

Protein-Engineering von Enzymen mit / -Hydrolasefaltung

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

Zur
Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
ander Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von

Timo Davids

geboren am 28. Dezember 1983

in Berlin

Greifswald, im November 2012

Dekan: Prof. Dr. Klaus Fesser

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe T. Bornscheuer

2. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Tag der Promotion 23.01.2013

Danksagung

Der größte Dank gilt Prof. Dr. Uwe T. Bornscheuer für sein Versprechen ein spannendes Thema zur Verfügung zu stellen bei weiterentrollen. Neben den guten Ratschlägen, den außergewöhnlichen Ideen und der Freiheit neuer Methoden zu etablieren liegt seine größte Stärke doch in seiner mitarbeiternahen Arbeitsweise.

Dr. Dominique Böttcher und Dr. Santos Kumar Padhi danke ich für den Einfallsreichtum und ihre Hilfe zur Interpretation von Daten und Fakten.

Meinem Diplomanden Michael Fibinger, meinem Bachelorstudenten Johannes v. Saß und meinen Praktikanten Sven Kratoch, sowie Andy Beier danke ich für den motivierten Einsatz Probleme zu überwinden und die Eifer neuer Aufgaben zu lösen.

Den Arbeitsgruppen von Prof. Weisz und Prof. Hinrichs danke ich für die Ratschläge und Mitbenutzung der IT. Mein besonderer Dank gilt hierbei Dr. Palm. Auch der Arbeitsgruppe von Prof. Müller danke ich für die Benutzung des NanoDr. Des Weiteren danke ich der Arbeitsgruppe von J. Damborský, die mit ihrem Wissen über Mikrokolorimetrie und Dehalogenasen das Projekt erweitern konnten.

Hervorzuheben ist unsere Arbeitsgruppe, welche immer aufmunternde Worte und Verbesserungsvorschläge nahezu jeder Situation gefunden hat. Die schöne Zeit im Arbeitskreis bedanke ich mich bei Stefan Saß, Maria Kado, Galina Müller, Nina Beyer und Susanne Herter, die mir diesen Arbeitskreis wärmstens ans Herz gelegt hat. Großen Dank an Geoffrey A. Behr, Andreas Bäumgen und Torge Vorhaben, die mir mit den vielen Spieleabenden und der schönen gemeinsamen Zeit wieder neue Kraft gegeben haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Frau und meinen beiden Kindern bedanken, die mich immer seelisch unterstützt haben und mir gezeigt haben, dass es neben der Arbeit noch wichtigere Dinge im Leben gibt, die eine weit größere Herausforderung sein können.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis..... | vi |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 ProteinEngineering..... | 2 |
| 1.1.1 Das Strukturalignmentprogramm 3DM zur Durchführung eines rationalen Proteindesigns..... | 5 |
| 1.1.2 Mutagenesemethoden..... | 7 |
| 1.1.3 Konzepte zur Durchmusterung von Mutantenbibliotheken..... | 11 |
| 1.2 -Hydrolasefaltungsenzyme..... | 15 |
| 1.2.1 Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1)..... | 16 |
| 1.2.2 Epoxidhydrolasen (EC 3.3.2.3)..... | 18 |
| 1.2.3 Haloalkandehalogenasen (EC 3.8.1.5)..... | 19 |
| 1.3 Kontinuierliche gerichtete Evolution..... | 21 |
| 1.4 Promiskuität von Enzymen..... | 22 |
| 1.5 Erzeugung von <i>de novo</i> Aktivität in Enzymen..... | 23 |
| 2. Zielstellung..... | 26 |
| 3. Ergebnisse..... | 27 |
| 3.1 Mutagenesemethoden..... | 27 |
| 3.1.1 <i>In vivo</i> Mutagenesemethoden..... | 27 |
| 3.1.1.1 Anwendung des Mutatorplasmids pMut..... | 27 |
| 3.1.1.2 Anwendung des Mutatorplasmids pEP..... | 29 |
| 3.1.1.3 Mutation mittels Xed Mutatorstamm..... | 30 |
| 3.1.2 Etablierung einer chemischen Mutagenese..... | 31 |
| 3.1.2.1 Mutagenese mit MNNG..... | 31 |
| 3.1.2.2 Mutagenese mit EMS..... | 32 |
| 3.1.3 UV-Mutagenese..... | 32 |
| 3.2 Assayentwicklung..... | 33 |
| 3.2.1 Dehalogenaseassays..... | 34 |
| 3.2.1.1 Phenolrotassay auf Agarplatten zur Bestimmung von Dehalogenaseaktivität..... | 34 |
| 3.2.1.2 Phenolrotassay in Mikrotiterplatten zur Bestimmung von Dehalogenaseaktivität..... | 34 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2.1.3 | Etablierung einer CS Methode zur Bestimmung von Dehalogenaseaktivität | 36 |
| 3.2.2 | Epoxidhydrolaseassays..... | 37 |
| 3.2.2.1 | Adrenalinassay in Mikrotiterplatten zur Bestimmung von Epoxidhydrolaseaktivität..... | 37 |
| 3.2.2.2 | Etablierung einer CS Methode zur Bestimmung von Epoxidhydrolaseaktivität..... | 39 |
| 3.2.3 | Hochdurchsatzselektionsassays..... | 40 |
| 3.2.3.1 | Hochdurchsatz-Enantioselektivitätsassay für Esterasen..... | 40 |
| 3.2.3.2 | Hochdurchsatzassay zur Selektierung aktiver Dehalogenasen..... | 43 |
| 3.2.3.3 | Hochdurchsatzassay zur Selektierung aktiver Dehalogenasen mit einem GFP Reporterplasmid..... | 47 |
| 3.3 | Kontinuierliche gerichtete Evolution..... | 49 |
| 3.3.1 | Kontinuierliche gerichtete Evolution zur Verbesserung der Enantioselektivität von Esterasen..... | 49 |
| 3.3.1.1 | Kontinuierliche gerichtete Evolution mit chemischen Mutagenen..... | 49 |
| 3.3.1.2 | Kontinuierliche gerichtete Evolution mit dem Mutatorplasmid pMut52 | 52 |
| 3.3.1.3 | Weiterführende Experimente zur kontinuierlichen gerichteten Evolution mit der Esterase BS2..... | 54 |
| 3.3.1.4 | Anpassung an den evolutionären Druck..... | 55 |
| 3.4 | Promiskuität..... | 57 |
| 3.4.1 | Erzeugung einer Dehalogenaseaktivität in der Esterase PFE.1..... | 59 |
| 3.4.1.1 | Aktivitätstests der Varianten..... | 62 |
| 3.4.1.2 | Weiterführende Untersuchungen mit den Varianten..... | 63 |
| 3.4.1.3 | Optimierung der rationalen Mutanten..... | 66 |
| 3.4.2 | Erzeugung einer Dehalogenaseaktivität in der Epoxidhydrolase EchA..... | 66 |
| 3.4.2.1 | Erweiterung der Auswahl an Dehalogenasesubstraten..... | 67 |
| 3.4.2.2 | Generierung der Dehalogenaseaktivität durch rationales Design..... | 68 |
| 3.4.2.3 | epPCR und Sättigungsmutagenesen von Varianten..... | 70 |
| 3.4.2.4 | Verwendung des Computerprogramms 3DM zur Generierung einer Dehalogenaseaktivität in der Epoxidhydrolase EchA..... | 70 |
| 3.4.3 | Kontinuierliche gerichtete Evolution zur Generierung von Dehalogenaseaktivität..... | 74 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 4. | Diskussion..... | 76 |
| 4.1 | Vergleich der Mutagenesemethoden im Hinblick auf die Anwendbarkeit in einer kontinuierlichen gerichteten Evolution..... | 76 |
| 4.2 | Assayentwicklung..... | 78 |
| 4.3 | Kontinuierliche gerichtete Evolution..... | 80 |
| 4.3.1 | Anwendung auf Esterasen zur Verbesserung der Selektivität..... | 80 |
| 4.3.2 | Generierung von Dehalogenaseaktivität..... | 82 |
| 4.4 | Promiskuität..... | 83 |
| 4.4.1 | Generierung einer Dehalogenaseaktivität in der Esterase.P.F.E.I..... | 84 |
| 4.4.2 | Generierung einer Dehalogenaseaktivität in der Epoxidhydrolase.Ec3A..... | 87 |
| 4.4.2.1 | Anpassung der Substratbinderegion..... | 87 |
| 4.4.2.2 | Optimierung des aktiven Zentrums zur Generierung von Dehalogenaseaktivität..... | 89 |
| 4.4.2.3 | Strukturanalyse mittels 3.D.M..... | 90 |
| 4.5 | Erkenntnisse zur Evolution von Hydrolasefaltungsenzymen..... | 91 |
| 5. | Zusammenfassung..... | 94 |
| 6. | Material und Methoden..... | 96 |
| 6.1 | Materialien..... | 96 |
| 6.1.1 | Chemikalien..... | 96 |
| 6.1.2 | Geräte..... | 97 |
| 6.1.3 | Enzyme..... | 99 |
| 6.1.4 | Bakterienstämme..... | 99 |
| 6.1.5 | Oligonukleotide..... | 100 |
| 6.1.6 | Plasmide..... | 103 |
| 6.1.7 | Medien, Zusätze, Induktoren und Puffer..... | 103 |
| 6.1.8 | Computerprogramme..... | 106 |
| 6.2 | Mikrobiologische Methoden..... | 107 |
| 6.2.1 | Übernachtskulturen..... | 107 |
| 6.2.2 | Stammhaltung..... | 107 |
| 6.2.3 | Kompetente Zellen..... | 107 |
| 6.2.3.1 | Herstellung von chemokompetenten Zellen..... | 107 |
| 6.2.3.2 | Herstellung von elektrokompetenten Zellen..... | 107 |
| 6.2.3.3 | Transformation von Zellen mittels Hitzeschock..... | 108 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 6.2.3.4 | Transformation von <i>E. coli</i> Zellen mittels Elektroporation..... | 108 |
| 6.2.4 | Kultivierung und Proteinexpression..... | 108 |
| 6.2.4.1 | Kultivierung im Schüttelkolben..... | 108 |
| 6.2.4.2 | Kultivierung in MTP..... | 109 |
| 6.2.5 | Bestimmung der kolonieformenden Einheiten (cfu)..... | 109 |
| 6.2.6 | Bestimmung der Toxizität von Substraten..... | 110 |
| 6.2.7 | Bestimmung der Mutageneserate..... | 110 |
| 6.3 | Molekularbiologische Methoden..... | 110 |
| 6.3.1 | Plasmidisolierung..... | 110 |
| 6.3.2 | Isolation von Genen aus einem Genom..... | 110 |
| 6.3.3 | Agarose-Gelelektrophorese..... | 111 |
| 6.3.4 | Nanodrop..... | 111 |
| 6.3.5 | Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 111 |
| 6.3.6 | Restriktion..... | 112 |
| 6.3.7 | Ligation..... | 112 |
| 6.3.8 | Megawhop..... | 113 |
| 6.3.9 | <i>FastCloning</i> | 113 |
| 6.4 | Mutagenesemethoden..... | 113 |
| 6.4.1 | <i>In vitro</i> Mutagenesemethoden..... | 113 |
| 6.4.1.1 | Fehlerbehaftete PCR..... | 113 |
| 6.4.1.2 | Positionsgerichtete Mutagenese..... | 114 |
| 6.4.2 | <i>In vivo</i> Mutagenesemethoden..... | 115 |
| 6.4.2.1 | Mutatorstamm <i>Xtd</i> | 115 |
| 6.4.2.2 | UV-Mutagenese..... | 116 |
| 6.4.2.3 | Mutagenese mit MNNG und EMS..... | 116 |
| 6.4.2.4 | Mutagenese mit pEP..... | 116 |
| 6.4.2.5 | Mutagenese mit pMut..... | 117 |
| 6.5 | Biochemische Methoden..... | 117 |
| 6.5.1 | Aufreinigung von Proteinen..... | 117 |
| 6.5.1.1 | Aufreinigung über Metallaffinitätschromatographie..... | 117 |
| 6.5.1.2 | Aufreinigung über das Maltosebindprotein..... | 118 |
| 6.5.2 | SDSPAGE..... | 118 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 6.5.3 | Proteinbestimmung nach Bradford..... | 119 |
| 6.6 | Assaysysteme..... | 119 |
| 6.6.1 | Biokatalysen..... | 119 |
| 6.6.1.1 | Extraktion der Esterasesubstratprodukte..... | 120 |
| 6.6.1.2 | Extraktion der Dehalogenasesubstratprodukte..... | 120 |
| 6.6.1.3 | Extraktion der Epoxidhydrolasesubstratprodukte..... | 120 |
| 6.6.2 | Dehalogenaseassays..... | 120 |
| 6.6.2.1 | Phenolrotassay auf Agarplatten..... | 120 |
| 6.6.2.2 | Phenolrotassay in Mikrotiterplatten..... | 121 |
| 6.6.2.3 | Tryptophanquenching zur Bestimmung der Substratbindung..... | 121 |
| 6.6.2.4 | Selektionsassay mit CH_3 or 1,2-propan..... | 121 |
| 6.6.3 | Adrenalinassay zur Bestimmung der Epoxidhydrolaseaktivität..... | 122 |
| 6.6.4 | Esteraseassays..... | 122 |
| 6.6.4.1 | Agarplattenassay..... | 122 |
| 6.6.4.2 | pNPA-Assay..... | 122 |
| 6.6.4.3 | ParaNitrophenyl- β -Phenylbuttersäure-Assay..... | 123 |
| 6.6.4.4 | Resorufinassay..... | 123 |
| 6.6.4.5 | Hochdurchsatzassay mittels Durchflusszytometer..... | 123 |
| 6.6.5 | Bestimmung der Enzymaktivität mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) | 124 |
| 6.6.6 | Bestimmung der Enzymaktivität mittels HPLC..... | 124 |
| 6.6.7 | Bestimmung der Enzymaktivität mittels MS/GC..... | 124 |
| 6.7 | Homologiemodelle..... | 125 |
| 7. | Literaturverzeichnis..... | 126 |
| 8. | Anhang..... | 131 |
| 8.1 | Aminosäuresequenzen..... | 131 |
| 8.2 | ITC Rohdaten..... | 133 |
| 9. | Eidesstattliche Erklärung..... | 134 |
| 10. | Tabellarischer Lebenslauf..... | 135 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| A. dest | Destilliertes Wasser |
| bp | Basenpaare |
| <i>B. subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| BS2 | <i>Bacillus subtilis</i> Esterase 2 |
| bzw. | beziehungsweise |
| CFP | Blau fluoreszierendes Protein (fluorescent protein) |
| cfu | Kolonieformende Einheiten (colony forming units) |
| DAPI | -Diamidin-2-phenylindol |
| DH | Dehalogenase |
| DhIA | <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Dehalogenase |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DnaJ/DnaK | Hitzeschockproteine <i>Es. coli</i> (auch HSP40/HSP70) |
| dNTP | Desoxynucleotidtriphosphat |
| DppA | Dehalogenase <i>Desiocystis pacifica</i> 51A |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EchA | <i>Agrobacterium radiobacter</i> AD1 Epoxidhydrolase |
| EH | Epoxidhydrolase |
| EMS | Ethylmethansulfonat |
| Est | Esterase |
| FSC | Vorwärtsstreuung (forward scatter) |
| epPCR | fehlerbehaftete PCR (error prone PCR) |
| epPol | fehlerbehaftete Polymerase (error prone polymerase) |
| FACS | Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting) |
| GC | Gaschromatographie |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein (fluorescent protein) |
| GroEL/GroES | Faltungshelfer <i>Es. coli</i> (chaperone) |
| GrpE | Hitzeschockprotein <i>Es. coli</i> (HSP24) |
| HNHL | <i>Hevea brasiliensis</i> Hydroxynitrillyase |
| HLD | Haloalkandehalogenase |

| | |
|------------------|---|
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>) |
| IPTG | Isopropyl -D-thiogalactopyranosid |
| ITC | Isothermale Titrationskalorimetrie |
| MBP | Maltosebindeprotein |
| MNNG | <i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -Nitro- <i>N</i> -Nitrosoguanidin |
| MS | Massenspektrometrie |
| MTP | Mikrotiterplatte |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>) |
| PBS | Phosphatgepuffer Salz (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PFE I | <i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase |
| <i>p</i> NPA | <i>p</i> -Nitrophenylacetat |
| <i>p</i> NP-3-PB | <i>p</i> -Nitrophenyl- β -phenylbutyrat |
| Pol | Polymerase |
| SDSPAGE | Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgelelektrophorese |
| SSC | Seitwärtsstreuung (<i>side scatter</i>) |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| UV | Ultraviolett |
| YFP | Gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein) |

1. Einleitung

Enzyme sind biologische Katalysatoren, die in der Lage sind chemische Reaktionen zu katalysieren. Sie können eine hohe Chiralität und Enantioselektivität besitzen. Bereits vor über einem Jahrhundert wurden Enzyme zur Katalyse von chemischen Reaktionen in der Herstellung von Hydroxy-2-phenylacetonitril verwendet.

Enzyme sind in der freien Natur einem stetigen Selektionsdruck ausgesetzt, da sie Überlebenden einen Selektionsvorteil gegenüber Konkurrenzorganismen benötigen. Aus diesem Grund werden Enzyme im Verlauf der Evolution stetig optimiert. Durch eine beschleunigte Evolution im Reagenzglas ist es heute möglich, neue oder verbesserte Enzyme innerhalb von Wochen zu kreieren, wofür die Natur Millionen Jahre benötigt hätte. Das Verändern oder Anpassen von Proteinen spielt in unserer Zeit eine große Rolle. Maßgeschneiderte Biokatalysatoren für industrielle Anwendungsgebiete zu erstellen. In den 80er Jahren wurden erstmalig Protein Engineering Methoden zur Herstellung von Feinchemikalien angewandt, um unter anderem das Substratspektrum der Enzyme zu verändern. Das Protein Engineering wurde von Frances Arnold in den 90er Jahren durch molekularbiologische Methoden und *de novo* Evolution revolutioniert. Diese *in vitro* oder auch gerichtete Evolution basiert auf der Veränderung der Nucleotidsequenz und anschließender Durchmusterung der erstellten Bibliothek nach verbesserten Enzymvarianten.^[1] Eine gerichtete Evolution im Labor ermöglicht neben der Erweiterung des Substratspektrums die Verbesserung der Enantioselektivität von Biokatalysatoren und in Einzelfällen die Erzeugung einer neuen Aktivität. Die neuen Eigenschaften des Enzyms können zum Beispiel für die Detoxifizierung von Umweltschadstoffen,^[2] die Produktion von Lebensmitteln^[3] oder die Synthese von Feinchemikalien und Medikamenten^[4] eingesetzt werden. Die Anwendungsgebiete von Enzymen in der Industrie sind vielfältig. Die stärkste Konkurrenz von Enzymen in der Produktion von Feinchemikalien und Nahrungsmitteln sind die Verfahrenstechniken der organischen Chemie, da es eine große Anzahl an bekannten chemischen Katalysatoren gibt und damit eine breitere Auswahl an Reaktionen durchgeführt werden können. Biologische Katalysatoren haben Vorteile von Enzymen sind wegen einer höheren Effizienz unter moderateren Reaktionsbedingungen (Druck, Temperatur, Lösungsmittel)^[5] und durch welche biotechnologische Verfahren im Allgemeinen umweltfreundlicher als chemische sind. Aus diesem

Grundversuche der Industrie vermehrt ihre chemischen Verfahren durch biologische zu ersetzen. Dazu ist es notwendig, Enzyme zu finden, die die gewünschte Reaktion katalysieren können. Dabei gibt es viele Möglichkeiten Biokatalysatoren zu finden, die für eine industrielle Aufgabe geeignet sind. Neben der beschriebenen gerichteten Evolution zur Anpassung von Enzymvarianten kann eine Bibliothek von Organismen nach der gewünschten Eigenschaft durchmustert werden und das Enzym im Anschluss aus dem Organismus isoliert werden. Über Metagenomansätze bei denen Genmaterial aus Umweltsproben isoliert, exprimiert und durchmustert wird sind auch die Gene und damit die Enzyme von nichtkultivierbaren Organismen zugänglich. Eine weitere Methode ist, das gewünschte Enzym mittels *de novo* Design komplett neu zu gestalten. In dieser Arbeit werden α-Glucosidase-Enzyme (Kapitel 2) mittels Protein Engineering untersucht, um das Verständnis dieser Enzyme zu erweitern.

1.1 Protein Engineering

Der Begriff Protein Engineering beschreibt das Verändern oder Anpassen von Proteinen an industrielle Anwendungen. Eine Möglichkeit das Protein zu verändern ist die wiederholte Mutieren eines Gens und die anschließende Durchmusterung nach gewünschten Enzymeigenschaften. Man unterscheidet zwischen gerichteter Evolution und rationalem Design. Die gerichtete Evolution stützt sich auf größtenteils zufallsbasierte Mutagenesemethoden die unspezifische Basensubstitutionen im Gen erzeugen. Dadurch entsteht eine Vielzahl von Genvarianten, die nach Expression durchmustert werden können. Ein Großteil der Genvarianten ist durch die Anwendung einer zufälligen Mutagenese nicht aktiv oder hat eine unerwünschte Aktivität, da Mutationen, die zu unerwünschten Eigenschaften oder Aktivitätsverlust führen in gleichem Maße und nicht steuerbar auftreten wie Mutationen, die beispielsweise die Aktivität verbessern. Zudem können diese Enzymvarianten hierarchische Eigenschaften, wie Instabilitäten gegenüber den in der Produktion verwendeten Werten, Temperaturen oder Lösungsmitteln aufweisen, oder Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) während der Expression bilden. Auf Grund der großen Anzahl an Enzymvarianten ist ein hoher Screeningaufwand notwendig. Die gerichtete Evolution kommt vor allem dann zum Einsatz, wenn wenig oder keine Informationen vom zu mutierenden Enzym vorhanden sind. Sobald die Kristallstruktur des Enzyms bekannt bzw.

der Mechanismus geklärt ist, können durch rationales Design mittels Computerprogrammen Aminosäuren ausgewählt werden, welche einen Einfluss auf gewünschte Eigenschaft haben könnten. Diese werden gezielt mutiert, wodurch zwar Screeningaufwand reduziert wird, aber in *in silico* Vorarbeiten notwendig sind (Abb.1).

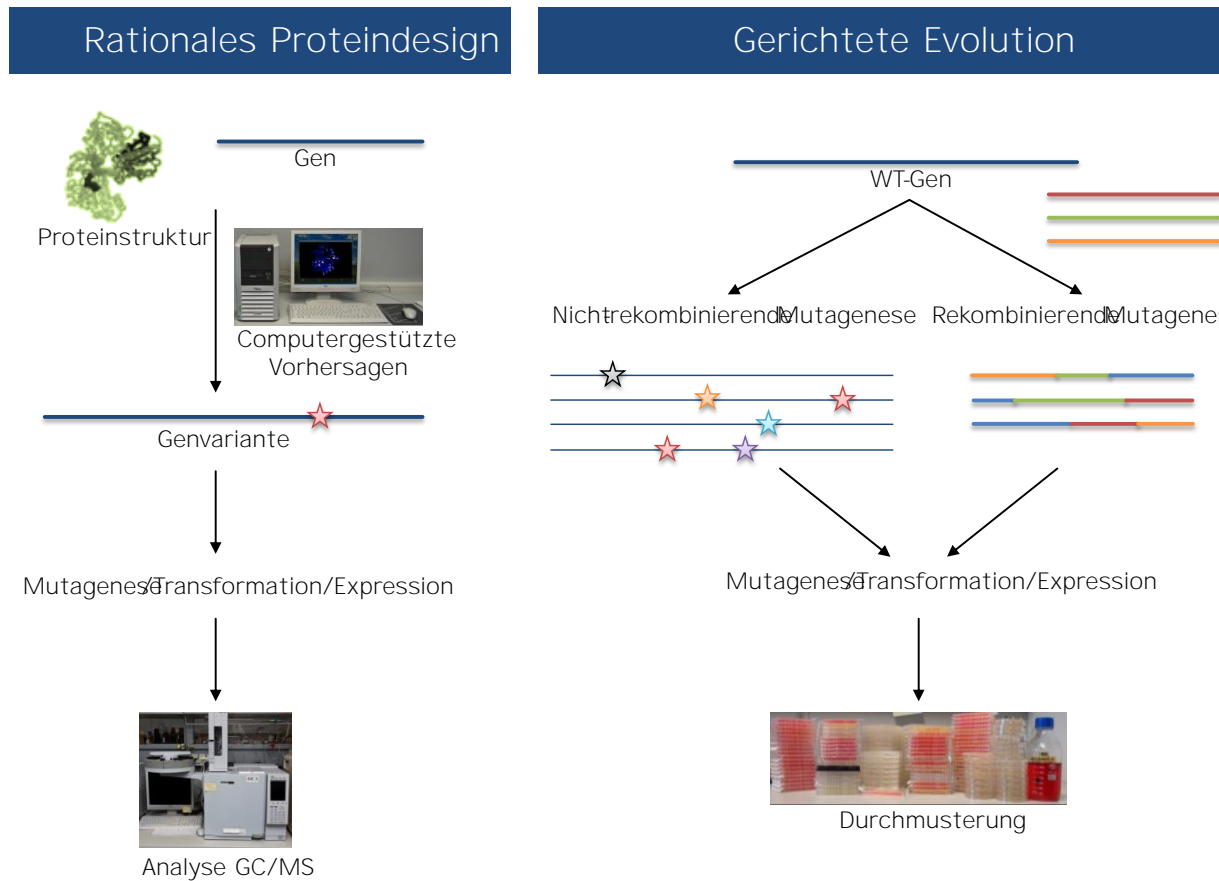


Abb. 1: Die Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen rationalem Proteindesign und gerichteter Evolution nach Bornscheuer.

Das *in silico* Design benötigt Computerprogramme und Algorithmen, die Hinweise auf die zu ersetzenden Aminosäuren geben. Wichtig ist hierbei die Struktur der zu untersuchenden Proteine, da sie Einblicke in die Substratbindung, sowie der Anordnung und Funktion des aktiven Zentrums gibt. Zudem kann die Zugänglichkeit für Kofaktoren, Kosubstraten Substraten zu den katalytischen Aminosäuren untersucht und optimiert werden. Eine Vielzahl von Proteinen wurde bereits kristallisiert, deren Kristallstrukturen in der Protein Data Bank (PDB) hinterlegt sind. Zudem ist es möglich über Homologiemodelle mittels YASARA, PyMol oder SwissProt die Struktur eines Enzyms zu ermitteln. Mit dem Algorithmus

Autodock kann die Bindungsenergie des Substrates zur Enzymvariante berechnet und damit *in silico* überprüft werden, welche Aminosäure an einer bestimmten Position besten Wechselwirkungen mit dem Substrat eingetriggert werden. Weitere Programme, wie das Strukturalignmentprogramm 3D-Kapitel 1.1.1),^[9] können unter anderem die Hydrolysefaltungsenzyme (Kapitel 1.2) miteinander vergleichen.^[10] Computerprogramme wie CAVER^[11] ermöglichen ergänzend die Analyse von Tunneln in Proteinen und können damit berechnen, wie das Substrat in das aktive Zentrum des Protein transportiert wird wie das Produkt aus dem Enzym gesetzt wird. CASTp ermöglicht des Weiteren die Analyse der Oberflächentopologie und ist damit ein weiteres Werkzeug für die Optimierung von Proteinen.^[12] Gerade der schnelle Fortschritt in der Entwicklung neuer Computerprogramme und die Kombination dieser Methoden führte in den letzten Jahren dazu, dass Wissenschaftler Proteine nach ihren Wünschen verändern und Enzyme mit neuen Eigenschaften entwerfen konnten.^[13] Mittlerweile geht man dazu über, das rationale Design und die gerichtete Evolution zu kombinieren und ein sogenanntes semirationales Design anzunehmen, oftmals Aminosäuren ausgewählt werden, welche durch Sättigungsmutagenese durch eine Vielzahl anderer Aminosäuren ersetzt werden. Der Aufwand der Durchmusterung der Genvarianten und der *in silico* Aufwand halten sich dabei die Waage (Abb. 2).

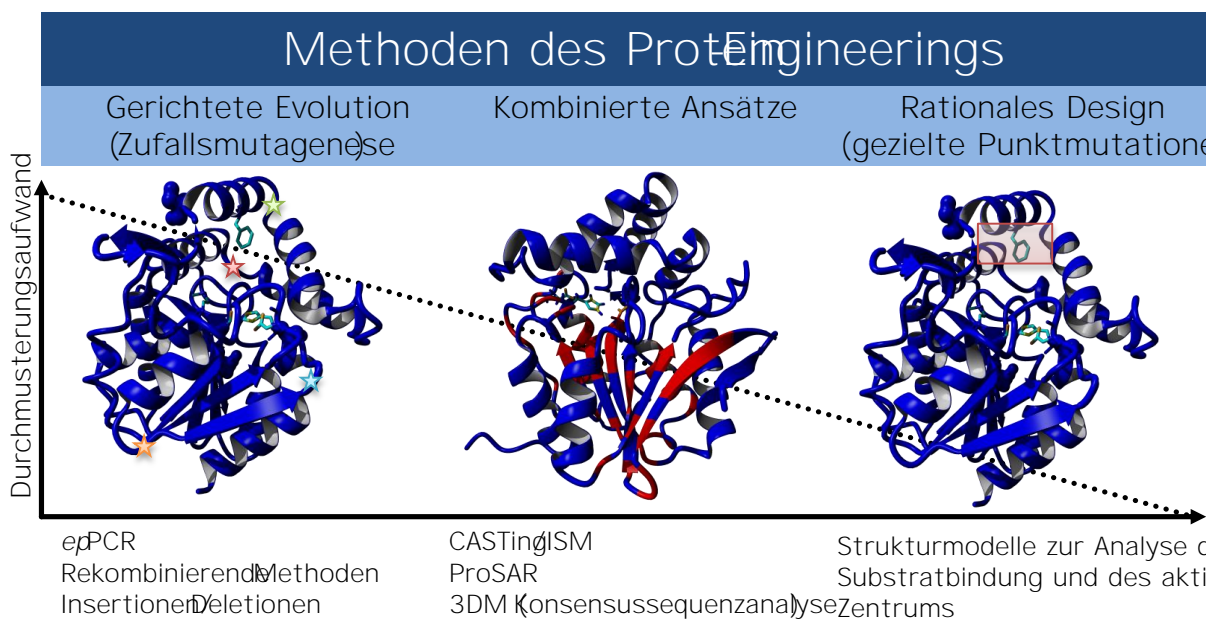


Abb. 2 Die Abbildung zeigt die Unterschiede des Durchmusterungsaufwandes zwischen der gerichteten Evolution und dem rationalen Design, sowie der Kombination beider Konzepte.

Neben dem Proteinengineering, gibt es die Möglichkeit die gewünschte Reaktion über das Lösungsmittel zu beeinflussen *solvent engineering* und die Möglichkeit das Reaktionssystem zu variieren *reaction engineering*.¹⁴ Allerdings sind diese Methoden limitiert, da die Anzahl der geeigneten Lösungsmittel bzw. Bedingungen in biologischen Systemen stark begrenzt sind.

1.1.1 Das Strukturalignmentprogramm 3DM zur Durchführung eines rationalen Proteindesigns

Das Computerprogramm 3DM ermöglicht dem Experimentator Aminosäuren auszuwählen, die durch Proteinengineering mutiert werden sollen, indem es die Aminosäuresequenzen einer Proteinsuperfamilie untereinander vergleicht.

Das Computerprogramm 3DM legt alle Enzyme einer Proteinfamilie dreidimensional übereinander. Dadurch überlagern sich bestimmte Aminosäuren der unterschiedlichen Enzyme. Jeder Aminosäure aus einem Enzyme, die sich mit Aminosäuren aus den anderen Enzymen überlagert, wird eine *3DM*-nummer zugeteilt. Diese *3DM*-nummer ist in allen Enzymen identisch, wenn die Aminosäure an der gleichen räumlichen Position liegt, wie im Durchschnitt (Abweichung maximal 2,5 Å) aller Aminosäuren in mindestens 90% der anderen überlagerten Enzyme. Aus den Aminosäuren mit der *3DM*-nummer bildet sich der *core*. Dieser *core* enthält mehr Aminosäuren, wenn die Anzahl der übereinandergelagerten Enzyme geringer ist, weil dann die Übereinstimmung größer ist. Die Aminosäuren des *core* werden im Programm farbig nach Eigenschaft der Seitenkette markiert: in Grün für Säuren, die nicht dem *core* zugeordnet wurden, in Rot für *variable* bezeichnet und im Vergleich ausgeblendet (graue Lücken zwischen dem farbig markierten *core*). Zudem werden Aminosäurepositionen weiß hervorgehoben, die gemäß Publikation mutiert worden sind. Mit einem Vergleich kann demnach ermittelt werden, welche Aminosäuren sich in verschiedenen Enzymen strukturell an der gleichen Position (Abb. 1.1.1) befinden.

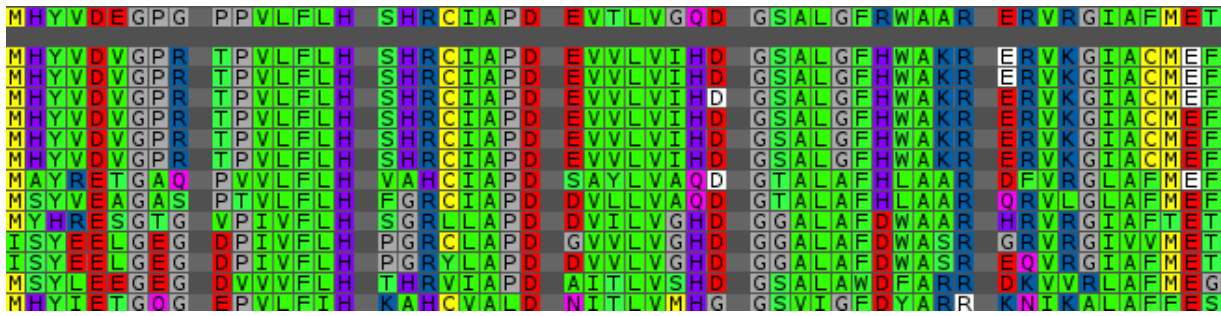


Abb. 3: Die Abbildung zeigt einen Auszug des Vergleiches aus der BioDitk-core farbige Aminosäurevariable grauer Teil zwischen der core weiß: Aminosäurepositionen, an denen eine oder mehrere Mutationen durchgeführt worden sind

Das Programm ist des Weiteren in der Lage durch Korrelationsvergleiche zu ermitteln, welche Aminosäure an einer Position X am häufigsten vorkommt, wenn an Position Y eine bestimmte Aminosäure vorhanden ist. Zudem kann die Aminosäureverteilung an einer Position des core von der Superfamilie oder einer Auswahl an Enzymen prozentual angezeigt werden. So ist es zum Beispiel möglich die Verteilung der Aminosäuren an Position Z von Dehalogenasen anzuzeigen (Abb. 4).

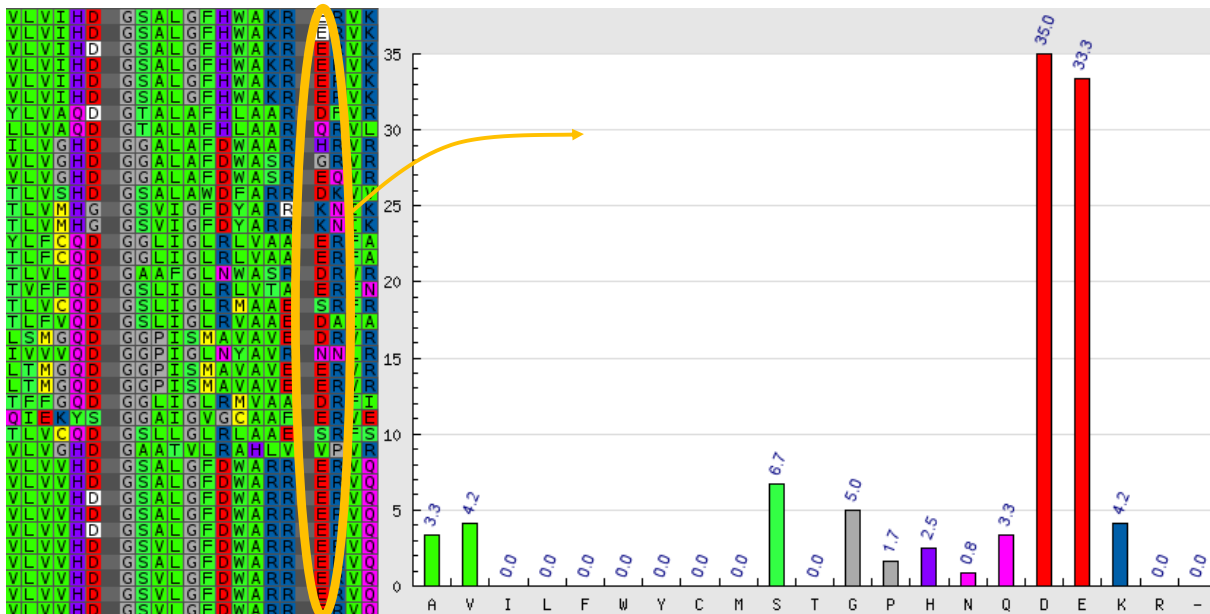


Abb. 4: Die Abbildung zeigt einen 3DM Vergleich und die Aminosäureverteilung an der markierten Position.

Das Programm eignet sich zur Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung, also welche Funktion Aminosäuren in einer Enzymfamilie besitzen, die an der gleichen Position in der 3D Struktur liegen. Zudem ist es möglich mit dem Programm Aminosäuren für ein Protein Engineering auszuwählen, die sich auf eine bestimmte Eigenschaft auswirken.

davon aus, dass Aminosäuren, die am besten für eine bestimmte Aufgabe geeignet sind, im Verlauf der Evolution durchgesetzt werden. Vergleicht man beispielsweise alle Enzyme mit einer bestimmten Eigenschaft untereinander, können Rückschlüsse auf essentielle Aminosäuren getroffen werden, die für diese Eigenschaft benötigt werden. Eine Aminosäure X zum Beispiel in allen thermostabilen Enzymen vorhanden, könnte man davon ausgehen, dass sie für die Thermostabilität wichtig ist. In einem Experiment könnte man erfolgreich diese Aminosäuren in ein zu veränderndes Enzym integriert werden, um dieses zu verbessern.^[9,10]

1.1.2 Mutagenesemethoden

Neben der Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren ist die Erstellung einer Mutantenbibliothek, die eine ausreichend hohe Anzahl an Mutationen und eine gleichmäßige Verteilung dieser Mutationen im Gen besitzt, eine der wichtigsten Arbeitsschritte des Protein Engineerings. Neben *in vivo* Methoden zur Erstellung einer Mutantenbibliothek ermöglichen *in vitro* Ansätze in der Regel eine spezifischere Mutagenese. *In vitro* Methoden haben den Vorteil, dass sie im Allgemeinen nur den zu untersuchenden Genabschnitt mutieren und ohne Zellkultur durchgeführt werden können. Die fehlerbehaftete PCR (epPCR) ist eine der gängigsten Methoden, welche im Gegensatz zu Standard-PCR eine Polymerase ohne Korrekturlesefunktion ist, die Taq-Polymerase, sowie ein Ungleichgewicht in der Verteilung der dNTPs und $MgCl_2$ verwendet.^[15] Die klassische PCR hat einige Nachteile, wie das *error bias* etablierter Polymerasen, die je nach Polymerase ein unterschiedliches Spektrum an Mutationen bevorzugen. Ein weiterer Nachteil ist das *codon bias*, das heißt die geringe Wahrscheinlichkeit, dass bedingt durch den degenerierten genetischen Code Aminosäuren gleichmäßig ausgetauscht werden.^[16] Eine Alternative zur epPCR ist die sequentielle Sättigungsmutagenese (SSAM), welche einen Pool aus DNA Fragmenten unterschiedlicher Länge generiert, den anschließend enzymatisch eine Universalbase Desoxyinosin angefügt wird. Die Fragmente werden Wildtypgen als Template in einer PCR zur Gengröße amplifiziert. Dabei wird das Desoxyinosin durch eine der vier Standardbasen ersetzt.^[17] Neben den fehlerbehafteten PCR gibt es rekombinierende Methoden wie das DNA Shuffling^[18] bei dem die DNA von homologen Enzymen partiell mit DNase I verdaut wird, um die entstehenden Teile anschließend mittels homologer Rekombination zu einem chimären ZGammazuzufügen. Weitere Alternativen für eine

erfolgreiche Rekombination möglichst homologes in Genen anderer Arten^[19,20]
 SCRATCHY,^[21] RACHITT^[22] und StEP^[23]

In vivo Mutagenesemethoden sind im Gegensatz zu *in vitro* erzeugten Mutationen in der Regel unspezifischer. Das gesamte Genom des Organismus wird durch chemische Substanzen wie beispielsweise MMS^[24] oder EMS^[25] UV-Licht oder radioaktiver Strahlung mutiert. Diese klassischen *in vivo* Methoden wurden nach und nach durch Mutatorstämme oder Mutatorplasmide ergänzt, welche im Falle des *Epicurian coli* Mutatorstammes ein fehlerhaftes DNA-Reparatursystem (mutD, mutS und mutT) besitzen.^[26] Eine Alternative zu den Mutatorstämmen sind Mutatorplasmide, welche im Beispiel des pMutE fehlerhafte Untereinheit der DNA-Polymerase III mutD5 integriert haben. Wird diese fehlerhafte Untereinheit der Polymerase III vom Mutatorplasmid exprimiert, steht sie in direkter Konkurrenz mit der genomischen Untereinheit und führt zu einer fehlerbehafteten DNA-Polymerase III.^[27] Das Mutatorplasmid pEP enthält hingegen eine defekte DNA-Polymerase I, welche fehleranfällig ist.

Die DNA-Polymerase I wird auch für die Replikation von Plasmiden mit einem ColE1 Replikationsursprung benötigt. Ein Zielgen, welches hinter einem ColE1 Replikationsursprung kloniert wurde, wird von dieser fehleranfälligen Polymerase repliziert. In Kombination mit dem *E. coli* JS200 Stamm, der bei 42°C keine genomische DNA-Polymerase I mehr bilden kann, ist es möglich Mutationen im Zielgen durch die fehleranfällige DNA-Polymerase I des Mutatorplasmids zu induzieren. Dabei induziert die fehleranfällige Polymerase I die Replikation des Plasmids, während bei 42°C nur noch die fehleranfällige Polymerase I exprimiert wird. Das Zielgen mutiert in diesem Fall zu jeder Replikation des Plasmids (Abb. 5).^[28]

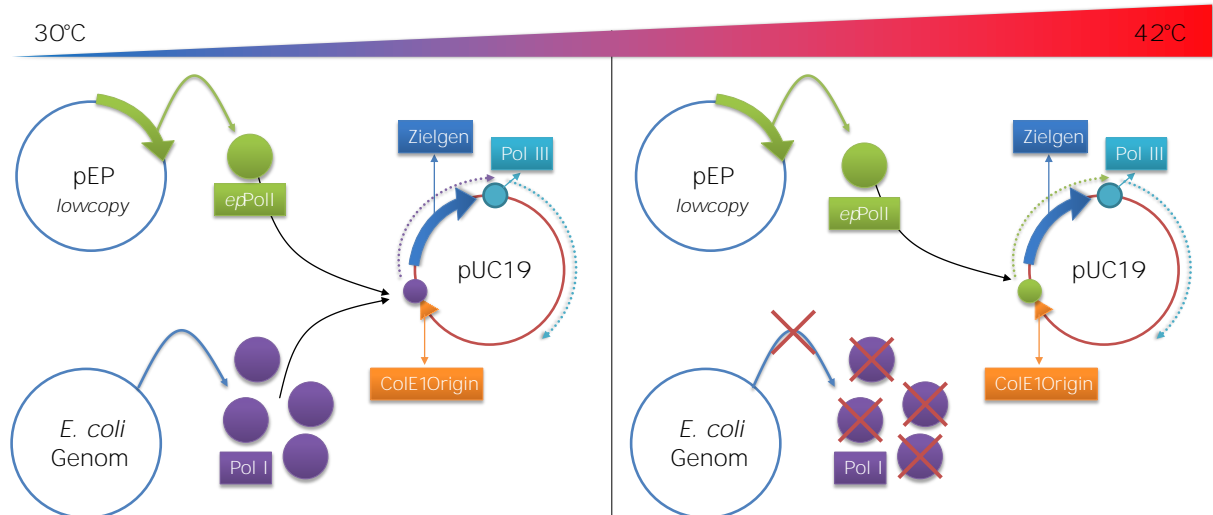


Abb. 5: Die Abbildung zeigt die Funktionsweise des Mutatoplasmas pEP. Das Plasmid pUC19 enthält das zu mutierende Zielgen hinter dem ColE1-Origins. Die genomische Polymerase I (violett) wird bei 42°C nicht mehr von *colIS200* exprimiert und somit von *efPoll* des pEP ersetzt. Das Zielgen wird in diesem Fall von der fehleranfälligen Polymerase I repliziert und somit mutiert. Nach ungefähr 1000 bp wird die Polymerase I von der Polymerase III ersetzt.

Ein rationales Design ist mit Methoden wie ProSAR, iterative Sättigungsmutagenese (ISM)^[30] oder CASTing^[31] möglich. ProSAR untersucht die Struktur-Funktionsbeziehungen mittels eines Algorithmus und erstellt eine Mutantenbibliothek basierend auf den zur Verfügung stehenden Informationen. Zur Anwendung der kombinatorischen Sättigungsmutagenese CASTing werden Aminosäuren ausgewählt, die für eine bestimmte Fragestellung, wie die einer verbesserten Bindung des Substrates, notwendig sind. Diese werden im Anschluss simultan mutiert. Bei der iterativen Sättigungsmutagenese werden Positionen im Enzym ausgewählt, die die zu verändernde Proteineigenschaft beeinflussen (*hot spots*), und mit allen Aminosäuren gesättigt. Dabei können mehrere Positionen gleichzeitig gesättigt werden. Die beste Variante des besten Mutagenesezyklus wird dabei für den nächsten Zyklus als Template verwendet, um das Enzym stetig zu verbessern. Nacheinander werden somit alle ausgewählten Positionen, wobei immer die beste Variante als Basis für die nächste Mutagenese dient. Durch die Kombination der Einzelsubstitutionen werden additive Effekte der Mutationen über den Bereich der Mutagenese hinweg erzielt. Die Mutagenese wird mit Oligonukleotiden durchgeführt, die homolog zum mutierenden Bereich sind und ein degeneriertes Codon an der zu mutierenden Position besitzen. Die 4 (3) Codons zu ermöglichen kann das NNN (N: Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin) verwendet werden. Optimierte Codons, wie das NNK Codon (K: Guanin oder Thymin), verringern die

Anzahl der entstehenden Varianten von 64^3 (auf 3) pro Codon, enthalten aber auf Grund des degenerierten Aminosäurecodes alle 20 Aminosäuren. Wenn mehr als eine Position gleichzeitig gesättigt, kann der Durchmusterungsaufwand durch die Wahl eines optimierten Codons deutlich reduziert werden. Reetz schlägt des Weiteren die Verwendung des NDT-Codons (D: Adenin, Guanin, Thymin; T: Thymin) vor, welches für nur zwölf Aminosäuren kodiert, aber alle chemisch-physikalischen Eigenschaften der Aminosäure seitenkettenrepräsentiert. Somit kann die Anzahl der zu durchmusternden Varianten bei drei gleichzeitig mutierten Positionen von fast 100000 (NNK-Codon) auf rund 5000 (NDT-Codon) Klone gesenkt werden (Tab. 1).^[32]

| Tab. 1: Benötigter Durchmusterungsaufwand um 95% der Bibliothek abzudecken nach Reetz et al. ^[32] | | | | |
|--|-----------|--------------------------|-----------|--------------------------|
| Anzahl an Positionen | NNK-Codon | | NDT-Codon | |
| | Codons | Benötigte Transformanten | Codons | Benötigte Transformanten |
| 1 | 32 | 94 | 12 | 32 |
| 2 | 1028 | 3066 | 144 | 430 |
| 3 | 32768 | 98163 | 1728 | 5175 |
| 4 | 1048576 | 3141251 | 20736 | 62118 |

Zudem ist es möglich Primer zu erstellen, die für definierte Aminosäuren kodieren. Mit Programmieren wie CodeFinder^[33] können entsprechende Primer entworfen werden. Die Auswahl der Aminosäure, die ein Codon enthalten sollte, kann unter anderem mit Hilfe der 3DM-Bibliothek getroffen werden (Kapitel 1.1). Noch gezielter ist eine positionsspezifische Basensubstitution, bei der eine Aminosäure direkt eine andere substituiert wird.^[34]

Neben dem Austausch einzelner Aminosäuren ist auch das Verändern ganzer Loops, Helices oder Domänen eines Enzyms möglich. Um diese Mutation durchzuführen, werden synthetische Gene oder spezielle Methoden wie *splitting by overlap extension PCR*^[35] oder das *FastCloning*^[36] verwendet. Mit geeigneten Primern werden in unabhängigen h # k Fragment des zweiten Genes. Primer werden dabei so entworfen, dass sie Überhänge besitzen, die mit dem jeweils anderen Fragment homolog sind, damit sich die Fragmente aneinanderlagern können. Mit diesen Methoden können demnach chimäre Proteine aus zwei oder mehreren verschiedenen Proteinen erstellt werden (Abb. 6).

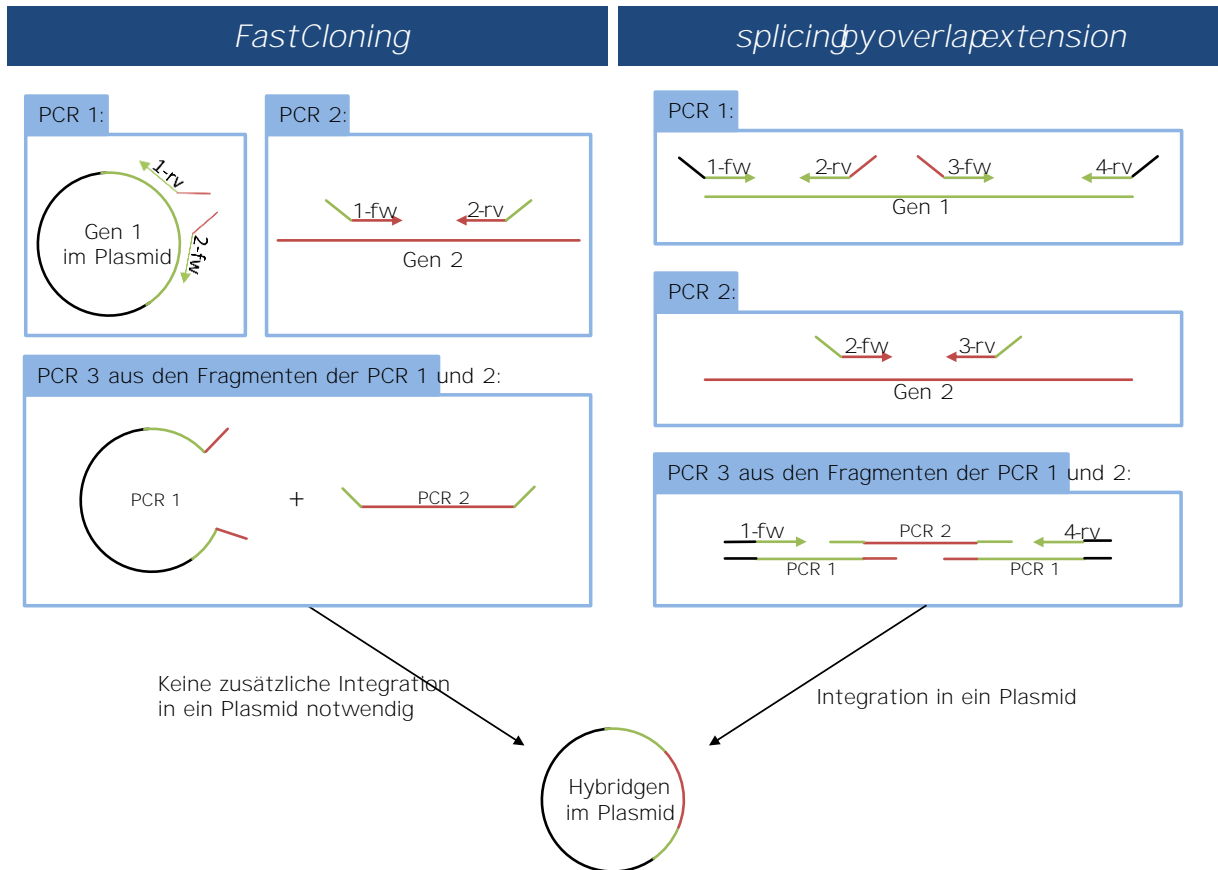


Abb. 6: Die Abbildung zeigt einen Vergleich und das Prinzip der beiden **FastCloning** und **splicing by overlap extension** zur Herstellung von chimären Enzymen: erstes Gen, rot: zweites Gen, schwarz: Plasmid.

Alle rationalen Methoden erfordern, wie schon erwähnt, Vorarbeiten, um die zu mutierenden Aminosäuren zu identifizieren. Nach Erzeugung der Bibliothek werden die Enzymvarianten je nach ihrer gewünschten Eigenschaft, wie Substratspezifität, Aktivität, Temperaturstabilität oder Enantioselektivität durchgemustert.

1.1.3 Konzepte zur Durchmusterung von Mutantenbibliotheken

Durch die vielen verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten der gerichteten Evolution ist es notwendig die Protokolle und Methoden für die Durchmusterung der Bibliotheken anzupassen und zu erweitern. Hierbei spielt nicht nur die Frage nach der gewünschten Veränderung des Proteins eine Rolle sondern auch wie viele Mutanten mit der Methode durchgemustert werden sollen. Auch die Sensitivität eines Assays muss werden, da schwach aktive Varianten unterschiedliche Bedingungen benötigen um Assay detektiert zu werden.

Während der Durchmusterung von Bibliotheken mit rationalem Proteindesign erstellt werden, so gering sein kann, dass die einzelnen Mutanten direkt mittels MS/MS oder ITC nach dem gewünschten Substratumsatz oder der Enantioselektivität untersucht werden können, ist der Aufwand zufallsbasierter Bibliotheken oft so groß, dass besondere Methoden erforderlich sind. GC- und HPLC- und chromatographische Verfahren, mit denen die Enantioselektivität oder spezifische Aktivität über den Substratumsatz und gebildeten Produkt berechnet werden kann. Die ITC gleicht die Wärmefreisetzung bzw. den Verbrauch während der enzymatischen Reaktion aus. Im Anschluss kann die spezifische Aktivität aus dem entsprechenden Energieunterschied berechnet werden.^[37]

Überschaubare Bibliotheken können mit Mikrotiterplatten oder Agarplattenassays durchmustert werden, während Bibliotheken mit mehreren Millionen Phage-Display-Techniken^[39] oder durchflusszytometerbasierten Konzepten^[40] benötigen. Man unterscheidet im Allgemeinen zwischen einer Durchmusterung und einer Selektion von Bibliotheken. Bei der Durchmusterung werden vor allem Farbstoffe oder Sensoren verwendet, die durch die Katalyse des Enzyms gesetzt werden, während Selektionen über einen natürlichen evolutionären Druck durch das Setzen von Wachstumssubstraten oder der Egtung von toxischen Substanzen^[18] die gewünschten Mutanten selektieren.

Neben Umbelliferonen eignen sich für die Durchmusterung insbesondere Nitrophenole für Mikrotiterplattenassays. Zum Beispiel Nitrophenolat eine intensive Farbaufweist. Dieser Assay wird unter anderem für die Durchmusterung von Esterasen verwendet, wobei die Esterasen den *p*-Nitrophenyl-ester hydrolysiert und die Absorption des Produktes bei 410 nm gemessen werden kann (Abb. 7).^[41]

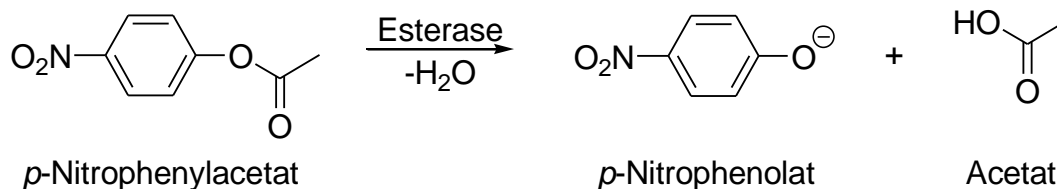


Abb. 7: Die Abbildung zeigt das Prinzip des Nitrophenolassays. Das Enzym katalysiert die Reaktion vom Screeningsubstrat Nitrophenylacetat zum gelben Farbstoff Nitrophenol, welches ein Absorptionsmaximum bei 410 nm aufweist.

Ein weiterer Farbstoff, der zur Detektion geeignet ist, ist Adrenochrom. Setzt eine Epoxidhydrolase ihr Substrat um, entsteht ein Diol, welches durch Natriumperiodat oxidiert wird. Das nicht

umgesetzte Natriumperiodat kann durch einen Farbstoff Adrenochrom oxidiert werden.^[42]
 Durch diese Rücktitration lässt sich die Aktivität des Enzyms (Abb. 8) schätzen.

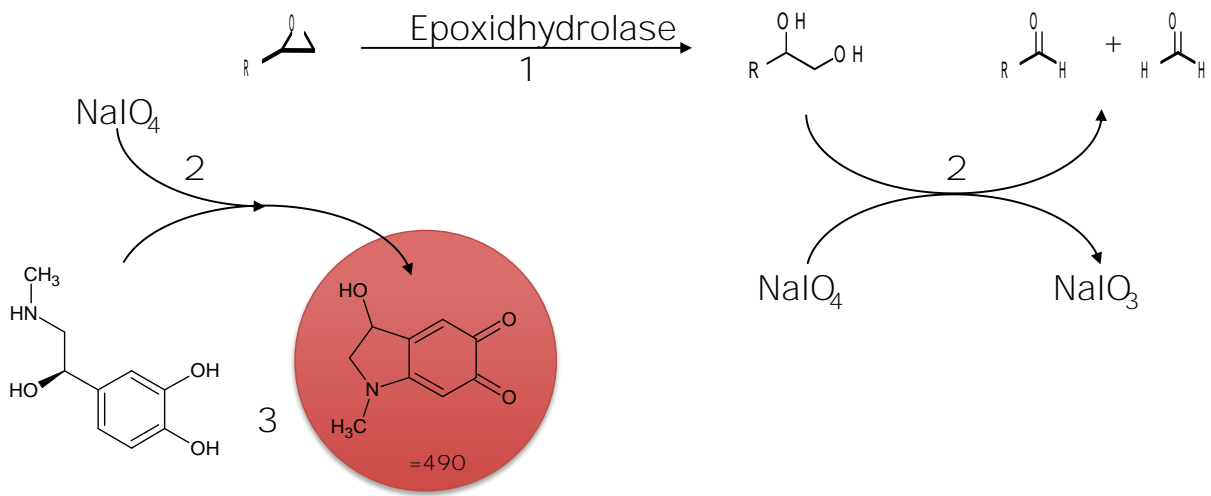


Abb. 8 Die Abbildung zeigt das Prinzip des Adrenalinassays. (1) Inkubation des Epoxidhydratasesubstrates mit Enzymvarianten (2) Verbrauch des Natriumperiodats durch Reaktion mit dem resultierenden Diol, welches bei aktiven Enzymen erfolgt (3) Reaktion des Adrenalins zu Adrenochrom bei inaktiven Mutanten, welche das Natriumperiodat nicht verbraucht haben

Weitere Assaysysteme detektieren durch einen Indikator Phenolrot, Säure oder Basen die durch eine Enzymreaktion gebildet werden. So können unter anderem Haloalkandhalogenasen, welche ein Haloalkan zu einem Alkan und einer Säure hydrolysieren durch den Phenolrotassay detektiert werden.^[43]

Um eine noch größere Anzahl an Klonen durchmusteren kann die Technik der Durchflusszytometrie verwendet werden. Sekundär fließen mehrere tausend Zellen einzeln durch eine Kapillare und werden von einem Laser angeregt. Detektoren verarbeiten unter anderem das Vorwärtsstreulicht (FSC), welches die Beugung des Lichts im flachen Winkel misst und damit ein Maß für das Volumen der Zellen ist. Das Seitwärtsstreulicht analysiert die Brechung des Lichts im rechten Winkel und ist ein Maß für die Größe der Struktur des Zellkerns, sowie der Granularität der Zelle. Die für die Assays in der FACS relevante Fluoreszenz wird durch fluoreszierende Farbstoffe emittiert, die Zellbestandteile binden oder durch fluoreszierende Antikörper, die mit Zellbestandteilen interagieren. Zur Differenzierung von vitalen und toten Zellen werden oft die Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid^[44] und DAPI^[45] oder SYTO 9 eingesetzt. In Kombination mit einer Display Methode, bei der die Phänotypen von Proteinen an ihren Genotyp gekoppelt sind und frei auf einer Oberfläche präsentiert werden, ist es möglich über immobilisierte Liganden

Fluoreszenzmarker die gewünschten Proteine zu selektieren. Das Durchflusszytometer konnte gerade in Verbindung mit *in vitro* Kompartimentalisierung zur Erzeugung neuer Assaysysteme verwendet werden, bei denen Wasser-Öl Emulsionen erzeugt, wobei in jedem Kompartiment statistisch ein Genotyp vorhanden ist. Durch *in vitro* Translation der Gene kommt es zu einer Verknüpfung des Genotyps mit dem Phänotyp. Durch fluoreszierende Substrate bzw. Produkte können aktive von inaktiven Enzymvarianten im Durchflusszytometer getrennt werden. Mit dieser Kombination von *in vitro* Kompartimentalisierung und Durchflusszytometer ist ein sehr hoher Durchsatz von Mutanten in kurzer Zeit möglich.^[46]

Eine wichtige, aber oft schwer zu selektierende Eigenschaft ist die Enantioselektivität. In biologischen Systemen gibt es viele chirale Verbindungen, und die Enantiomere eine unterschiedliche physiologische Wirkung besitzen können. Das kann gerade in der Entwicklung von Medikamenten zu Problemen führen, da ein (*S*)-Enantiomer eine andere physiologische Wirkung haben kann als das (*R*)-Enantiomer. Hier ist es erwünscht, möglichst enantiomerenreine Produkte herzustellen. Die Durchmusterung von verbesserter Enantioselektivität erwies sich in der Vergangenheit als materialaufwendig, auch wenn es Konzepte gibt, welche durch Hochdurchsatzscreening und Verwendung von pseudoenantiomeren Substraten den Aufwand verringern. Ein Mikrotiterplattenassay, welcher Resorufin als Farbstoff verwendet, wurde zur Detektierung von enantioselektiven Esterasevarianten verwendet, die Phenylbuttersäureester umsetzen. Dabei wird die scheinbare Enantioselektivität gemessen, indem der Umsatz des (*S*)-Enantiomers getrennt vom (*R*)-Enantiomer gemessen wird.^[47] Die 3-Phenylbuttersäure wurde im Experiment mit dem *p*-Nitrophenolat verestert und ist somit eine weitere Möglichkeit nach enantioselektiven Esterasen durchzumustern. Um den Aufwand zu verringern, ist die Kombination von zwei Pseudoenantiomeren, wovon eines nach der Enzymreaktion als Wachstumsquelle genutzt werden kann und das andere toxisch auf die Zelle, einwirkt möglich.^[48,49] In Kombination mit einem Durchflusszytometer konnte dieses Prinzip optimiert werden, da Zellen, die das toxische Produkt freisetzen beschädigt werden und durch Farbstoffe wie Propidiumiodid angefärbt werden können. Vitale Zellen werden durch Lebendfarbstoffe wie SYTO® 9 gegengefärbt, so dass die Zellen im Anschluss mittels Durchflusszytometer nach ihrer Fluoreszenz getrennt werden können.^[50]

Neben dem Assay ist auch die Auswahl des Substrates von besonderer Bedeutung, da nicht die realen Substrate sondern Ersatzsubstrate, welche einen Farbumsatz oder eine Selektion ermöglichen, verwendet werden. So wurde zum Beispiel in Experimenten der gerichteten Evolution eine Sialinsäurealdolase mutiert und mit dem Ziel Sialinsäure zu synthetisieren eingesetzt. Es wurde eine Sialinsäurealdolase gefunden, die eine 7,4-fach erhöhte katalytische Effizienz gegenüber dem Substrat-KDO hatte, aber sogar eine verringerte Effizienz gegenüber Sialinsäure.^[51] Dieses Beispiel verdeutlicht das Gesetz der gerichteten Evolution 'what you screen for' von Arnold^[51] aufgestellt wurde und bedeutet, dass man nur die Enzyme findet nach denen man sucht.

1.2 α -Hydrolasefaltungsenzyme

Die Gruppe der α -Hydrolasefaltungsenzyme besteht aus strukturverwandten Enzymen, welche vermutlich von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen und sich somit durch eine konvergente Evolution entwickelt haben. Ihre Struktur ist so konserviert, um die Anordnung der katalytischen Triade zu gewährleisten. Die katalytische Triade besteht aus einem Nukleophil (Serin, Cystein oder Aspartat), einer katalytischen Base (Histidin) und einer katalytischen Säure (Aspartat oder Glutamat).^[53] Obwohl die Enzyme der α -Hydrolasefaltungsenzyme ihrer Struktur sehr ähnlich sind, besitzen sie die unterschiedlichsten katalytischen Aktivitäten. Enzymen wie Acetylcholinesterasen, Dienolactonhydrolasen, Lipasen, Thioesterasen, Serincarboxypeptidasen, α -Proliniminidase, peptidasen, Prolinoligopeptidasen, Haloalkandehalogenasen, Haloperoxidasen, Epoxidhydratase, hydrolasen, Hydroxynitriliasen und viele weitere.^[54]

Die α -Hydrolasefaltungsenzyme besitzen eine charakteristische Faltung, die aus einem α -Strang, einem β -Strang und einem β -Strang besteht, welche mit Ausnahme des β -Strangs parallel verlaufen und bis auf den β -Strang durch eine β -Helix getrennt werden. Diese Faltungsstruktur befindet sich in der überwiegend konservierten *Main*-Domäne dieser Enzyme. Die variable *Cap*-Domäne ist vor allem für die Substratspezifität und katalytische Reaktion wichtig (Abb. 9).^[55]

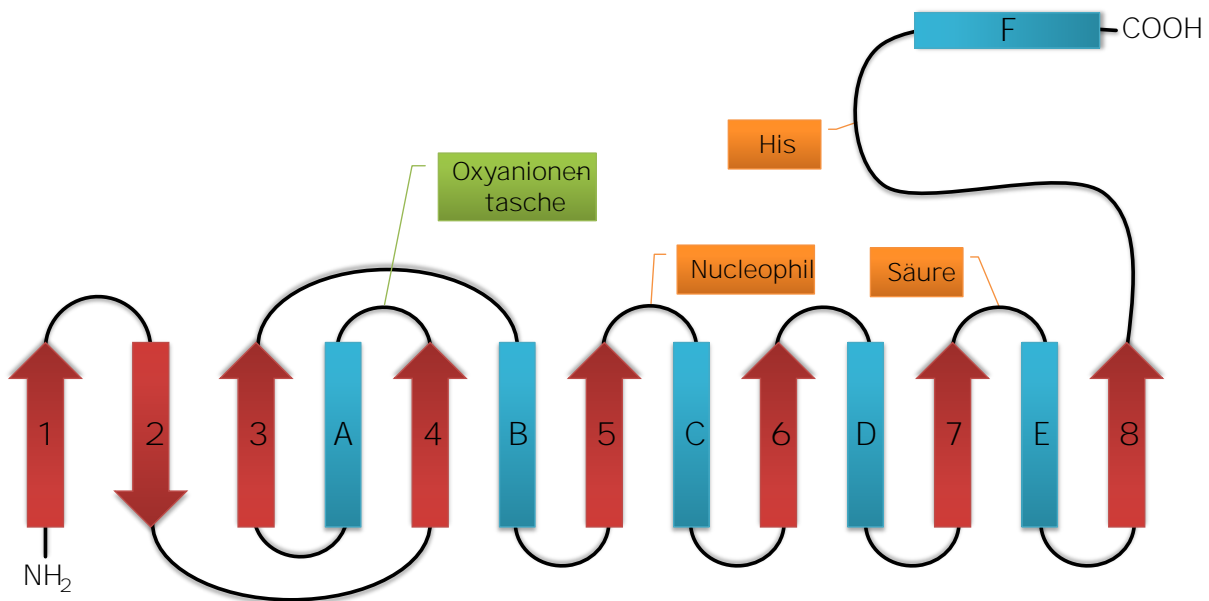


Abb. 9. Die Abbildung zeigt die Struktur von α -Hydrolasefaltungsenzymen, welche aus acht α -Strängen (1-8) und fünf α -Helices (A-E) besteht. Orange: katalytische Triade; grün: Oxyanionentasche.

Einige Enzyme aus der Gruppe der α -Hydrolasefaltungsenzyme besitzen zudem eine natürliche geringe katalytische Promiskuität (Kapitel 1.4). Zum Beispiel kann die *Pseudomonas aeruginosa* Amide hydrolysieren.^[54] Ein weiteres Beispiel ist die C-Hydrolase MhpC aus *E. coli*, welche eine Esterase und eine Thioesteraseaktivität aufweist.^[57]

1.2.1 Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1)

Carboxylesterasen sind weitverbreitete Enzyme, die ubiquitär vorkommen. Ihre physiologische Funktion umfasst unter anderem die Detoxifizierung von Xenobiotika im menschlichen Körper oder die Freisetzung von Kohlenstoffquellen durch den Abbau von Hemicellulosen.^[58] Sie katalysieren die Hydrolyse von O-Bindungen von Carbonsäureestern.

Die bakterielle Esterase BS2 aus *Bacillus subtilis* und PFE I aus *Pseudomonas fluorescens* wurden gut untersucht. So konnte für die PFE I die Enantioselektivität gegenüber Methylbrom-2-methylpropionat^[61] oder But-3-in-2-ol^[62] verbessert werden. Die katalytische Triade der PFE I besteht aus D222 und H251. Die Aminosäuren W28 und M95 bilden eine Oxyanionentasche, die über Wasserstoffbrücken das Substrat während der Katalyse stabilisiert. Die Reaktion beginnt mit einem nukleophilen Angriff des Serins,

welches durch Histidin und Aspartat aktiviert wurde. Im Folgenden bildet sich ein tetraedrischer Zwischenzustand. Durch die anschließende Freisetzung des Alkohols entsteht ein Acylenzymintermediat. Ein zweiter tetraedrischer Zwischenzustand entsteht durch den Angriff eines von Histidin und Aspartat oder Glutamat aktivierten Wassermoleküls auf das Carbonylkohlenstoffatom. Zum Schluss wird die Acylgruppe freigesetzt (Abb. 10).^[63]

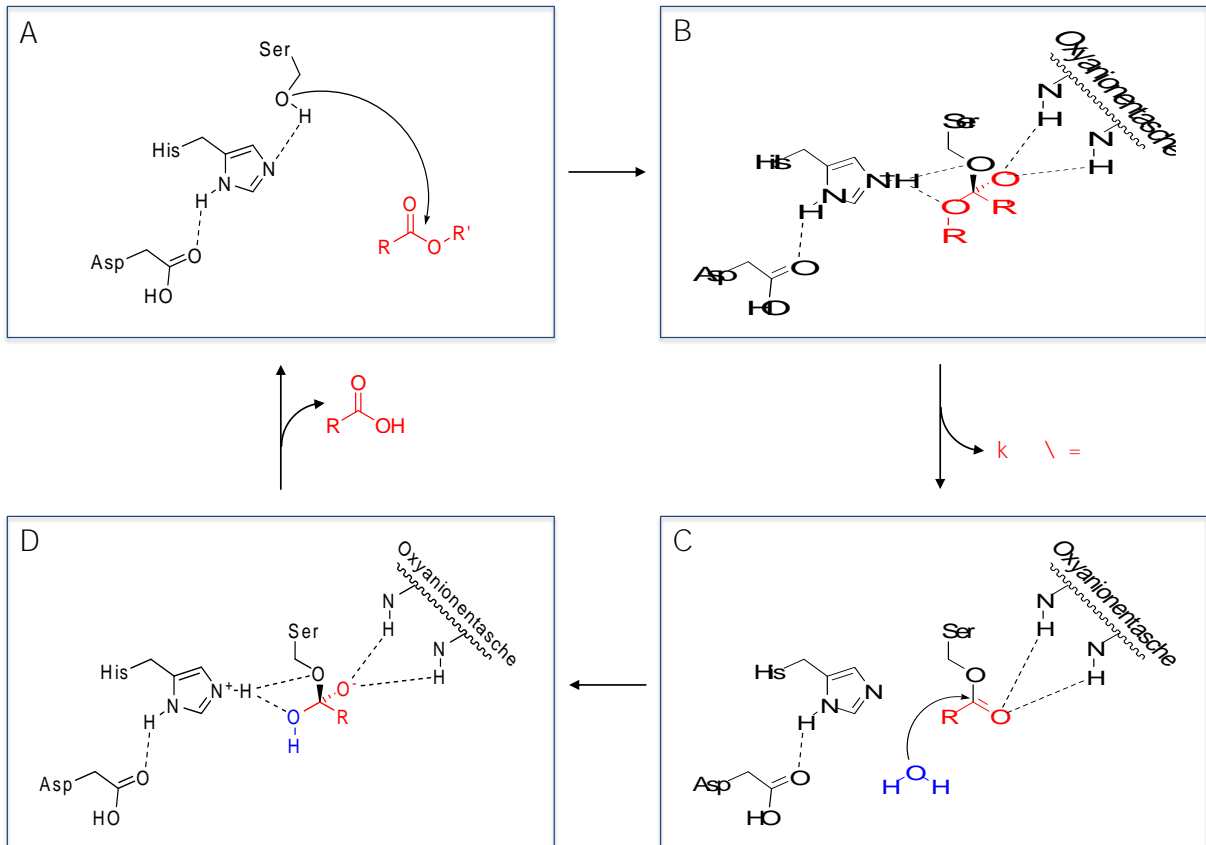


Abb. 10 Die Abbildung zeigt den Reaktionsmechanismus von Carboxylesterase. A: Nucleophiler Angriff des Serins auf die Carbonylgruppe des Esters. B: Tetraedrischer Zwischenzustand, stabilisiert durch die Oxyanionentasse und Histidin. C: Bildung des kovalent gebundenen Acylenzymkomplexes durch Abspaltung des Alkohols. D: Ein Wassermolekül greift das Carbonylkohlenstoffatom an. Bildung des zweiten tetraedrischen Zwischenzustand und Freisetzung der Acylgruppe.

Neben Esterasen können auch Lipasen Ester hydrolysieren, wobei Lipasen wasserunlösliche Ester bevorzugen. Ein Vorteil von Lipasen ist vor allem das größere Substratspektrum, welches neben natürlichen Estern auch xenobiotische Substrate einschließt. Während Esterasen eine Michaelis-Menten Kinetik aufweisen, blockiert ein Deckel Lipasen das aktive Zentrum. Erst bei hoher Substratkonzentration können sich Mizellen bilden, was einer Öffnung des Deckels führt und die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Dies wird auch als Grenzflächenaktivierung bezeichnet.^[64] Wegen ihrer Kofaktorunabhängigkeit und

ihrem breiten Substratspektrum werden Lipasen und Esterasen sehr häufig in industriellen Prozessen eingesetzt.^[65,66]

1.2.2 Epoxidhydrolase (EC 3.3.2.3)

Eine weitere Enzymklasse aus der Hydrolasefamilie ist die der Epoxidhydrolasen. Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse von Epoxiden, welche reaktive elektrophile und größtenteils toxische Substanzen sind. Die physiologische Funktion dieser Enzyme im Organismus ist somit die Detoxifizierung von Umweltschadstoffen. Sie kommen in Pflanzen,^[68] Insekten,^[69] Bakterien,^[70] filamentösen Pilzen^[71] und Säugetieren^[72] vor. Die Reaktion der gut untersuchten Epoxidhydrolase ChA aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 beginnt mit einem Angriff des nukleophilen D107 auf das primäre Kohlenstoffatom des Substrats unter Bildung einer Esterbindung. Anschließend wird die Esterbindung von dem durch H275/D246 aktivierte Wasser hydrolysiert. F108 interagiert während der Reaktion mit dem Epoxidring und hat vermutlich eine stabilisierende Wirkung. Die beiden Tyrosine Y152 und Y215 dienen der Substratbindung, der Stabilisierung des Zwischenzustandes und der Protonierung des Epoxidsauerstoffs.^[67,74]

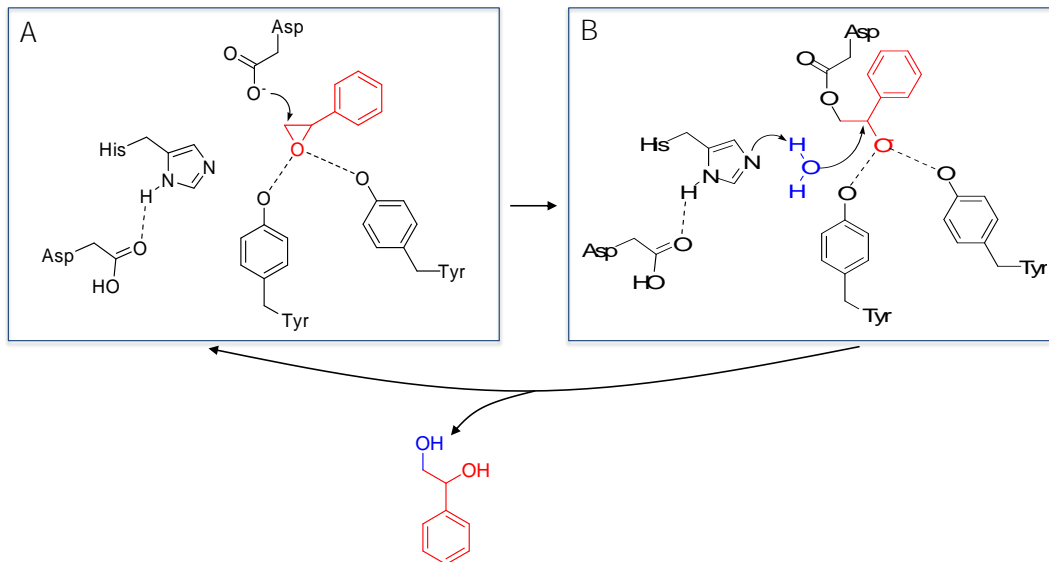


Abb. 11: Die Abbildung zeigt den Reaktionsmechanismus von Epoxidhydrolase. A: Nukleophiler Angriff der Asparaginsäure auf das Epoxid und Stabilisierung des Epoxids durch die beiden Tyrosinreste. B: Bildung eines Glycol-Ester-Intermediats und Angriff des durch Histidin und Aspartat aktivierten Wassers auf das Intermediat. Anschließend wird das Diol aus dem Enzym entlassen und ein neues Substrat kann binden.

Die Reaktion der Epoxidhydrolasen kann enantioselektiv sein. In der Regel wird das sterisch weniger gehinderte Carbonylatom nukleophil angegriffen, die Konfiguration

erhalten bleibt (Retention). In einigen Fällen wird auch das Stereozentrum angegriffen, was zu einer Inversion der Konfiguration führt. Dadurch ist es möglich eine enantiokonvergente Synthese von Feinchemikalien durch Epoxidhydrolasen durchzuführen. Ein Epoxidhydrolase, die aus einer Mungbohne isoliert wurde (mbEH A) greift das (S)-Enantiomer des Nitrostyroxid hauptsächlich am Benzylkohlenstoff an, was zu einer Inversion der Konfiguration führt. Das (R)-Enantiomer dieses Substrats wird bevorzugt am terminalen Kohlenstoffatom angegriffen, was zu einer Retention der Konfiguration führt. In beiden Fällen wird also das (S)-Enantiomer des Produktes gebildet, was zu einer theoretischen Ausbeute von 100%^[75]. Auch wegen dieser Eigenschaft werden Epoxidhydrolasen in Experimenten der gerichteten Evolution verwendet, um ihre Eigenschaften zu verändern.^[76]

1.2.3 Haloalkandehalogenasen (EC 3.8.1.5)

Neben den Haloalkandehalogenasen gibt es Halocarbonsäuredehalogenasen, 4-Chlorbenzoyl Coenzym A Dehalogenase, Haloalkoholdehalogenasen und 3-Chloracrylsäuredehalogenasen.^[77] Die Haloalkandehalogenasen werden in drei phylogenetische Unterfamilien gegliedert: HLDI, HLDII und HLDIII, welche sich in der Zusammensetzung der katalytischen Pentade und der Domäne unterscheiden.^[78] Sie katalysieren die Hydrolyse von chlorierten, bromierten oder iodierten Alkanen, Cykloalkanen, Alkoholen, Carboxysäuren, Estern, Ethern, Epoxiden, Amiden und Nitrilen.^[79] Ihre physiologische Funktion ist unter anderem das Verwerten von halogenierten Verbindungen als Kohlenstoffquelle. In der Industrie können Haloalkandehalogenasen zum Beispiel für eine Dehalogenierung von toxischen Chemikalien, wie dem 1,2-Dichlorpropan verwendet werden, das während chemischer Synthesen entsteht. Modifizierte Dehalogenasen ermöglichen des Weiteren die Bildung enantiomerenreinem Epichlorhydrin, welches als Vorstufe zur Synthese weiterer Feinchemikalien verwendet wird.^[33] Durch Halotags kann eine Dehalogenase, die eine Mutation in der katalytischen Base besitzt, mit chlorierten Liganden kovalent binden und somit Cell Imaging und Proteinanalysen verwendet werden.^[80]

In dieser Arbeit wird die Haloalkandehalogenase des Typs HLD von *Xanthobacter autotrophicus* SJ10, welche durch Bukinget al.^[81] erstmalig charakterisiert wurde, durch Protein Engineering verändert. Das aktive Zentrum dieser Dehalogenase liegt zwischen der

Main- und Cap-Domäne. Es besteht aus einem nukleophilen Aspartat, einem angrenzenden Histidin, welches als katalytische Base agiert und einem weiteren Aspartat, welches als katalytische Säure agiert. Die Reaktion beginnt mit einem nukleophilen Angriff des Carboxylsauerstoffatoms vom D124 auf das Kohlenstoffatom des Substrates an dem das Halid gebunden ist, wodurch ein Alkylesterkomplex entsteht. Das Sauerstoffatom des Alkylesterkomplexes wird durch das Aspartat bereitgestellt, und wird durch Serinhydrolyse durch das Substrat abgespalten. Das abgespaltene Halid wird von den beiden Tryptophanresten W125 und W175 gebunden bzw. stabilisiert. Der Alkylesterkomplex wird unter Mithilfe von D260 durch Aktivierung eines Wassermoleküls hydrolysiert. Abschließend wird das entstehende Alkohol freigesetzt (Abb. 12). Das Aspartat D260 stabilisiert während der Reaktion unter anderem die positive Ladung des H289. Die Oxyaniontasche, welche durch die Aminosäuren E56 und W125 gebildet wird, bindet das zweite Sauerstoffatom des Substrates und verhindert damit eine Interaktion mit dem Substrat um einen stabileren Komplex zu bilden.

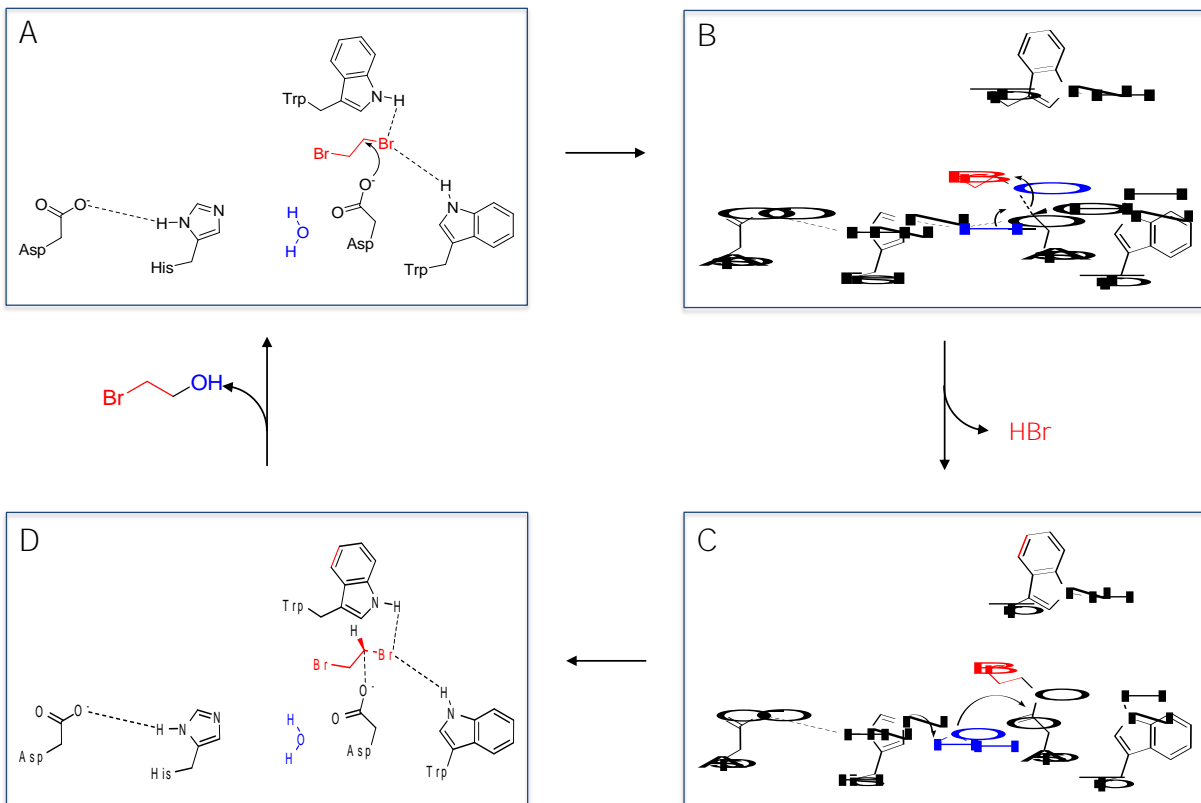


Abb. 12 Die Abbildung zeigt den Mechanismus von Dehalogenase: A: Stabilisierung des Substrates durch die Tryptophanreste, B: Bildung eines kovalent gebundenen Esterintermediats durch den nukleophilen Angriff des Substrats auf das Kohlenstoffatom des Substrats, wobei ein Bromidion abgespalten wird, C: Aktivierung des Wassermoleküls durch das Aspartat, D: Freisetzung des Alkohols.

Weitere Dehalogenasen des Typs I sind unter anderem DhaA *Plesiocystis pacifica* SIR1 oder DhaA aus *Mycobacterium avium*. Neben den Haloalkandehalogenasen des Typs I gibt es mit DhaA oder LinB Haloalkandehalogenasen, die als katalytische Säure Glutamat verwenden, welches nicht das Aspartat in der Cap-Domäne (-Strang 7), sondern vor der Cap-Domäne (-Strang 6) integriert ist. Die zweite Aminosäure am N-Ende des Substrates ist kein Tryptophan, welches in der Cap-Domäne befindet, sondern ein Asparat, welches in der Cap-Domäne-Helix 1 positioniert ist.

1.3 Kontinuierliche gerichtete Evolution

Neben der gerichteten Evolution (*in vitro* Evolution) bei der die Selektion nicht zeitgleich mit der Mutagenese stattfindet, wird in dieser Arbeit die *in vivo* oder kontinuierliche gerichtete Evolution angewendet. Die kontinuierliche gerichtete Evolution beschreibt die simultane Mutagenese und Selektion einer Mutantbibliothek. Als *in vitro* Evolution wird in dieser Arbeit die alleinige Selektion einer *in vitro* erzeugten Bibliothek bezeichnet. Vorteile einer kontinuierlichen gerichteten Evolution sind die Anreicherung von positiven Genvarianten während der Mutation und die zeitgleiche Benachteiligung der Varianten, welche eine unerwünschte Aktivität besitzen. Dadurch sollte nach einer gewissen Zeit die bestangepasste Variante des G-entstehen (Abb.13).

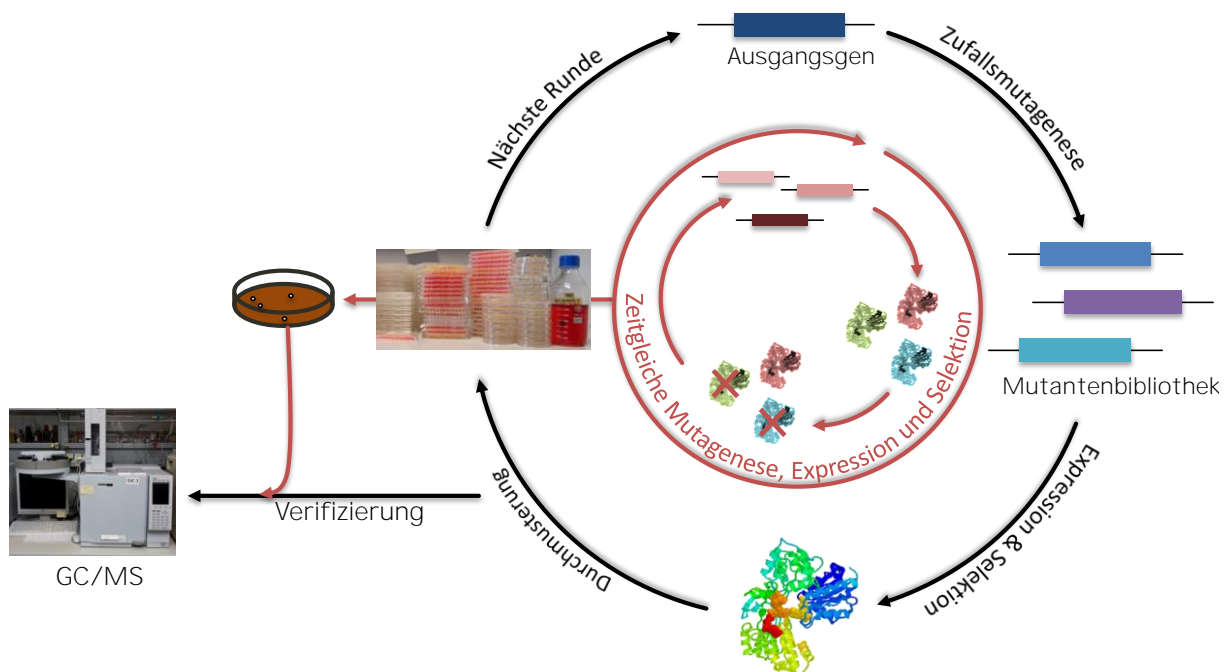


Abb. 13 Die Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen gerichteter Evolution (schwarzer Kreis) und kontinuierlicher gerichteter Evolution (roter Kreis).

Ein großer Vorteil einer kontinuierlichen Evolution ist, dass eine große Zahl von über 10⁹ Klonen gleichzeitig durchgemustert werden und dass mehrere Runden der Evolution in einem Ansatz durchlaufen werden können. Der letzte Punkt ist die Limitierung der klassischen gerichteten Evolution.^[91]

Mills et al. bewies, dass eine kontinuierliche Evolution im Labordie Effizienz von sich selbstständig replizierenden RNA-Moleküle stark verbessern kann. Nach einigen Zyklen verringerte sich die Größe RNA-Moleküls soweit, dass 80% Originalsequenz deletiert wurden, was zu einer schnelleren und effizienteren Selbstreplikation führte.^[91] Obwohl weitere Experimente der kontinuierlichen gerichteten Evolution mit RNA-Molekülen erfolgreich durchgeführt wurden,^[94] war eine Verbesserung von Enzymen eine industrielle Anwendung dieser Methode noch nicht möglich.

1.4 Promiskuität von Enzymen

Es gibt drei Arten enzymatischer Promiskuität: Konditions-, Substrat- und katalytische Promiskuität. Die Konditionspromiskuität beschreibt die Möglichkeit auch unter nicht natürlichen Bedingungen, wie extremen Temperaturen oder pH-Werten, sowie wasserfreie Medien eine Reaktion zu katalysieren. Besitzen Enzyme hingegen ein großes Substratspektrum, welches strukturell verschiedene Substrate abdeckt, man von Substratpromiskuität. Ein Enzym besitzt eine katalytische Promiskuität wenn es in der Lage ist unterschiedliche chemische Transformationen durchzuführen. Die katalytische Promiskuität ist ein Merkmal, welches natürlich vorkommt und

Promiskuität, welches durch Mutationen im Wildtyp generiert, vergrößert werden.^[93] Letztgenannte ist die Entwicklung von Biokatalysatoren mit neuen Eigenschaften von großer Bedeutung. Aber auch in der Natur ist katalytische Promiskuität für mehrstufige enzymatische Reaktionen notwendig. So katalysiert Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Synthase (HMG CoA Synthase) drei Reaktionen: einen Acetyltransfer, um das Acetyl-Enzym-Intermediat zu bilden, eine Chalkondensation und eine Hydrolyse der Acyl-Enzym-Thioesterbindung. Alle drei Reaktionen werden im gleichen aktiven Zentrum durchgeführt, wodurch nur ein Katalysator an Stelle von drei Enzymen benötigt wird.^[94]

In der Natur gibt es viele Enzyme, die mehrere Reaktionen katalysieren können. Diese natürliche Promiskuität zeigt sich in unterschiedlichster Weise katalytischen

Aminosäuren können wie beim Prolin-4-Oxalocrotonatautomere dieselben sein, auch wenn sie durch den unterschiedlichen Wert im Falle der natürlichen Reaktion die Rolle einer Base einnehmen und in der promiskuitiven Acylasereaktion als Nukleophil wirken.^[95] Gegensatz dazu ist das katalytische *Saccharomyces cerevisiae* Acylase B nur für die natürliche Reaktion von Bedeutung. Die promiskuitive Reaktion zur Bildung von C-C-Bindungen wird vor allem durch Oxyanionentasche katalysiert.^[96] Eine weitere Möglichkeit enzymatische Spezifität zu gliedern beruht auf der Unterscheidung, ob die Reaktion eine Änderung des Katalysemechanismus aufweist oder ob eine andere funktionelle Gruppe vom Enzym umgesetzt wird (Abb. 14).^[97]

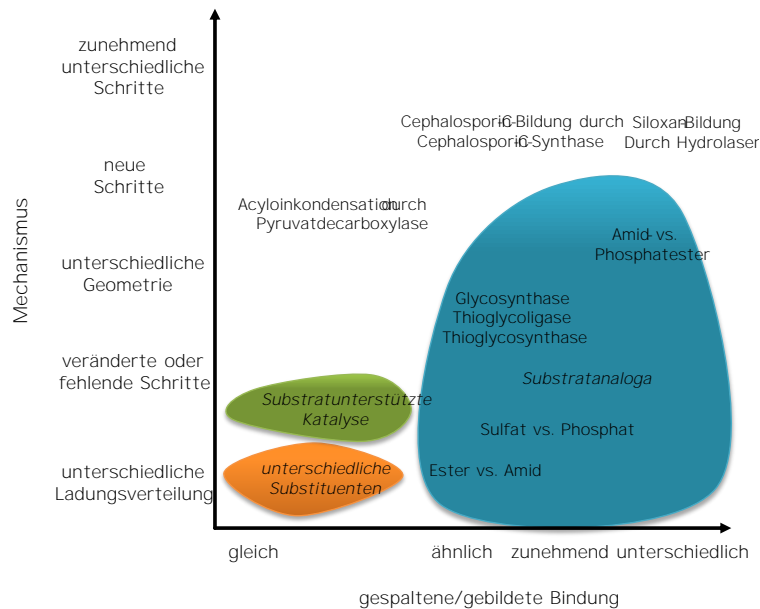


Abb. 14: Die Abbildung zeigt eine Einteilung der enzymatischen katalytischen Promiskuität nach Bornscheuer & Kazlauskas^[97] Untergliederung nach substratunterstützter Katalyse (grün), Katalyse mit unterschiedlichen Substituenten (orange) und Katalyse mit Substratanaloga (blau).

1.5 Erzeugung von *de novo* Aktivität in Enzymen

Neue Enzyme entwickeln sich der Theorie nach durch Mutationen, die die Basisfunktion des Proteins nicht beeinflussen. Kommt es dadurch zur Generierung einer neuen Aktivitätsfunktion kann es zu einer Genduplikation und weiteren Mutationen im Gen der Duplikation kommen, um das neue Enzym zu spezialisieren und die neue Funktion zu entwickeln.^[98] Dem gegenüber steht die Theorie, dass die Genduplikation Mutationen vorausgeht,^[99]

bei Mutationen die zu einem Funktionsverlust der Ursprungsaktivität führen dem Organismus zu ermöglichen ein aktives Originalenzym zu erhalten^[99]

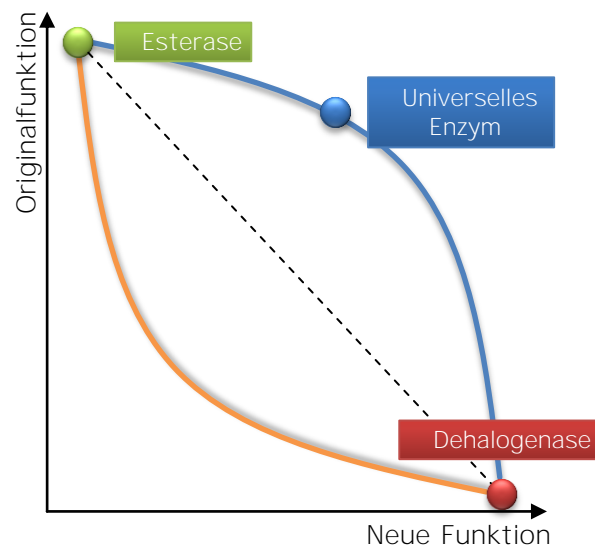


Abb. 15 Die Abbildung zeigt mögliche Wege der Entstehung neuer Enzymaktivitäten. Durch den teilweisen oder kompletten Funktionsverlust der alten Aktivität entstehen neue Enzymaktivitäten. Ein Enzym, welches zwei Reaktionen katalysieren kann, ist ein universelles Enzym. Die Abbildung ist modifiziert nach Khersonsky et al.^[100]

Neue Enzymaktivitