive Form. Der Export der aktiven Lipase erfolgt im Anschluß durch die Xcp-Proteine der Typ II Sekretionsmaschinerie (Abbildung modifiziert nach [278]).

Verschiedene Studien von Lif/Lipase-Paaren deuten daraufhin, daß beide Proteine mit hoher Affinität aneinander binden. Die resultierenden Komplexe im 1:1-Verhältnis sind stabil genug, um eine Kopurifikation und Koimmunoprecipitation beider Proteine zu ermöglichen.^[279,280] Diese Komplexe müssen allerdings wieder gelöst werden, damit die aktive Lipase sekretiert werden kann.

Der genaue molekulare Mechanismus der Funktion von Lif-Proteinen ist bis heute unbekannt. Die gängige Hypothese ist jedoch, daß Lif-Proteine ihre korrespondierenden Lipasen auf eine ähnliche Weise mit sterischen Informationen versorgen wie es bei Propeptiden bestimmter Proteasen der Fall ist.^[274]

Röntgenstrukturanalysen des Komplexes von LipH und LipA aus *Burkholderia glumae* offenbarten ein neuartiges α -helikales Gerüst, mit dem LipH wie eine Art „Kopfhörer“ auf der Lipase sitzt.^[281] In diesem Komplex besitzt die Lipase jedoch schon ihre katalytisch aktive Konformation, so daß keine Rückschlüsse auf den molekularen Mechanismus der Funktion von LipH zu ziehen sind. Abbildung 4.46 zeigt die Struktur der beiden Proteine im Komplex.

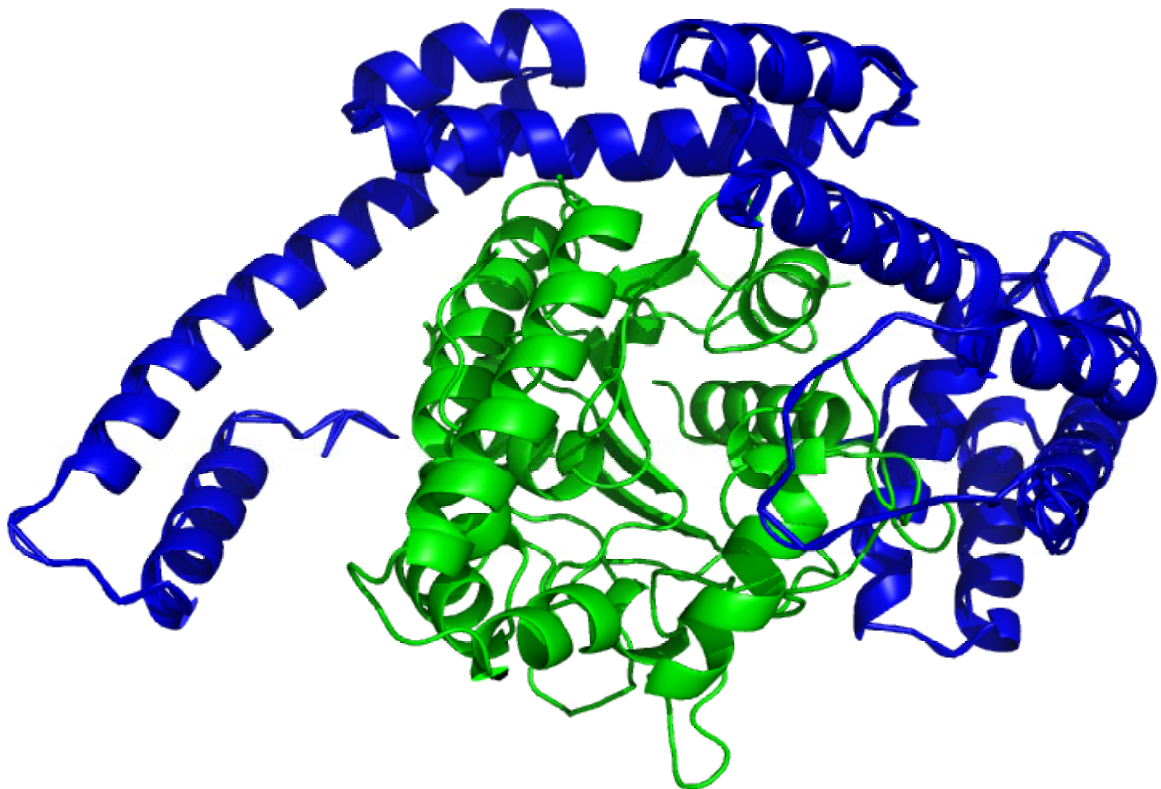


Abb. 4.46: Röntgenkristallstruktur der *B. glumae* Foldase LipH (blau) im Komplex mit ihrer korrespondierenden Lipase LipA (grün) (Abbildung modifiziert nach [281]).

Zur Klärung des molekularen Mechanismus der Funktion von LipH bedarf es Varianten, die LipA zwar noch binden, jedoch nicht mehr aktivieren können. Eine EstA*-vermittelte Zelloberflächenpräsentation der Foldase LipH könnte aufgrund der hohen Affinität der beiden Proteine zueinander die indirekte Präsentation der Lipase LipA ermöglichen, wenn diese in löslicher, ungefalteter Form zu LipH präsentierenden Zellen gegeben wird und auch nach

Aktivierung im Komplex auf der Zelloberfläche verbleibt. Damit wäre zwar keine Genotyp-Phänotyp-Kopplung zur Lipase gegeben, jedoch zur Foldase LipH. Dies würde die Erzeugung von LipH Bibliotheken ermöglichen und könnte zur Isolierung von LipH Varianten führen, die LipA zwar noch binden, jedoch nicht mehr aktivieren können. Abbildung 4.47 zeugt eine schematische Darstellung der geplanten indirekten Präsentation von LipA durch oberflächenexponiertes LipH.

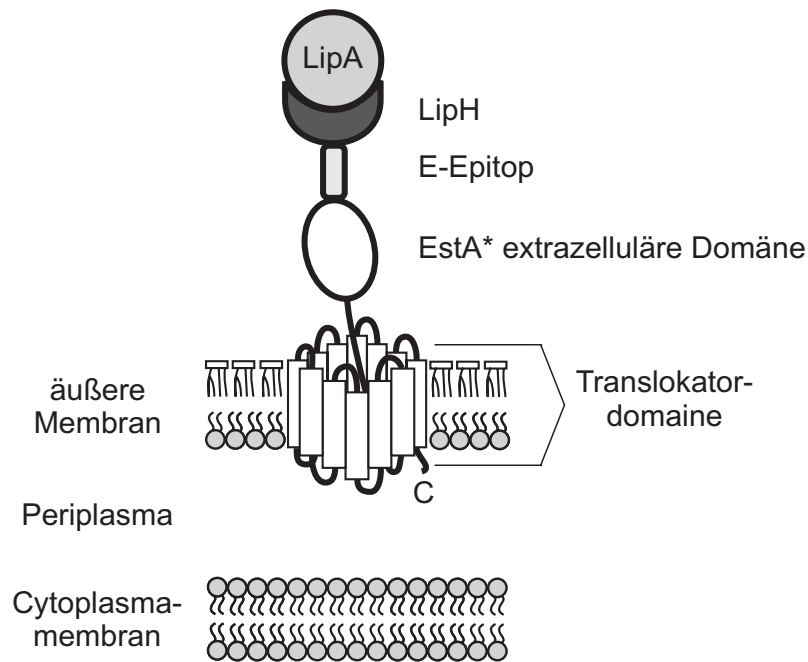


Abb. 4.47: Schematische Darstellung der geplanten indirekten Präsentation von LipA als Komplex mit LipH auf der *E. coli* Zelloberfläche.

Der folgende Abschnitt befasst sich mit dem Nachweis der Zelloberflächenpräsentation von LipH. Abschnitt 4.3.2 erläutert die Überprüfung einer indirekten Präsentation der Lipase LipA. In Abschnitt 4.3.3 werden Untersuchungen zur Aktivierung von LipA durch oberflächenpräsentiertes LipH beschrieben. Der Abschnitt 4.3.4 zeigt ein Anwendungsbeispiel für eine indirekte Präsentation anhand eines Modellexperiments.

4.3.1 Nachweis der Oberflächenpräsentation der *P. aeruginosa* Foldase LipH

Um eine Zelloberflächenpräsentation zu realisieren wurde die kodierende Sequenz der Foldase LipH über die *Sfi*I Erkennungsstellen in den Oberflächenpräsentationsvektor pEst100 (2.2.3) kloniert. *In vitro* Rückfaltungsexperimente zeigten, daß die aminoterminalen Membranankerhelix von LipH für eine Aktivierung von LipA nicht notwendig ist.^[274,275] Für die Klonierung wurde deshalb auf diesen Teil von LipH verzichtet. Das klonierte Fragment umfasste somit die kodierende Sequenz von 320 Aminosäuren von LipH. Die Klonierungsarbeiten wurden vollständig von Sebastian Buest am IMET in Jülich durchgeführt.^[278] Das resultierende Plasmid pEst100-LipH1 wurde im *E. coli* Expressionsstamm DH5 α freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zum Nachweis der Zelloberflächenpräsentation wurden induzierte Zellen von *E. coli* DH5 α (pEst100-LipH1) in zwei unterschiedlichen Ansätzen markiert mit anti-E-Epitop Antikörper (Fa. Amersham) und einem polyklonalen Kaninchen anti-LipH Serumantikörper (3.6.2). Als Kontrolle dienten jeweils Zellen ohne Oberflächenpräsentation (DH5 α (pBBR1MCS)). Die Analysen der Markierungen erfolgten durchflußzytometrisch (3.6.5). Die Histogramme sind in Abbildung 4.48 wiedergegeben.

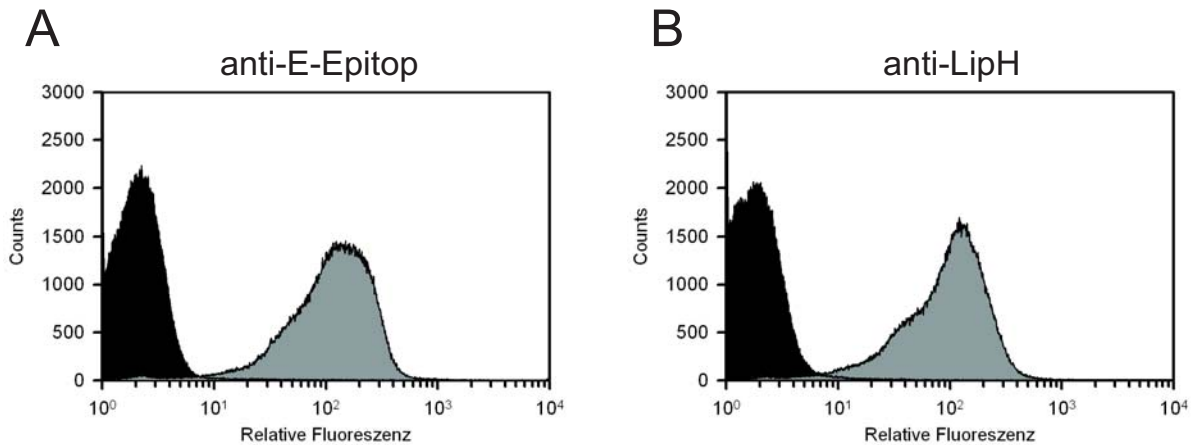


Abb. 4.48: Nachweis der Oberflächenpräsentation der *P. aeruginosa* Foldase LipH mittels anti-E-Epitop (A) und anti-LipH Antikörper (B), FACS Histogramme. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz pro Zellen und die Zellzahl (Counts). Markiert wurden LipH präsentierende Zellen (DH5 α (pEst100LipH1), grau). Als Kontrollen dienten Zellen ohne Oberflächenpräsenz (DH5 α (pBBR1MCS), schwarz) (Abbildung modifiziert nach [278]).

Abbildung 4.48 zeigt, daß die Oberflächenpräsentation von LipH mit beiden verwendeten Antikörpern nachgewiesen werden konnte. Die jeweiligen *Peak* Fluoreszenzen lagen bei 142 (anti-LipH Antikörper) und 150 (anti-E-Epitop Antikörper).

4.3.2 Nachweis der indirekten Präsentation der *P. aeruginosa* Lipase LipA

In vitro Rückfaltungsexperimente zeigten, daß LipH und LipA stabile Komplexe bilden, die sich durch Kopurifikation reinigen ließen.^[279,280] Unter der Voraussetzung, daß sich solche stabilen Komplexe auch mit oberflächenpräsentiertem LipH bilden lassen, sollte es möglich sein, LipA auf diese Weise indirekt auf der Zelloberfläche zu präsentieren (Abb. 4.47).

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden 300 μ l induzierte LipH präsentierende Zellen pelletiert (13000 Upm, 1 min, RT) und in 20 μ l PBS aufgenommen. Es erfolgte die Zugabe von 1 μ l ungefaltetem LipA (850 ng/ μ l in 8 M Harnstoff), gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Probe wurde anschließend mit 300 μ l PBS gewaschen und dann nach Standardprotokoll mit einem polyklonalen Kaninchen anti-LipA Antikörperserum markiert (3.6.2). Als Kontrolle erfolgte eine analoge Markierung, jedoch ohne die Zugabe von ungefaltetem LipA. Die Analysen der Proben erfolgten durchflußzytometrisch (3.6.5). In Abbildung 4.49 sind die Ergebnisse dargestellt.

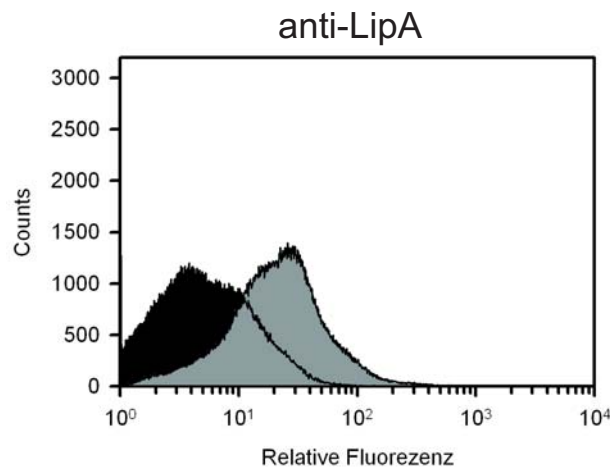


Abb. 4.49: Nachweis der indirekten Oberflächenpräsentation von *P. aeruginosa* LipA als Komplex mit LipH mittels anti-LipA Antikörper. FACS-Histogramme. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz pro Zelle und die Zellzahl (Counts). Markiert wurden LipH präsentierende Zellen (DH5 α (pEst100LipH1)) mit (grau) und ohne (schwarz) Inkubation mit ungefaltetem LipA (Abbildung modifiziert nach [278]).

Die Ergebnisse zeigen, daß sich LipA im Komplex mit LipH auf der Zelloberfläche nachweisen läßt. Die Zellen, die ohne Inkubation mit LipA markiert wurden zeigten zwar einen verhältnismäßig starken Hintergrund an unspezifischer Markierung, dies ist jedoch vermutlich auf die Anwesenheit *E. coli* spezifischer Antikörper in dem verwendeten anti-LipA Serum zurückzuführen.

4.3.3 Untersuchungen zur Aktivierung von LipA durch oberflächenpräsentiertes LipH

Die bisherigen Ergebnisse deuteten an, daß sich LipH als Fusionsprotein mit EstA* auf der Zelloberfläche präsentieren läßt und dabei seine Fähigkeit LipA zu binden nicht verliert. Zur Untersuchung, ob oberflächenpräsentiertes LipH auch noch in der Lage ist, LipA in eine katalytisch aktive Konformation zu überführen, wurde 1 ml LipH präsentierende Zellen mit einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,6 pelletiert (13000 Upm, 1 min, RT) und in 20 μ l PBS aufgenommen. Es erfolgte die Zugabe von 1 μ l ungefaltetem LipA (850 ng/ μ l in 8 M Harnstoff). Nach einer Inkubation von 60 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut pelletiert (13000 Upm, 1 min, RT), der Überstand abgenommen und in 980 μ l Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2, mit 10 mM MgSO₄) überführt. Die Bestimmung der esterolytischen Aktivität mit Oktansäure-p-Nitrophenylester als Substrat erfolgte gemäß Methode 3.5.2.2. Zur Bestimmung der esterolytischen Aktivität auf der Zelloberfläche wurde das Zellpellet nach der Inkubation mit LipA mit 300 μ l PBS gewaschen, zentrifugiert (13000 Upm, 1 min, RT) und in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2, mit 10 mM MgSO₄) resuspendiert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in diesem Fall nach Methode 3.5.2.1. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Oberflächenpräsentation (DH5 α (pBBR1MCS)), die auf analoge Weise behandelt wurden. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 4.50 dargestellt.

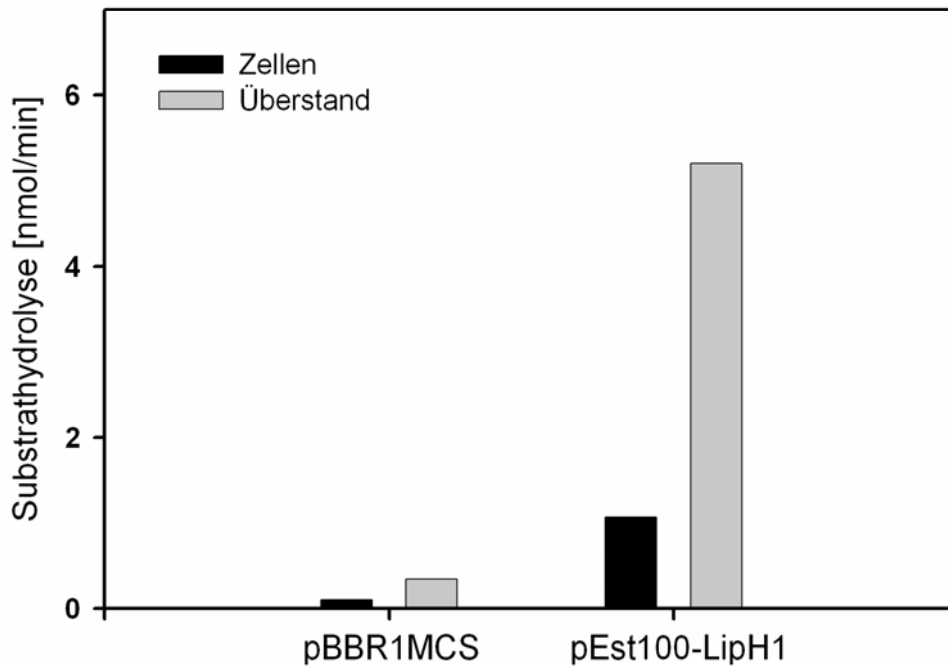


Abb. 4.50: Aktivierung der esterolytischen Aktivität von LipA durch oberflächenpräsentiertes LipH. Gemessen wurden Zellen (schwarz) und Überstände (grau) nach 1 Stunde Inkubation mit ungefaltetem LipA.

Die Ergebnisse der esterolytischen Untersuchungen zeigten, daß sich ungefaltetes LipA durch oberflächenpräsentiertes LipH in eine enzymatisch aktive Konformation überführen ließ. Obwohl auch auf den LipH präsentierenden Zellen esterolytische Aktivität nachzuweisen war, befand sich der Hauptanteil der zu detektierenden Aktivität im Überstand der Faltungsreaktion. Die Proben der Kontrollzellen zeigten dagegen kaum esterolytische Aktivität. Dies deutet daraufhin, daß LipA nicht nur aktiviert wird und in dieser Form im Komplex mit LipH auf der Zelloberfläche verbleibt, sondern nach abgeschlossener Faltung auch in das umgebende Medium entlassen wird.

4.3.4 Anwendungsbeispiel für die indirekte Präsentation von LipA

Welchen Nutzen kann nun die funktionale Präsentation einer bakteriellen Foldase und ihres Zielenzym in Form eines Komplexes auf der Zelloberfläche haben? Der molekulare Mechanismus der Aktivierung von LipA durch LipH ist heute noch wenig verstanden. Für eine detaillierte Untersuchung dieses Mechanismus würde eine Variante von LipH benötigt, die LipA zwar noch binden kann, jedoch nicht mehr in der Lage ist dieses zu aktivieren. Ein Vergleich der Struktur eines Komplexes aus einer solchen Variante und LipA im nah-nativen Zustand mit der bereits vorhandenen Struktur (in der LipA bereits im aktiven Zustand vorliegt) könnte wertvolle Informationen über die durch LipH induzierten strukturellen Veränderungen liefern. Zur Isolierung einer solchen Variante ist die Erzeugung großer LipH Bibliotheken nötig und ein Anreicherungsverfahren, das in der Lage ist, in einer ersten Phase sämtliche Varianten auszusortieren, welche die Fähigkeit mit LipA zu interagieren vollständig verloren haben. Für eine solche Strategie bedarf es jedoch einer adäquaten Genotyp-

Phänotyp-Kopplung und eines leistungsstarken Isolierungsverfahrens, das die Anreicherung interaktionsfähiger Varianten ermöglicht. Beide dieser Ansprüche werden durch die *E. coli* Zelloberflächenpräsentation von LipH erfüllt. Die Verankerung in der äußeren Zellmembran gewährleistet nicht nur eine effektive Genotyp-Phänotyp-Kopplung, der Nachweis der Komplexbildung von LipH und LipA auf der Zelloberfläche durch immunhistochemische Markierung sollte auch die Isolierung entsprechender Varianten ermöglichen.

In einem Modellexperiment wurden LipH präsentierende Zellen und Kontrollzellen (DH5 α (pBBR1MCS)) im Verhältnis 1:1000-Gemisch und wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben mit ungefaltetem LipA inkubiert, gefolgt von einer Markierung mit dem Kaninchen anti-LipA Serumantikörper (3.6.2). Als Positivkontrolle diente eine homogene Population LipH präsentierender Zellen. Anhand dieser wurde nach der durchflußzytometrischen Analyse ein Selektionsfenster definiert, welches zur Sortierung fluoreszierender Zellen im 1:1000-Gemisch verwendet wurde. Sortiert wurden insgesamt ca. $6,0 \times 10^7$ Zellen, ca. $6,9 \times 10^5$ wurden isoliert (3.6.5). Zur Überprüfung einer Anreicherung wurden die isolierten Zellen sowie das unsortierte Gemisch vermehrt und nach Induktion mit einem anti-E-Epitop Antikörper (Fa. Amersham) markiert (3.6.2). Die anschließende Analyse erfolgte ebenfalls durchflußzytometrisch. Die betreffenden Fluoreszenzemissionshistogramme sind in Abbildung 4.51 wiedergegeben.

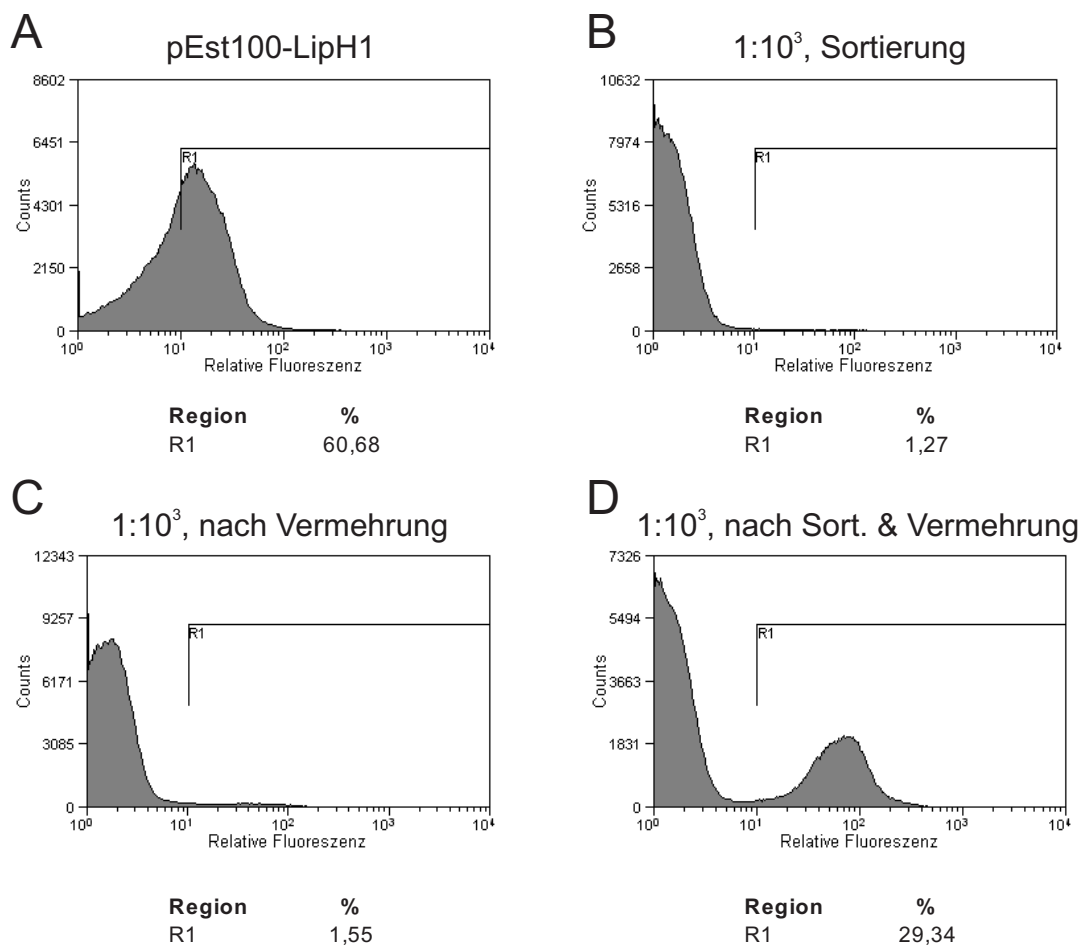


Abb. 4.51: Die Beschreibung befindet sich auf der nächsten Seite.

Abb. 4.51: (vorherige Seite) Sortierung eines 1:1000-Gemisches aus LipH präsentierenden Zellen und Kontrollzellen durch Inkubation mit ungefaltetem LipA und Markierung mit anti-LipA Antikörper (**B**). FACS-Histogramme. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz pro Zelle und die Zellzahl (*Counts*). Als Positivkontrolle diente eine homogene Kultur LipH präsentierender Zelle (**A**). Die Überprüfung der Anreicherung erfolgte nach Vermehrung des unsortierten Gemisches (**C**) und der isolierten Zellen (**D**) mittels anti-E-Epitop Antikörper.

Abbildung 4.51 zeigt, daß sich LipH präsentierende Zellen durch die Bindung von LipA in nur einer Runde anreichern ließen. Damit eröffnet dieses Experiment nun die Möglichkeit, zelloberflächenpräsentierte LipH Bibliotheken im Hinblick auf eine Interaktion mit LipA zu durchmustern.

4.3.5 Ergebnisse und Diskussion zur indirekten Zelloberflächenpräsentation von LipA

In den vorangegangenen Experimenten konnte am Beispiel der Foldase LipH aus *P. aeruginosa* erstmalig die funktionale Zelloberflächenpräsentation eines Lip Chaperons nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten daraufhin, daß LipH nicht nur auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen exponiert wird (Abb. 4.48), sondern dabei auch noch die Interaktionsfähigkeit zu seinem Zielenzym, der Lipase LipA, beibehält (Abb. 4.49). Enzymatische Untersuchungen konnten zusätzlich zeigen, daß LipA im Komplex mit LipH auf der Zelloberfläche in seine esterolytisch aktive Konformation überführt wird. Der Hauptanteil der esterolytischen Aktivität war dabei jedoch im Überstand der Faltungsreaktion zu finden (Abb. 4.50). Dies ist ein Indiz dafür, daß der Komplex aus LipH und LipA auf der Zelloberfläche nach vollendeter Faltung wieder dissoziiert. Dieser Befund bildet einen Widerspruch zu bisherigen *in vitro* Faltungsexperimenten, bei denen der Komplex auch nach der Aktivierung von LipA gebunden blieb.^[274,277] Da der Mechanismus der Aktivierung noch unverstanden ist, läßt sich diese Beobachtung nicht ohne weiteres erklären. Jedoch sollte berücksichtigt werden, daß es sich bei den hier beschriebenen Experimenten nicht um den LipH Wildtyp handelte, sondern um eine verkürzte Variante ohne die aminoternale Membranankerhelix. Es bleibt außerdem noch zu klären, warum nicht die gesamte esterolytische Aktivität im Überstand detektiert wurde, sondern ein Teil der LipA Moleküle offensichtlich in aktiver Konformation im Komplex auf der Zelloberfläche verblieb.

Durch eine immunhistochemische Quantifizierung konnte die Anzahl der präsentierten LipH-Moleküle pro Zelle auf 8100 bestimmt werden.^[278] Auf Basis dieser Bestimmung konnte zudem durch den Vergleich äquimolarer Mengen von präsentiertem und löslichem LipH in LipA-Rückfaltungsexperimenten gezeigt werden, daß die Faltungskinetiken in beiden Fällen ähnlich sind.^[278] Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß sich die Oberflächenpräsentation von LipH nicht negativ auf seine Funktion auswirkt.

Das erfolgreich durchgeführte Anreicherungsexperiment LipH präsentierender Zellen aus einem 1000-fachen Überschuss an Kontrollzellen durch die Detektion von oberflächen-gebundenem LipA (Abb. 4.51) eröffnet nun die Möglichkeit, große Bibliotheken zu durchmustern. Anwendungsbeispiele wären dabei jedoch nicht nur die Isolierung von LipH Varianten, die mit LipA noch interagieren, dieses aber nicht mehr aktivieren können.

Die Protease Subtilisin wird durch ein Propeptid aktiviert, das als molekulares Chaperon wirkt. Variationen innerhalb dieses Propeptids können zu veränderten katalytischen Eigenschaften der Protease führen. Dieser Effekt wurde als „*protein memory*“ bezeichnet und durch geringe strukturelle Änderungen während des Faltungsprozesses erklärt.^[282] Das in Kapitel 4.2 beschriebene zwei-Farben Markierungsverfahren mit enantiomeren Tyramidestern könnte demnach auch dazu verwendet werden, aus oberflächenpräsentierten LipH Bibliotheken solche Varianten zu isolieren, die in der Lage sind über die Faltung eine veränderte Enantioselektivität an LipA zu vermitteln.

Zudem eröffnet sich die Möglichkeit, oberflächenpräsentierte LipH Bibliotheken nach Varianten zu durchmustern, die in der Lage sind, mit heterologen Lipasen von biotechnologischer Relevanz zu interagieren und diese möglicherweise auch aktivieren. Normalerweise falten Lif-Proteine exklusiv ihr homologes Zielenzym.^[274] Ein Lif-Protein mit einem breitem Substratspektrum, welches in der Lage ist eine Vielzahl verschiedener Lipasen zu aktivieren wäre nicht nur von industriellem Interesse sondern könnte auch für die Faltung von Lipasevarianten aus Mutageneseexperimenten zu einem wichtigen Werkzeug werden, da letztere oftmals eine Vielzahl von Aminosäuresubstitutionen beinhalten, die unter Umständen die spezifische Interaktion mit dem entsprechenden Lif-Protein stören könnten.

Letztendlich könnten Foldase präsentierende Zellen auch grundsätzlich als „Ganz-Zell-Faltungsmediatoren“ eingesetzt werden, die durch geringen präparativen Aufwand und einfache Separation die Produktion großer Mengen enzymatisch aktiver Lipasen mit biotechnologischer Relevanz ermöglichen könnten.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Erprobung eines Hochdurchsatz-Durchmusterungsverfahrens zur Identifizierung und Isolierung von Varianten lipolytischer Enzyme mit veränderter Enantioselektivität. Es kombiniert die Zelloberflächenpräsentation lipolytischer Enzyme mit einer neuen Anreicherungs-methode und hat das Potential, die Identifizierung von Varianten mit gewünschten Eigenschaften erheblich zu beschleunigen.

Die Präsentation lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen wurde durch die rekombinante Produktion betreffender Enzyme als Fusionsproteine mit einer verkürzten, esterolytisch inaktiven Variante der *P. aeruginosa* Esterase EstA erreicht. Es konnte gezeigt werden, daß mit diesem Verfahren unterschiedliche Passagierproteine aus der Familie der Lipasen präsentiert werden können. Diese Art der rekombinanten Produktion schafft nicht nur eine effiziente Genotyp-Phänotyp-Kopplung zwischen einem Enzym und einem selbstreplizierenden „Partikel“ (Zelle), es ermöglicht außerdem die Immobilisierung des betreffenden Enzyms an einer festen Matrix (Zellwand) im extrazellulären Medium. Dadurch sind oberflächenpräsentierte Enzyme direkt für entsprechende Substrate zugänglich und einfach zu separieren, was sie für die organische Synthese zu nützlichen Werkzeugen als „Ganz-Zell-Biokatalysatoren“ macht.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Hochdurchsatz-Durchmusterungsverfahren basiert auf der spezifischen Markierung von *E. coli* Zellen, die Varianten lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche präsentieren. Diese Markierung geschieht als Folge einer Substrathydrolyse, wodurch die Aktivität und Substratspezifität einer präsentierten Enzymvariante in Form eines Fluoreszenzsignals auf Einzelzellbasis abgebildet werden kann. Die Nutzung durchflußzytometrischer Methoden gestattete die simultane Durchmusterung einer großen Anzahl von Varianten ($>10^7$). Der Einsatz der unterschiedlichen Enantiomere der 2-Methyldekansäure als Ester der „Markierungs-Substrate“ ermöglichte die Identifizierung und Isolierung von 5 Varianten der *P. aeruginosa* Esterase EstA mit invertierter Enantioselektivität aus zwei durch Zufallsmutagenese erzeugten Enzymbibliotheken von $6,8 \times 10^7$ und $4,0 \times 10^7$ Transformanten mit durchschnittlich 2 bzw. 4 Aminosäuresubstitutionen pro Enzym. Diese Bibliotheken wurden durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung durchmustert, und Varianten mit veränderter Enantioselektivität wurden angereichert. Die selektivste isolierte Variante unterschied sich dabei durch einen E_{Rapp} -Wert von 6,7 vom Wildtyp mit dem E_{Sapp} -Wert von 1,2. Durch Nukleotidsequenzanalysen dieser Varianten wurde eine für die Enantioselektivität von EstA entscheidende Position in der Aminosäuresequenz identifiziert. Die Sättigungsmutagenese dieser Position führte zur Isolierung einer Variante mit Inversion der Enantioselektivität und einem E_{Rtrue} -Wert von 15,5 bei 81 % *ee* und 38 % Umsatz.

Weiterhin konnte die in dieser Arbeit entwickelte Strategie, Proteine durch Exposition auf der bakteriellen Zelloberfläche einer direkten Funktionsabfrage zuzuführen auch auf den Nachweis der Protein-Protein Wechselwirkung der Lipase-spezifischen Foldase LipH aus *P. aeruginosa* mit der korrespondierenden Lipase LipA angewendet werden.

6. Literatur

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] **Braun, M., Teichert, O. und Zweck, A.**, Biokatalyse in der industriellen Produktion. *VDI, e. V., Technik und Wissenschaft*, Düsseldorf, 2006.
- [2] **Schoemaker, H. E., Mink, D. und Wubbolts, M. G.**, Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 2003. 299(5613): S. 1694-7.
- [3] **Dalby, P. A.**, Optimising enzyme function by directed evolution. *Curr Opin Struct Biol*, 2003. 13(4): S. 500-5.
- [4] **Miller, C. A.**, Advances in enzyme discovery technology: capturing diversity. *Inform*, 2000. 11(5): S. 489-95.
- [5] **Arnold, F. H. und Moore, J. C.**, Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1997. 58: S. 1-14.
- [6] **Schmidt-Dannert, C. und Arnold, F. H.**, Directed evolution of industrial enzymes. *Trends Biotechnol*, 1999. 17(4): S. 135-6.
- [7] **Turner, N. J.**, Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol*, 2003. 21(11): S. 474-8.
- [8] **Aharoni, A., Griffiths, A. D. und Tawfik, D. S.**, High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Curr Opin Chem Biol*, 2005. 9(2): S. 210-6.
- [9] **Boersma, Y. L., Dröge, M. J. und Quax, W. J.**, Selection strategies for improved biocatalysts. *Febs J*, 2007.
- [10] **Bornscheuer, U. T. und Kazlauskas, R. J.**, Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and Stereoselective Biotransformations, 1999, Wiley-VCH,
- [11] **Jaeger, K. E. und Eggert, T.**, Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2002. 13(4): S. 390-7.
- [12] **Liese, A., Seelbach, K. und Wandrey, C.**, Industrial biotransformations, 2000, Wiley-VCH, Weinheim.
- [13] **Brockerhoff, J. und Jensen, R. G.**, Lipolytic Enzymes, 1974, Academic Press, New York.
- [14] **Jensen, R. G., deJong, F. A. und Clark, R. M.**, Determination of lipase specificity. *Lipids*, 1983. 18(3): S. 239-52.
- [15] **Verger, R.**, "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol*, 1997. 15: S. 32-8.
- [16] **Sarda, L. und Desnuelle, P.**, Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. *Biochim Biophys Acta*, 1958. 30(3): S. 513-21.
- [17] **Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huges-Jensen, B., Norskov, L. und et al.**, A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 1990. 343(6260): S. 767-70.
- [18] **Winkler, F. K., D'Arcy, A. und Hunziker, W.**, Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 1990. 343(6260): S. 771-4.

- [19] **Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Høge-Jensen, B., Patkar, S. A. und Thim, L.**, A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, 1991. 351(6326): S. 491-4.
- [20] **Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M. und Derewenda, Z. S.**, Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*, 1992. 31(5): S. 1532-41.
- [21] **van Tilbeurgh, H., Egloff, M. P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. und Cambillau, C.**, Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 1993. 362(6423): S. 814-20.
- [22] **Eggert, T., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R. und Jaeger, K. E.**, A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur J Biochem*, 2000. 267(21): S. 6459-69.
- [23] **Eggert, T., van Pouderooyen, G., Dijkstra, B. W. und Jaeger, K. E.**, Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. *FEBS Lett*, 2001. 502(3): S. 89-92.
- [24] **Hjorth, A., Carriere, F., Cudrey, C., Woldike, H., Boel, E., Lawson, D. M., Ferrato, F., Cambillau, C., Dodson, G. G., Thim, L. und et al.**, A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase. *Biochemistry*, 1993. 32(18): S. 4702-7.
- [25] **Lesuisse, E., Schanck, K. und Colson, C.**, Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur J Biochem*, 1993. 216(1): S. 155-60.
- [26] **Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G. und Cambillau, C.**, *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, 1992. 356(6370): S. 615-8.
- [27] **van Pouderooyen, G., Eggert, T., Jaeger, K. E. und Dijkstra, B. W.**, The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *J Mol Biol*, 2001. 309(1): S. 215-26.
- [28] **Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K. E. und Dijkstra, B. W.**, Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem*, 2000. 275(40): S. 31219-25.
- [29] **Noble, M. E., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. und Frenken, L. G.**, The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett*, 1993. 331(1-2): S. 123-8.
- [30] **Thirstrup, K., Verger, R. und Carriere, F.**, Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. *Biochemistry*, 1994. 33(10): S. 2748-56.
- [31] **Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S. und Jones, T. A.**, The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 1994. 2(4): S. 293-308.
- [32] **van Oort, M. G., Deveer, A. M., Dijkman, R., Tjeenk, M. L., Verheij, H. M., de Haas, G. H., Wenzig, E. und Gotz, F.**, Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry*, 1989. 28(24): S. 9278-85.

- [33] **Jaeger, K. E., Adrian, F. J., Meyer, H. E., Hancock, R. E. und Winkler, U. K.**, Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* is an amphiphilic protein. *Biochim Biophys Acta*, 1992. 1120(3): S. 315-21.
- [34] **Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J. und et al.**, The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*, 1992. 5(3): S. 197-211.
- [35] **Bornscheuer, U. T.**, Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev*, 2002. 26(1): S. 73-81.
- [36] **Nardini, M. und Dijkstra, B. W.**, Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol*, 1999. 9(6): S. 732-7.
- [37] **Liao, D. I. und Remington, S. J.**, Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution. A new class of serine proteinase. *J Biol Chem*, 1990. 265(12): S. 6528-31.
- [38] **Franken, S. M., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H. und Dijkstra, B. W.**, Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes. *Embo J*, 1991. 10(6): S. 1297-302.
- [39] **Zou, J., Hallberg, B. M., Bergfors, T., Oesch, F., Arand, M., Mowbray, S. L. und Jones, T. A.**, Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases. *Structure*, 2000. 8(2): S. 111-22.
- [40] **Pathak, D. und Ollis, D.**, Refined structure of dienelactone hydrolase at 1.8 Å. *J Mol Biol*, 1990. 214(2): S. 497-525.
- [41] **Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. und Silman, I.**, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 1991. 253(5022): S. 872-9.
- [42] **Kazlauskas, R. J.**, Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnol*, 1994. 12(11): S. 464-72.
- [43] **Lang, D. A., Manesse, M. L., de Haas, G. H., Verheij, H. M. und Dijkstra, B. W.**, Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur J Biochem*, 1998. 254(2): S. 333-40.
- [44] **Schrag, J. D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H. J., Schmid, R., Schomburg, D., Rydel, T. J., Oliver, J. D., Strickland, L. C., Dunaway, C. M., Larson, S. B., Day, J. und McPherson, A.**, The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure*, 1997. 5(2): S. 187-202.
- [45] **Derewenda, Z. S.**, Structure and function of lipases. *Adv Protein Chem*, 1994. 45: S. 1-52.
- [46] **Egloff, M. P., Marguet, F., Buono, G., Verger, R., Cambillau, C. und van Tilbeurgh, H.**, The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. *Biochemistry*, 1995. 34(9): S. 2751-62.
- [47] **Grochulski, P., Bouthillier, F., Kazlauskas, R. J., Serreqi, A. N., Schrag, J. D., Ziomek, E. und Cygler, M.**, Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry*, 1994. 33(12): S. 3494-500.

-
- [48] **Longhi, S., Czjzek, M., Lamzin, V., Nicolas, A. und Cambillau, C.**, Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. *J Mol Biol*, 1997. 268(4): S. 779-99.
- [49] **Verschuere, K. H., Seljee, F., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H. und Dijkstra, B. W.**, Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature*, 1993. 363(6431): S. 693-8.
- [50] **Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. und Reetz, M. T.**, Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol*, 1999. 53: S. 315-51.
- [51] **Godfrey, T. und West, S.**, Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry, 2. Ed., 1996, Stockton, New York.
- [52] **Jaeger, K. E. und Reetz, M. T.**, Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 1998. 16(9): S. 396-403.
- [53] **Coleman, M. H. und Macrae, A. E.**, Patent No. 1577933, U.K., 1980.
- [54] **Lie, E. und Molin, G.**, Conversion of low grade fats by biological means., In: *Bioconversion of waste material to industrial products*, A. M. Martin. 1991, Elsevier Applied Science,
- [55] **Boland, W., Fröbl, C. und Lorenz, M.**, Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. *Synthesis*, 1991. 12: S. 1049-72.
- [56] **Drauz, K. und Waldmann, H.**, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook., Vol. 1, 2, 1995, VCH, New York.
- [57] **Faber, K.**, Biotransformation in Organic Chemistry., 1997, Springer-Verlag, Berlin.
- [58] **Schmid, R. D. und Verger, R.**, Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1998. 37: S. 1608-33.
- [59] **Stecher, H. und Faber, K.**, Biocatalytic deracemization techniques. Dynamic resolution and stereoinversions. *Synthesis*, 1997. 1: S. 1-16.
- [60] **Falconnier, B., Lapiere, C., Lesage-Meessen, G., Yonnet, G., Brunerie, P., Colonna-Ceccaldi, B., Corrieu, G. und Asther, M.**, Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: identification of metabolic pathways. *J Biotechnol*, 1994. 37: S. 123-32.
- [61] **Gasson, M. J., Kitamura, Y., McLauchlan, W. R., Narbad, A., Parr, A. J., Parsons, E. L., Payne, J., Rhodes, M. J. und Walton, N. J.**, Metabolism of ferulic acid to vanillin. A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester. *J Biol Chem*, 1998. 273(7): S. 4163-70.
- [62] **Lesage-Meessen, L., Delattre, M., Haon, M., Thibault, J. F., Ceccaldi, B. C., Brunerie, P. und Asther, M.**, A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biotechnol*, 1996. 50(2-3): S. 107-13.
- [63] **Blum, D. L., Kataeva, I. A., Li, X. L. und Ljungdahl, L. G.**, Feruloyl esterase activity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ. *J Bacteriol*, 2000. 182(5): S. 1346-51.

- [64] **Christov, L. P. und Prior, B. A.**, Esterases of xylan-degrading microorganisms: production, properties, and significance. *Enzyme Microb Technol*, 1993. 15(6): S. 460-75.
- [65] **de Vries, R. P. und Visser, J.**, Regulation of the feruloyl esterase (faeA) gene from *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol*, 1999. 65(12): S. 5500-3.
- [66] **Donaghy, J. und McKay, A. M.**, Purification and characterization of a feruloyl esterase from the fungus *Penicillium expansum*. *J Appl Microbiol*, 1997. 83(6): S. 718-26.
- [67] **Kroon, P. A., Williamson, G., Fish, N. M., Archer, D. B. und Belshaw, N. J.**, A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *Eur J Biochem*, 2000. 267(23): S. 6740-52.
- [68] **Zock, J., Cantwell, C., Swartling, J., Hodges, R., Pohl, T., Sutton, K., Rosteck, P., Jr., McGilvray, D. und Queener, S.**, The *Bacillus subtilis* pnbA gene encoding p-nitrobenzyl esterase: cloning, sequence and high-level expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 1994. 151(1-2): S. 37-43.
- [69] **Patel, R. N.**, Stereoselective Biocatalysis, 2000, Marcel Dekker, New York.
- [70] **Sheldon, R. A.**, Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds, 1993, Marcel Dekker, New York.
- [71] **Stinson, S. C.**, Chiral Chemistry. *Chem Eng News*, 2001. 79: S. 45-57.
- [72] **Wong, C.-H. und Whitesides, G. M.**, Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, 1994, Pergamon Press, Oxford.
- [73] **Somers, G. S.**, Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*, 1962. 1: S. 912-3.
- [74] **Shibatani, T., Nakamichi, K. und Matsumae, H.**, Patent No. EP 362556, European Patent Application, 1990.
- [75] **Quax, W. J. und Broekhuizen, C. P.**, Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994. 41(4): S. 425-31.
- [76] **Azzolina, O., Collina, S. und Vercesi, D.**, Stereoselective hydrolysis by esterase: a strategy for resolving 2-(R,R'-phenoxy)propionyl ester Racemates. *Il Farmaco*, 1995. 50: S. 725-33.
- [77] **Azzolina, O., Vercesi, D., Collina, S. und Ghislandi, V.**, Chiral resolution of methyl 2-aryloxypropionates by biocatalytic stereospecific hydrolysis. *Il Farmaco*, 1995. 50: S. 221-6.
- [78] **Mustranta, A.**, Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992. 38(1): S. 61-6.
- [79] **Nishizawa, M., Gomi, H. und Kishimoto, F.**, Purification and some properties of carboxylesterase from *Arthobacter globiformis*; stereoselective hydrolysis of ethyl chrysanthemate. *Biosci Biotech Biochem*, 1993. 57: S. 594-8.
- [80] **Nishizawa, M., Shimizu, M., Ohkawa, H. und Kanaoka, M.**, Stereoselective production of (+)-trans-chrysanthemic acid by a microbial esterase: cloning, nucleotide sequence, and overexpression of the esterase gene of *Arthrobacter globiformis* in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1995. 61(9): S. 3208-15.

- [81] **Powell, K. A., Ramer, S. W., Del Cardayre, S. B., Stemmer, W. P., Tobin, M. B., Longchamp, P. F. und Huisman, G. W.**, Directed Evolution and Biocatalysis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2001. 40(21): S. 3948-59.
- [82] **Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. und Witholt, B.**, Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001. 409(6817): S. 258-68.
- [83] **Straathof, A. J., Panke, S. und Schmid, A.**, The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol*, 2002. 13(6): S. 548-56.
- [84] **Dalboge, H. und Lange, L.**, Using molecular techniques to identify new microbial biocatalysts. *Trends Biotechnol*, 1998. 16(6): S. 265-72.
- [85] **Ogawa, J. und Shimizu, S.**, Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Trends Biotechnol*, 1999. 17(1): S. 13-21.
- [86] **Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M. und Keller, M.**, Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(24): S. 15681-6.
- [87] **Marrs, B., Delagrave, S. und Murphy, D.**, Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Curr Opin Microbiol*, 1999. 2(3): S. 241-5.
- [88] **Pabo, C.**, Molecular technology. Designing proteins and peptides. *Nature*, 1983. 301(5897): S. 200.
- [89] **Ulmer, K. M.**, Protein engineering. *Science*, 1983. 219(4585): S. 666-71.
- [90] **Bornscheuer, U. T. und Pohl, M.**, Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Chem Biol*, 2001. 5(2): S. 137-43.
- [91] **Jaeger, K. E., Eggert, T., Eipper, A. und Reetz, M. T.**, Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001. 55(5): S. 519-30.
- [92] **Jaeger, K. E. und Reetz, M. T.**, Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr Opin Chem Biol*, 2000. 4(1): S. 68-73.
- [93] **Petrounia, I. P. und Arnold, F. H.**, Designed evolution of enzymatic properties. *Curr Opin Biotechnol*, 2000. 11(4): S. 325-30.
- [94] **Arnold, F. H.**, Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, 2001. 409(6817): S. 253-7.
- [95] **Cedrone, F., Menez, A. und Quemeneur, E.**, Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Curr Opin Struct Biol*, 2000. 10(4): S. 405-10.
- [96] **Craik, C. S., Largman, C., Fletcher, T., Rocznik, S., Barr, P. J., Fletterick, R. und Rutter, W. J.**, Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. *Science*, 1985. 228(4697): S. 291-7.
- [97] **Russell, A. J. und Fersht, A. R.**, Rational modification of enzyme catalysis by engineering surface charge. *Nature*, 1987. 328(6130): S. 496-500.
- [98] **Quemeneur, E., Moutiez, M., Charbonnier, J. B. und Menez, A.**, Engineering cyclophilin into a proline-specific endopeptidase. *Nature*, 1998. 391(6664): S. 301-4.
- [99] **Pettersson, P. L., Johansson, A. S. und Mannervik, B.**, Transmutation of human glutathione transferase A2-2 with peroxidase activity into an efficient steroid isomerase. *J Biol Chem*, 2002. 277(33): S. 30019-22.

- [100] **Branneby, C., Carlqvist, P., Magnusson, A., Hult, K., Brinck, T. und Berglund, P.**, Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes. *J Am Chem Soc*, 2003. 125(4): S. 874-5.
- [101] **Chen-Goodspeed, M., Sogorb, M. A., Wu, F. und Raushel, F. M.**, Enhancement, relaxation, and reversal of the stereoselectivity for phosphotriesterase by rational evolution of active site residues. *Biochemistry*, 2001. 40(5): S. 1332-9.
- [102] **Rotticci, D., Rotticci-Mulder, J. C., Denman, S., Norin, T. und Hult, K.**, Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering. *Chembiochem*, 2001. 2(10): S. 766-70.
- [103] **Scheib, H., Pleiss, J., Stadler, P., Kovac, A., Potthoff, A. P., Haalck, L., Spener, F., Paltauf, F. und Schmid, R. D.**, Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triradylglycerols. *Protein Eng*, 1998. 11(8): S. 675-82.
- [104] **Hult, K. und Berglund, P.**, Engineered enzymes for improved organic synthesis. *Curr Opin Biotechnol*, 2003. 14(4): S. 395-400.
- [105] **Kazlauskas, R. J.**, Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Curr Opin Chem Biol*, 2000. 4(1): S. 81-8.
- [106] **Kuchner, O. und Arnold, F. H.**, Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol*, 1997. 15(12): S. 523-30.
- [107] **Kaur, J. und Sharma, R.**, Directed evolution: an approach to engineer enzymes. *Crit Rev Biotechnol*, 2006. 26(3): S. 165-99.
- [108] **Arnold, F. H. und A., V. A.**, Design by directed evolution. *Acc Chem Res*, 1998. 31: S. 125-31.
- [109] **Reetz, M. T.**, Changing the enantioselectivity of enzymes by directed evolution. *Methods Enzymol*, 2004. 388: S. 238-56.
- [110] **Reetz, M. T.**, Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: practical and theoretical ramifications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(16): S. 5716-22.
- [111] **Sutherland, J. D.**, Evolutionary optimisation of enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 2000. 4(3): S. 263-9.
- [112] **Tobin, M. B., Gustafsson, C. und Huisman, G. W.**, Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design. *Curr Opin Struct Biol*, 2000. 10(4): S. 421-7.
- [113] **Mills, D. R., Peterson, R. L. und Spiegelman, S.**, An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1967. 58(1): S. 217-24.
- [114] **Roberts, B. L., Markland, W., Ley, A. C., Kent, R. B., White, D. W., Guterman, S. K. und Ladner, R. C.**, Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(6): S. 2429-33.
- [115] **Arnold, F. H. und Volkov, A. A.**, Directed evolution of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol*, 1999. 3(1): S. 54-9.
- [116] **Chirumamilla, R. R., Muralidhar, R., Marchant, R. und Nigam, P.**, Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Mol Cell Biochem*, 2001. 224(1-2): S. 159-68.

-
- [117] **Chen, K. und Arnold, F. H.**, Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(12): S. 5618-22.
- [118] **You, L. und Arnold, F. H.**, Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng*, 1996. 9(1): S. 77-83.
- [119] **Song, J. K. und Rhee, J. S.**, Enhancement of stability and activity of phospholipase A(1) in organic solvents by directed evolution. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1547(2): S. 370-8.
- [120] **Moore, J. C. und Arnold, F. H.**, Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nat Biotechnol*, 1996. 14(4): S. 458-67.
- [121] **Moore, J. C., Jin, H. M., Kuchner, O. und Arnold, F. H.**, Strategies for the in vitro evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. *J Mol Biol*, 1997. 272(3): S. 336-47.
- [122] **Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P. O. und Arnold, F. H.**, Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(22): S. 12809-13.
- [123] **Zhao, H. und Arnold, F. H.**, Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Eng*, 1999. 12(1): S. 47-53.
- [124] **Kim, Y. W., Choi, J. H., Kim, J. W., Park, C., Kim, J. W., Cha, H., Lee, S. B., Oh, B. H., Moon, T. W. und Park, K. H.**, Directed evolution of *Thermus* maltogenic amylase toward enhanced thermal resistance. *Appl Environ Microbiol*, 2003. 69(8): S. 4866-74.
- [125] **Song, J. K. und Rhee, J. S.**, Simultaneous enhancement of thermostability and catalytic activity of phospholipase A(1) by evolutionary molecular engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2000. 66(3): S. 890-4.
- [126] **Salazar, O., Cirino, P. C. und Arnold, F. H.**, Thermostabilization of a cytochrome p450 peroxygenase. *Chembiochem*, 2003. 4(9): S. 891-3.
- [127] **Zhang, N., Suen, W. C., Windsor, W., Xiao, L., Madison, V. und Zaks, A.**, Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Protein Eng*, 2003. 16(8): S. 599-605.
- [128] **Zhang, J. H., Dawes, G. und Stemmer, W. P.**, Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(9): S. 4504-9.
- [129] **Takato, Y., Shinya, O. und Hiroyuki, K.**, Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95: S. 5511-5.
- [130] **Iffland, A., Gendreizig, S., Tafelmeyer, P. und Johnsson, K.**, Changing the substrate specificity of cytochrome c peroxidase using directed evolution. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 286(1): S. 126-32.
- [131] **Otten, L. G., Sio, C. F., Vrieling, J., Cool, R. H. und Quax, W. J.**, Altering the substrate specificity of cephalosporin acylase by directed evolution of the Beta - subunit. *J Biol Chem*, 2002. 277(44): S. 42121-7.
-

- [132] **Reetz, M. T., Carballeira, J. D., Peyralans, J., Hobenreich, H., Maichele, A. und Vogel, A.**, Expanding the substrate scope of enzymes: combining mutations obtained by CASTing. *Chemistry*, 2006. 12(23): S. 6031-8.
- [133] **Black, M. E., Newcomb, T. G., Wilson, H. M. und Loeb, L. A.**, Creation of drug-specific herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(8): S. 3525-9.
- [134] **Stemmer, W. P.**, Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 1994. 370(6488): S. 389-91.
- [135] **Fong, S., Machajewski, T. D., Mak, C. C. und Wong, C.**, Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D- and L-sugars. *Chem Biol*, 2000. 7(11): S. 873-83.
- [136] **Wada, M., Hsu, C. C., Franke, D., Mitchell, M., Heine, A., Wilson, I. und Wong, C. H.**, Directed evolution of N-acetylneuraminic acid aldolase to catalyze enantiomeric aldol reactions. *Bioorg Med Chem*, 2003. 11(9): S. 2091-8.
- [137] **Williams, G. J., Domann, S., Nelson, A. und Berry, A.**, Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(6): S. 3143-8.
- [138] **Carr, R., Alexeeva, M., Enright, A., Eve, T. S., Dawson, M. J. und Turner, N. J.**, Directed evolution of an amine oxidase possessing both broad substrate specificity and high enantioselectivity. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003. 42(39): S. 4807-10.
- [139] **Matcham, G. W. und Bowen, A. R. S.**, Biocatalysis for chiral intermediates: meeting commercial and technical challenges. *Chem Today*, 1996. 14: S. 20-4.
- [140] **Reetz, M. T., Daligault, F., Brunner, B., Hinrichs, H. und Deege, A.**, Directed evolution of cyclohexanone monooxygenases: enantioselective biocatalysts for the oxidation of prochiral thioethers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. 43(31): S. 4078-81.
- [141] **Reetz, M. T., Torre, C., Eipper, A., Lohmer, R., Hermes, M., Brunner, B., Maichele, A., Bocola, M., Arand, M., Cronin, A., Genzel, Y., Archelas, A. und Furstoss, R.**, Enhancing the enantioselectivity of an epoxide hydrolase by directed evolution. *Org Lett*, 2004. 6(2): S. 177-80.
- [142] **van Loo, B., Spelberg, J. H., Kingma, J., Sonke, T., Wubbolts, M. G. und Janssen, D. B.**, Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling. *Chem Biol*, 2004. 11(7): S. 981-90.
- [143] **May, O., Nguyen, P. T. und Arnold, F. H.**, Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat Biotechnol*, 2000. 18(3): S. 317-20.
- [144] **DeSantis, G., Wong, K., Farwell, B., Chatman, K., Zhu, Z., Tomlinson, G., Huang, H., Tan, X., Bibbs, L., Chen, P., Kretz, K. und Burk, M. J.**, Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through gene site saturation mutagenesis (GSSM). *J Am Chem Soc*, 2003. 125(38): S. 11476-7.
- [145] **Kazlauskas, R. J. und Bornscheuer, U. T.**, Biotransformations with Lipases., In: *Biotransformations I*, 2. Ed., D. R. Kelly. 1998, Wiley-VCH, Weinheim, S. 37-191
- [146] **Henke, E. und Bornscheuer, U. T.**, Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error-prone PCR or a mutator

- strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay. *Biol Chem*, 1999. 380(7-8): S. 1029-33.
- [147] **Reetz, M. T., Zonta, A., Schimossek, K., Jaeger, K. E. und Liebeton, K.**, Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1997. 40: S. 3589-91.
- [148] **Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. und Jaeger, K. E.**, Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem Biol*, 2000. 7(9): S. 709-18.
- [149] **Stemmer, W. P.**, DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(22): S. 10747-51.
- [150] **Cramer, A. und Stemmer, W. P.**, Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wild-type sequences. *Biotechniques*, 1995. 18(2): S. 194-6.
- [151] **Reetz, M. T., Wilensek, S., Zha, D. und Jaeger, K. E.**, Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2001. 40(19): S. 3589-91.
- [152] **Zha, D., Wilensek, S., Hermes, M., Jaeger, K. E. und Reetz, M. T.**, Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Chem Commun*, 2001. 24: S. 2664-5.
- [153] **Koga, Y., Kato, K., Nakano, H. und Yamane, T.**, Inverting enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* KWI-56 lipase by combinatorial mutation and high-throughput screening using single-molecule PCR and in vitro expression. *J Mol Biol*, 2003. 331(3): S. 585-92.
- [154] **Ivancic, M., Valinger, G., Gruber, K. und Schwab, H.**, Inverting enantioselectivity of *Burkholderia gladioli* esterase EstB by directed and designed evolution. *J Biotechnol*, 2007. 129(1): S. 109-22.
- [155] **Arnold, F. H.**, Directed evolution: creating biocatalysts for the future. *Chem Eng Sci*, 1996. 51: S. 5091-102.
- [156] **Shafikhani, S., Siegel, R. A., Ferrari, E. und Schellenberger, V.**, Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization. *Biotechniques*, 1997. 23(2): S. 304-10.
- [157] **Suzuki, M., Christians, F. C., Kim, B., Skandalis, A., Black, M. E. und Loeb, L. A.**, Tolerance of different proteins for amino acid diversity. *Mol Divers*, 1996. 2(1-2): S. 111-8.
- [158] **Drummond, D. A., Iverson, B. L., Georgiou, G. und Arnold, F. H.**, Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins. *J Mol Biol*, 2005. 350(4): S. 806-16.
- [159] **Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C. und Pluckthun, A.**, In vitro display technologies: novel developments and applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2001. 12(4): S. 400-5.
- [160] **Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H. R. und Pluckthun, A.**, Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(24): S. 14130-5.

- [161] **Hanes, J. und Pluckthun, A.**, In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(10): S. 4937-42.
- [162] **Roberts, R. W. und Szostak, J. W.**, RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(23): S. 12297-302.
- [163] **Wilson, D. S., Keefe, A. D. und Szostak, J. W.**, The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(7): S. 3750-5.
- [164] **Doi, N. und Yanagawa, H.**, STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries in vitro. *FEBS Lett*, 1999. 457(2): S. 227-30.
- [165] **Ghadessy, F. J., Ong, J. L. und Holliger, P.**, Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(8): S. 4552-7.
- [166] **Griffiths, A. D. und Tawfik, D. S.**, Man-made enzymes--from design to in vitro compartmentalisation. *Curr Opin Biotechnol*, 2000. 11(4): S. 338-53.
- [167] **Tawfik, D. S. und Griffiths, A. D.**, Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol*, 1998. 16(7): S. 652-6.
- [168] **Clackson, T. und Wells, J. A.**, In vitro selection from protein and peptide libraries. *Trends Biotechnol*, 1994. 12(5): S. 173-84.
- [169] **Dröge, M. J., Boersma, Y. L., van Pouderooyen, G., Vrenken, T. E., Ruggeberg, C. J., Reetz, M. T., Dijkstra, B. W. und Quax, W. J.**, Directed evolution of *Bacillus subtilis* lipase A by use of enantiomeric phosphonate inhibitors: crystal structures and phage display selection. *Chembiochem*, 2006. 7(1): S. 149-57.
- [170] **Sieber, V., Pluckthun, A. und Schmid, F. X.**, Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nat Biotechnol*, 1998. 16(10): S. 955-60.
- [171] **Vanwetswinkel, S., Avalle, B. und Fastrez, J.**, Selection of beta-lactamases and penicillin binding mutants from a library of phage displayed TEM-1 beta-lactamase randomly mutated in the active site omega-loop. *J Mol Biol*, 2000. 295(3): S. 527-40.
- [172] **Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. und Hoogenboom, H. R.**, Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: S. 433-55.
- [173] **Lee, S. Y., Choi, J. H. und Xu, Z.**, Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol*, 2003. 21(1): S. 45-52.
- [174] **Samuelson, P., Gunneriusson, E., Nygren, P. A. und Stahl, S.**, Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol*, 2002. 96(2): S. 129-54.
- [175] **Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M. und Tommassen, J.**, Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science*, 2003. 299(5604): S. 262-5.
- [176] **Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T. J. und Kahne, D.**, Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell*, 2005. 121(2): S. 235-45.
- [177] **Francisco, J. A., Earhart, C. F. und Georgiou, G.**, Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(7): S. 2713-7.
- [178] **Christmann, A., Walter, K., Wentzel, A., Kratzner, R. und Kolmar, H.**, The cystine knot of a squash-type protease inhibitor as a structural scaffold for *Escherichia*

- coli* cell surface display of conformationally constrained peptides. *Protein Eng*, 1999. 12(9): S. 797-806.
- [179] **Wentzel, A., Christmann, A., Adams, T. und Kolmar, H.**, Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA. *J Bacteriol*, 2001. 183(24): S. 7273-84.
- [180] **Jung, H. C., Lebeault, J. M. und Pan, J. G.**, Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat Biotechnol*, 1998. 16(6): S. 576-80.
- [181] **Jung, H. C., Park, J. H., Park, S. H., Lebeault, J. M. und Pan, J. G.**, Expression of carboxymethylcellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. *Enzyme Microb Technol*, 1998. 22(5): S. 348-54.
- [182] **Bingle, W. H., Nomellini, J. F. und Smit, J.**, Cell-surface display of a *Pseudomonas aeruginosa* strain K pilin peptide within the paracrystalline S-layer of *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*, 1997. 26(2): S. 277-88.
- [183] **Stentebjerg-Olesen, B., Pallesen, L., Jensen, L. B., Christiansen, G. und Klemm, P.**, Authentic display of a cholera toxin epitope by chimeric type 1 fimbriae: effects of insert position and host background. *Microbiology*, 1997. 143 (Pt 6): S. 2027-38.
- [184] **Westerlund-Wikstrom, B.**, Peptide display on bacterial flagella: principles and applications. *Int J Med Microbiol*, 2000. 290(3): S. 223-30.
- [185] **Lee, V. T. und Schneewind, O.**, Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev*, 2001. 15(14): S. 1725-52.
- [186] **Kornacker, M. G. und Pugsley, A. P.**, The normally periplasmic enzyme beta-lactamase is specifically and efficiently translocated through the *Escherichia coli* outer membrane when it is fused to the cell-surface enzyme pullulanase. *Mol Microbiol*, 1990. 4(7): S. 1101-9.
- [187] **Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. und Ala'Aldeen, D.**, Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. 68(4): S. 692-744.
- [188] **Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. und Meyer, T. F.**, Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*, 1987. 325(6103): S. 458-62.
- [189] **Klauser, T., Kramer, J., Otzelberger, K., Pohlner, J. und Meyer, T. F.**, Characterization of the *Neisseria* Iga beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *J Mol Biol*, 1993. 234(3): S. 579-93.
- [190] **Loveless, B. J. und Saier, M. H., Jr.**, A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol Membr Biol*, 1997. 14(3): S. 113-23.
- [191] **Hendrixson, D. R., de la Morena, M. L., Stathopoulos, C. und St Geme, J. W., 3rd**, Structural determinants of processing and secretion of the *Haemophilus influenzae* hap protein. *Mol Microbiol*, 1997. 26(3): S. 505-18.
- [192] **Oliver, D. C., Huang, G. und Fernandez, R. C.**, Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter. *J Bacteriol*, 2003. 185(2): S. 489-95.

-
- [193] **Oliver, D. C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S. und Fernandez, R. C.**, A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol*, 2003. 47(5): S. 1367-83.
- [194] **Mogensen, J. E., Tapadar, D., Schmidt, M. A. und Otzen, D. E.**, Barriers to folding of the transmembrane domain of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *Biochemistry*, 2005. 44(11): S. 4533-45.
- [195] **Ohnishi, Y., Nishiyama, M., Horinouchi, S. und Beppu, T.**, Involvement of the COOH-terminal pro-sequence of *Serratia marcescens* serine protease in the folding of the mature enzyme. *J Biol Chem*, 1994. 269(52): S. 32800-6.
- [196] **Velarde, J. J. und Nataro, J. P.**, Hydrophobic residues of the autotransporter EspP linker domain are important for outer membrane translocation of its passenger. *J Biol Chem*, 2004. 279(30): S. 31495-504.
- [197] **Rutherford, N. und Mourez, M.**, Surface display of proteins by gram-negative bacterial autotransporters. *Microb Cell Fact*, 2006. 5: S. 22.
- [198] **Oomen, C. J., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J. und Gros, P.**, Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J*, 2004. 23(6): S. 1257-66.
- [199] **Klauser, T., Pohlner, J. und Meyer, T. F.**, Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *Embo J*, 1990. 9(6): S. 1991-9.
- [200] **Klauser, T., Pohlner, J. und Meyer, T. F.**, Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport. *Embo J*, 1992. 11(6): S. 2327-35.
- [201] **Maurer, J., Jose, J. und Meyer, T. F.**, Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1997. 179(3): S. 794-804.
- [202] **Jose, J. und von Schwichow, S.**, Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *Chembiochem*, 2004. 5(4): S. 491-9.
- [203] **Suzuki, T., Lett, M. C. und Sasakawa, C.**, Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J Biol Chem*, 1995. 270(52): S. 30874-80.
- [204] **Zhu, C., Ruiz-Perez, F., Yang, Z., Mao, Y., Hackethal, V. L., Greco, K. M., Choy, W., Davis, K., Butters, J. R. und Boedeker, E. C.**, Delivery of heterologous protein antigens via hemolysin or autotransporter systems by an attenuated ler mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vaccine*, 2006. 24(18): S. 3821-31.
- [205] **Jose, J., Bernhardt, R. und Hannemann, F.**, Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. *J Biotechnol*, 2002. 95(3): S. 257-68.
- [206] **Jung, H. C., Kwon, S. J. und Pan, J. G.**, Display of a thermostable lipase on the surface of a solvent-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* GM730, and its applications in whole-cell biocatalysis. *BMC Biotechnol*, 2006. 6: S. 23.
- [207] **Kwon, S. J., Jung, H. C. und Pan, J. G.**, Transgalactosylation in a water-solvent biphasic reaction system with beta-galactosidase displayed on the surfaces of *Bacillus subtilis* spores. *Appl Environ Microbiol*, 2007. 73(7): S. 2251-6.

- [208] **Lee, S. H., Choi, J. I., Park, S. J., Lee, S. Y. und Park, B. C.**, Display of bacterial lipase on the *Escherichia coli* cell surface by using FadL as an anchoring motif and use of the enzyme in enantioselective biocatalysis. *Appl Environ Microbiol*, 2004. 70(9): S. 5074-80.
- [209] **Jose, J.**, Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006. 69(6): S. 607-14.
- [210] **Jose, J., Betscheider, D. und Zangen, D.**, Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. *Anal Biochem*, 2005. 346(2): S. 258-67.
- [211] **Olsen, M. J., Stephens, D., Griffiths, D., Daugherty, P., Georgiou, G. und Iverson, B. L.**, Function-based isolation of novel enzymes from a large library. *Nat Biotechnol*, 2000. 18(10): S. 1071-4.
- [212] **Wernerus, H. und Stahl, S.**, Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol Appl Biochem*, 2004. 40 (Pt 3): S. 209-28.
- [213] **Grodberg, J. und Dunn, J. J.**, ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*, 1988. 170(3): S. 1245-53.
- [214] **Becker, S., Schmoldt, H. U., Adams, T. M., Wilhelm, S. und Kolmar, H.**, Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol*, 2004. 15(4): S. 323-9.
- [215] **Becker, S.**, Aufbau eines Hochdurchsatzverfahrens zur Isolierung von Varianten der *Pseudomonas aeruginosa* Membranesterase EstA mit veränderter Substratspezifität., *Diplomarbeit*, Georg-August-Universität Göttingen, 2003.
- [216] **Becker, S., Michalczyk, A., Wilhelm, S., Jaeger, K. E. und Kolmar, H.**, Ultrahigh-throughput screening to identify *E. coli* cells expressing functionally active enzymes on their surface. *Chembiochem*, 2007. 8(8): S. 943-9.
- [217] **Janda, K. D., Lo, C. H., Li, T., Barbas, C. F., 3rd, Wirsching, P. und Lerner, R. A.**, Direct selection for a catalytic mechanism from combinatorial antibody libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(7): S. 2532-6.
- [218] **Wilhelm, S., Tommassen, J. und Jaeger, K. E.**, A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 1999. 181(22): S. 6977-86.
- [219] **Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F. und Jaeger, K. E.**, The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility and biofilm formation. *J Bacteriol*, 2007.
- [220] **McCormick, M. L., Gaut, J. P., Lin, T. S., Britigan, B. E., Buettner, G. R. und Heinecke, J. W.**, Electron paramagnetic resonance detection of free tyrosyl radical generated by myeloperoxidase, lactoperoxidase, and horseradish peroxidase. *J Biol Chem*, 1998. 273(48): S. 32030-7.
- [221] **Daugherty, A., Dunn, J. L., Rateri, D. L. und Heinecke, J. W.**, Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 1994. 94(1): S. 437-44.

- [222] **Heinecke, J. W., Li, W., Francis, G. A. und Goldstein, J. A.**, Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J Clin Invest*, 1993. 91(6): S. 2866-72.
- [223] **Leeuwenburgh, C., Rasmussen, J. E., Hsu, F. F., Mueller, D. M., Pennathur, S. und Heinecke, J. W.**, Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J Biol Chem*, 1997. 272(6): S. 3520-6.
- [224] **Bobrow, L. G., Hirsch, F. R., Hay, F. G., Happerfield, L., Skov, B. G., Law, K., Leonard, R. C. und Souhami, R. L.**, An immunohistochemical investigation of diagnostic biopsy material taken from short and long term survivors with small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 1992. 66(3): S. 547-51.
- [225] **Chao, J., DeBiasio, R., Zhu, Z., Giuliano, K. A. und Schmidt, B. F.**, Immunofluorescence signal amplification by the enzyme-catalyzed deposition of a fluorescent reporter substrate (CARD). *Cytometry*, 1996. 23(1): S. 48-53.
- [226] **Hunyady, B., Krempels, K., Harta, G. und Mezey, E.**, Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *J Histochem Cytochem*, 1996. 44(12): S. 1353-62.
- [227] **Bobrow, M. N., Harris, T. D., Shaughnessy, K. J. und Litt, G. J.**, Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods*, 1989. 125(1-2): S. 279-85.
- [228] **Bobrow, M. N., Litt, G. J., Shaughnessy, K. J., Mayer, P. C. und Conlon, J.**, The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. *J Immunol Methods*, 1992. 150(1-2): S. 145-9.
- [229] **van Gijlswijk, R. P., Wiegant, J., Raap, A. K. und Tanke, H. J.**, Improved localization of fluorescent tyramides for fluorescence in situ hybridization using dextran sulfate and polyvinyl alcohol. *J Histochem Cytochem*, 1996. 44(4): S. 389-92.
- [230] **Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.**, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985. 33(1): S. 103-19.
- [231] **Antoine, R. und Locht, C.**, Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol*, 1992. 6(13): S. 1785-99.
- [232] **Stanssens, P., Opsomer, C., McKeown, Y. M., Kramer, W., Zabeau, M. und Fritz, H. J.**, Efficient oligonucleotide-directed construction of mutations in expression vectors by the gapped duplex DNA method using alternating selectable markers. *Nucleic Acids Res*, 1989. 17(12): S. 4441-54.
- [233] **Funke, S. A., Eipper, A., Reetz, M. T., Otte, N., Thiel, W., Van Pouderoyen, G., Dijkstra, B. W., Jaeger, K. E. und Eggert, T.**, Directed evolution of an enantioselective *Bacillus subtilis* lipase. *Biocatal Biotransform*, 2003. 21: S. 67-73.
- [234] **Lauwereys, M., De Geus, P., De Meutter, J., Stanssens, P. und Matthysens, G.**, Cloning, expression and characterization of cutinase, a fungal lipolytic enzyme, In: *Lipases - Structure, Mechanism and Genetic Engineering*, Vol. 16, L. Alberghina und R. Verger. 1991, VCH, Weinheim, S. 243-51
- [235] **Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W.**, High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 1988. 16(13): S. 6127-45.

- [236] **Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.**, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- [237] **Grinsted, J. und Bennett, P. M.**, Methods in microbiology: plasmid technology, Vol. 21, 1988, Academic press, San Diego.
- [238] **Mullis, K. B. und Faloona, F. A.**, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987. 155: S. 335-50.
- [239] **Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A.**, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988. 239(4839): S. 487-91.
- [240] **Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N.**, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985. 230(4732): S. 1350-4.
- [241] **Taylor, M. S., Challed-Spong, A. und Johnson, E. A.**, Co-amplification of the amelogenin and HLA DQ alpha genes: optimization and validation. *J Forensic Sci*, 1997. 42(1): S. 130-6.
- [242] **Nakane, P. K. und Kawaoi, A.**, Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*, 1974. 22(12): S. 1084-91.
- [243] **Vollhardt, K. P. C. und Schore, N. E.**, Organische Chemie, 3. Ed., 2000, Wiley-VCH,
- [244] **Kok, R. G., Christoffels, V. M., Vosman, B. und Hellingwerf, K. J.**, Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J Gen Microbiol*, 1993. 139(10): S. 2329-42.
- [245] **Brockerhoff, H.**, Action of pancreatic lipase on emulsions of water-soluble esters. *Arch Biochem Biophys*, 1969. 134(2): S. 366-71.
- [246] **Kissmehl, R., Treptau, T., Hofer, H. W. und Plattner, H.**, Protein phosphatase and kinase activities possibly involved in exocytosis regulation in *Paramecium tetraurelia*. *Biochem J*, 1996. 317 (Pt 1): S. 65-76.
- [247] **Chen, C. S., Fujimoto, Y. und Sih, C. J.**, Quantitative analysis of biochemical kinetic resolution of enantiomers. *J Am Chem Soc*, 1982. 104: S. 7294-9.
- [248] **Becker, S., Theile, S., Heppeler, N., Michalczyk, A., Wentzel, A., Wilhelm, S., Jaeger, K. E. und Kolmar, H.**, A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Lett*, 2005. 579(5): S. 1177-82.
- [249] **Dartois, V., Baulard, A., Schanck, K. und Colson, C.**, Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochim Biophys Acta*, 1992. 1131(3): S. 253-60.
- [250] **Li, X., Tetling, S., Winkler, U. K., Jaeger, K. E. und Benedik, M. J.**, Gene cloning, sequence analysis, purification, and secretion by *Escherichia coli* of an extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microbiol*, 1995. 61(7): S. 2674-80.
- [251] **Soliday, C. L., Dickman, M. B. und Kolattukudy, P. E.**, Structure of the cutinase gene and detection of promoter activity in the 5'-flanking region by fungal transformation. *J Bacteriol*, 1989. 171(4): S. 1942-51.

- [252] **Desvaux, M., Parham, N. J. und Henderson, I. R.**, Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol*, 2004. 6(2): S. 111-24.
- [253] **Jose, J., Kramer, J., Klausner, T., Pohlner, J. und Meyer, T. F.**, Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene*, 1996. 178(1-2): S. 107-10.
- [254] **Yang, T., Zhong, P., Qu, L., Wang, C. und Yuan, Y.**, Preparation and identification of anti-2, 4-dinitrophenyl monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*, 2006. 313(1-2): S. 20-8.
- [255] **Cadwell, R. C. und Joyce, G. F.**, Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl*, 1994. 3(6): S. S136-40.
- [256] **Cadwell, R. C. und Joyce, G. F.**, Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl*, 1992. 2(1): S. 28-33.
- [257] **Bornscheuer, U. T., Altenbuchner, J. und Meyer, H. H.**, Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. *Bioorg Med Chem*, 1999. 7(10): S. 2169-73.
- [258] **Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R. und Krishna, S. H.**, Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol*, 2002. 20(10): S. 433-7.
- [259] **Schmidt, M. und Bornscheuer, U. T.**, High-throughput assays for lipases and esterases. *Biomol Eng*, 2005. 22(1-3): S. 51-6.
- [260] **Bornscheuer, U. T.**, Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Curr Opin Biotechnol*, 2002. 13(6): S. 543-7.
- [261] **Schmidt, M., Hasenpusch, D., Kahler, M., Kirchner, U., Wiggernhorn, K., Langel, W. und Bornscheuer, U. T.**, Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* yields a mutant with excellent enantioselectivity and activity for the kinetic resolution of a chiral building block. *ChemBiochem*, 2006. 7(5): S. 805-9.
- [262] **Shapiro, H. M.**, Practical Flow Cytometry, 4. Ed., 2003, Wiley & Sons, New York.
- [263] **Jamieson, T., Bakhshi, R., Petrova, D., Pocock, R., Imani, M. und Seifalian, A. M.**, Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, 2007. 28(31): S. 4717-32.
- [264] **Benkovic, S. J. und Hammes-Schiffer, S.**, A perspective on enzyme catalysis. *Science*, 2003. 301(5637): S. 1196-202.
- [265] **Fersht, A. R.**, Structure and Mechanism in Protein Sciences: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding, 1998, Freeman, New York.
- [266] **Garcia-Viloca, M., Gao, J., Karplus, M. und Truhlar, D. G.**, How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science*, 2004. 303(5655): S. 186-95.
- [267] **Silverman, R. B.**, The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions, 2000, Academic Press, London.
- [268] **Zhang, R., Hatzos, C., Clancy, S., Collart, F. und Joachimiak, A.**, Crystal structure of the lipase/acylhydrolase from *Enterococcus faecalis*, unveröffentlicht.
- [269] **Chou, P. Y. und Fasman, G. D.**, Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry*, 1974. 13(2): S. 211-22.

-
- [270] **Oue, S., Okamoto, A., Yano, T. und Kagamiyama, H.**, Redesigning the substrate specificity of an enzyme by cumulative effects of the mutations of non-active site residues. *J Biol Chem*, 1999. 274(4): S. 2344-9.
- [271] **Liebeton, K., Zacharias, A. und Jaeger, K. E.**, Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J Bacteriol*, 2001. 183(2): S. 597-603.
- [272] **Urban, A., Leipelt, M., Eggert, T. und Jaeger, K. E.**, DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2001. 183(2): S. 587-96.
- [273] **Rosenau, F. und Jaeger, K.**, Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie*, 2000. 82(11): S. 1023-32.
- [274] **Rosenau, F., Tommassen, J. und Jaeger, K. E.**, Lipase-specific foldases. *Chembiochem*, 2004. 5(2): S. 152-61.
- [275] **El Khattabi, M., Ockhuijsen, C., Bitter, W., Jaeger, K. E. und Tommassen, J.**, Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor. *Mol Gen Genet*, 1999. 261(4-5): S. 770-6.
- [276] **Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. und Misset, O.**, Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev*, 1994. 15(1): S. 29-63.
- [277] **El Khattabi, M., Van Gelder, P., Bitter, W. und Tommassen, J.**, Role of the lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone. *J Biol Chem*, 2000. 275(35): S. 26885-91.
- [278] **Wilhelm, S., Rosenau, F., Becker, S., Buest, S., Hausmann, S., Kolmar, H. und Jaeger, K. E.**, Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chembiochem*, 2007. 8(1): S. 55-60.
- [279] **Aamand, J. L., Hobson, A. H., Buckley, C. M., Jorgensen, S. T., Diderichsen, B. und McConnell, D. J.**, Chaperone-mediated activation in vivo of a *Pseudomonas cepacia* lipase. *Mol Gen Genet*, 1994. 245(5): S. 556-64.
- [280] **Hobson, A. H., Buckley, C. M., Jorgensen, S. T., Diderichsen, B. und McConnell, D. J.**, Interaction of the *Pseudomonas cepacia* DSM3959 lipase with its chaperone, LimA. *J Biochem (Tokyo)*, 1995. 118(3): S. 575-81.
- [281] **Pauwels, K., Lustig, A., Wyns, L., Tommassen, J., Savvides, S. N. und Van Gelder, P.**, Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. 13(4): S. 374-5.
- [282] **Shinde, U., Fu, X. und Inouye, M.**, A pathway for conformational diversity in proteins mediated by intramolecular chaperones. *J Biol Chem*, 1999. 274(22): S. 15615-21.
- [283] **Liébecq, C.**, Biochemical nomenclature and related documents. *The Biochemical Society*, London, 1978.

6.2 *Im Rahmen dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen*

1. **Becker, S., Schmoldt, H.U., Adams, T.M., Wilhelm, S., Kolmar, H.**, Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol*, 2004. 15(4): S. 323-29.
2. **Schmoldt, H.U., Wentzel, A., Becker, S., Kolmar, H.**, A fusion protein system for the recombinant production of short disulfide bond rich cystine knot peptides using barnase as a purification handle. *Protein Expr Purif*, 2005. 39(1): S. 82-9.
3. **Becker, S., Theile, S., Heppeler, N., Michalczyk, A., Wentzel, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., Kolmar H.**, A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Lett*, 2005. 579(5): S. 1177-82.
4. **Wilhelm, S., Rosenau, F., Becker, S., Buest, S., Hausmann, S., Kolmar, H., Jaeger, K.E.**, Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chembiochem*, 2007. 8(1): S. 55-60.
5. **Becker, S., Michalczyk, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., Kolmar, H.**, Ultrahigh-throughput screening to identify *E. coli* cells expressing functionally active enzymes on their surface. *Chembiochem*, 2007. 8(8): S. 943-49.

Tagungsbeiträge:

1. **Becker, S., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.E., Kolmar, H.**, Cell-Surface Display of Enzymes using the outer Membrane-bound Esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa*. *DFG-Workshop im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1170 „Directed Evolution to Optimize and Understand Molecular Biocatalysts”*, Bremen, 31.07.-02.08. 2006, Poster.
2. **Becker, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., Kolmar, H.**, High Throughput Screening of Enzyme Libraries via Coupled Reactions on the Surface of *Escherichia coli* Cells. *International Congress on Biocatalysis (Biocat2006)*, Hamburg, 03.09.-07.09. 2006, Poster.

7. Anhang

7.1 Aminosäuresequenz der *P. aeruginosa* Esterase EstA

Die Reste der katalytischen Triade (S14, D286 & H289) sind in gelb dargestellt. Der rot unterlegte Bereich repräsentiert die Domäne, deren kodierende Sequenz für die Erzeugung von Bibliotheken durch eine synthetische Sequenz mit *E. coli*-eigener Kodonhäufigkeit (*SynEstA*) ausgetauscht wurde. Die aus der Einführung einer zusätzlichen Restriktions-erkennungsstelle resultierende Aminosäuresubstitutionsposition (G353L) ist in grün dargestellt.

1	APSPYSTLVV	FGD <u>S</u> LSDAGQ	FPDPAGPAGS	TSRFTNRVGP	TYQNGSGEIF
5	GPTAPMLLGN	QLGIAPGDLA	ASTSPVNAQQ	GIADGNNWAV	GGYRTDQIYD
101	SITAANGSLI	ERDNTLLRSR	DGYLVDRARQ	GLGADPNALY	YITGGGNDFL
151	QGRILNDVQA	QQAAGRLVDS	VQALQQAGAR	YIVVWLLPDL	GLTPATFGGP
201	LQPFASQLSG	TFNAELTAQL	SQAGANVIPL	NIPLLLKEGM	ANPASFGLAA
251	DQNLIGTCFS	GNGCTMNPTY	GINGSTPDPS	KLLFN <u>D</u> SV <u>H</u> P	TITGQRLIAD
301	YTYSLLSAPW	ELTLLPEMAH	GTLRAYQDEL	RSQWQADWEN	WQNVGQWRGF
351	VGGGGQRLDF	DSQDSAASGD	GNGYNLTLGG	SYRIDEAWRA	GVAAGFYRQK
401	LEAGAKDSY	RMNSYMASAF	VQYQENRWWA	DAALTGGYLD	YDDLKRKFAL
451	GGGERSEKGD	TNGHLWAFSA	RLGYDIAQQA	DSPWHLSPFV	SADYARVEVD
501	GYSEKGASAT	ALDYDDQKRS	SKRLGAGLQG	KYAFGSDTQL	FAEYAHAREY
551	EDDTQDLTMS	LNSLPGNRFT	LEGYTPQDHL	NRVSLGFSQK	LAPELSLRGG
601	YNWRKGEDDT	QQSVSLALSL	DF		

7.2 Nukleotidsequenz des synthetischen DNA-Fragments zur Erzeugung von *EstA* Enzymbibliotheken mit *E. coli*-eigener Kodonhäufigkeit (*SynEstA*)

Durch die Verwendung der *E. coli*-eigenen Kodonhäufigkeit konnte der ursprüngliche G/C-Gehalt dieses Abschnitts von 68 % des Wildtyp-Gens auf 60 % in der synthetischen Sequenz reduziert werden. Die zusätzlich eingeführten flankierenden *Sfi*I Erkennungsstellen sind unterstrichen. Diese Sequenz wurde von der Fa. GENEART synthetisiert und in Form des Plasmids 053870pPCR-Script (2.2.8) ausgeliefert.

```

1  ggcccagccg gcccgcgtccc cgtactccac cctggttggtt ttcggtgact
51  ccctgtccga cgctggtcag ttcccggacc cggctgggcc ggctgggtcc
101 acctcccgtt tcaccaaccg tgttgggtccg acctaccaga acggttccgg
151 tgaaatcttc ggtcgcgaccg ctccgatgct gctgggtaac cagctgggta
201 tcgctccggg tgacctggct gcttccacct ccccggttaa cgctcagcag
251 ggtatcgctg acggtaacaa ctgggctggt ggtgggtacc gtaccgacca
301 gatctacgac tccatcaccg ctgctaaccg ttccctgatc gaacgtgaca
351 acaccctgct gcgttcccgt gacgggtacc tgggtgaccg tgctcgtcag
401 ggtctgggtg ctgaccgaa cgctctgtac tacatcaccg gtggtggtaa
451 cgacttctct cagggtcgta tcctgaacga cgttcaggct cagcaggctg
501 ctggctcgtct ggttgactcc gttcaggctc tgcagcaggc tgggtgctcgt
551 tacatcgttg tttggctgct gccggacctg ggtctgacc cggctacctt
601 cgggtgggtccg ctgcagccgt tcgcttccca gctgtccgggt accttcaacg
651 ctgaactgac cgctcagctg tcccaggctg gtgctaaccg tatcccgtg
701 aacatcccgc tgctgctgaa agaaggatg gctaaccgg cttccttcgg
751 tctggctgct gaccagaacc tgatcggtac ctgcttctcc ggtaacgggt
801 gcaccatgaa cccgacctac ggtatcaacg gttccacccc ggaccggtcc
851 aaactgctgt tcaacgactc cgttcaccg accatcaccg gtcagcgtct
901 gatcgctgac tacacctact ccctgctgct cgctccgtgg gaactgacc
951 tgctgccgga aatggctcac ggtaccctgc gtgcttacca ggacgaactg
1001 cgttcccagt ggcaggctga ctgggaaaac tggcagaacg ttggtcagtg
1051 gcgtgggttc gttggcctcg ggggcc

```

7.3 *Abkürzungsverzeichnis*

Die verwendeten ein- und dreibuchstabigen Abkürzungen für Aminosäuren sowie alle verwendeten physikalischen Größen entsprechen der Konvention der *International Union for Biochemistry*.^[283]

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
Bla	β -Laktamase
<i>bla</i>	β -Laktamase-Gen
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	cirka
<i>cat</i>	Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase
Cm ^x	Chloramphenicol, x μ g/ml
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dYT	<i>double Yeast Tryptone</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ee</i>	<i>enantiomeric excess</i> (Enantiomerenüberschuss, Maß für das Enantiomerenverhältnis in einer Mischung zweier Enantiomere in %)
EstA	Esterase der äußeren Membran aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Gerät) oder Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Verfahren)
f1	Replikationsursprung des Phagen f1
G	Guanin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen

<i>lac</i>	zum <i>E. coli</i> Laktose-Operon gehörend (z.B. <i>lac</i> -Repressor, <i>lac</i> P/O)
MACS	<i>Magnetic Cell Sorter (Gerät)</i> oder Magnetische Zellsortierung (Verfahren)
M	Molekulargewicht (in g/mol)
Nr.	Nummer
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ori	Replikationsursprung
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline(-Puffer)</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
P/O	Promotor/Operator
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (~20°C)
s.o.	siehe oben
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	<i>Tris-Borate-EDTA(-Puffer)</i>
TE	<i>Tris-EDTA(-Puffer)</i>
U	Uracil
u, U	<i>units</i>
ü. N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

7.4 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Harald Kolmar für die Betreuung dieser Dissertation, die stets vorhandene freundschaftliche Zusammenarbeit und für die Bereitstellung des Themas, das es mir ermöglichte, in diesem spannenden und vielversprechenden Bereich „Weiße Biotechnologie“ Fuß zu fassen.

Wilfried Kramer danke ich für die Übernahme des Korreferats und die vielen anregenden und amüsanten Diskussionen während meiner „Göttinger Zeit“.

Den Kooperationspartnern Prof. Jaeger vom Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Forschungszentrum Jülich) und Prof. Reetz vom Max Planck Institut für Kohlenforschung (Mülheim/Ruhr) danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein besonderer Dank geht dabei an Susanne Wilhelm und Frank Rosenau (IMET, Jülich) für eine mittlerweile langjährige freundschaftliche und erfolgreiche Kooperation sowie für die zahlreichen Materialien, die zur Verfügung gestellt wurden. Horst Höbenreich (MPI, Mülheim) gilt mein besonderer Dank für die schnelle und zuverlässige Synthese der in dieser Arbeit verwendeten Substrate sowie für die durchgeführten gaschromatographischen Analysen. Er hat dadurch entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Sebastian Buest (IMET, Jülich) danke ich für die Erzeugung der *SynEstA epPCR*-Fragmente, sowie für die Bereitstellung des Plasmids pEst100-LipH1. Filip Kovacic (IMET, Jülich) gilt mein Dank für die freundliche Bereitstellung des EstA Sequenzhomologiemodells. Den „Jülichern“ Sabrina Schell, Horst Funken und Sascha Hausmann danke ich ebenfalls für die stets freundschaftliche Zusammenarbeit. Alexander Wentzel gilt mein Dank für die Bereitstellung des Plasmids pEst100.

Meinen Laborkollegen Andreas Christmann, Olga Avrutina, Stefanie Heil, Sebastian Krause, Janine Fritz, Martin Daneschdar, Verena Schmidt, Michael Tomaszowski, Simone Bartel-Zimmermann, Annika Postler, Maren Kuczmiercyk und Gernot Habicht danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank geht dabei an Stefanie Heil für den tatkräftigen Einstieg in das Projekt und an Janine Fritz für die Hilfe bei der Erzeugung der pEst101_185mut Sättigungsbibliothek. Sebastian Krause danke ich zudem für die Bereitstellung des Pausengestaltungsmobiliars.

Der „alten Göttinger Truppe“ der Abteilung für Molekulare Genetik und präparative Molekularbiologie am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die freundschaftliche Atmosphäre während der ersten Phase meiner Promotion. Mein besonderer Dank gilt dabei meinen alten Arbeitsgruppenkollegen Ulli Schmoltdt und Thorsten Adams für die zahlreichen Hilfestellungen, die inspirierende Musik und das Feierabend-Bier.

Prof. Hans-Joachim Fritz danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung beginnen und alle zur Verfügung stehenden Ressourcen nutzen zu können.

Marita Kalck und Barbara Diestelmann danke ich für die freundliche Hilfsbereitschaft in Sachen Bürokratie.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gilt mein Dank für die im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1170 „*Directed Evolution to Optimize and Understand Molecular Biocatalysts*“ gewährte finanzielle Unterstützung dieser Promotion.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich stets in meinen Zielen bestärkt und die mich die gesamte Zeit meines Studiums nach Kräften unterstützt haben. Sie haben auf diese Weise einen entscheidenden Anteil an dieser Arbeit.

7.5 Lebenslauf

- Name:** Stefan Becker
- Geburtsdatum:** 27.04.1978
- Geburtsort:** Eschwege
- Staatsangehörigkeit:** deutsch
- Familienstand:** ledig
- Eltern:** Bruno und Renate Becker, geb. Zeich
- Schulbildung:** 1984 bis 1988 Grundschule „Meinhardsschule“ in Meinhard
1988 bis 1994 Gymnasium „Friedrich-Wilhelm-Schule“, Eschwege
1994 bis 1997 Oberstufengymnasium Eschwege
1997 Abitur am Oberstufengymnasium Eschwege
- Zivildienst:** 1997 bis 1998 „Verein Werkstätten für Behinderte, Eschwege e.V.“
- Studium der Biologie:** 1998 bis 2003 an der Georg-August-Universität zu Göttingen
- Diplomarbeit** 2002 bis 2003 in der Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie des Instituts für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen.
 Titel: „Aufbau eines Hochdurchsatzverfahrens zur Isolierung von Varianten der *Pseudomonas aeruginosa* Membranesterase EstA mit veränderter Substratspezifität“, Gesamtnote: „Sehr gut“
- Dissertation:** seit März 2004 in der Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie des Instituts für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen. Unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1170 „*Directed Evolution to Optimize and Understand Molecular Biocatalysts*“.
seit November 2005 Fortsetzung der experimentellen Arbeiten in der Abteilung Biochemie des Clemens-Schöpf-Instituts für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt.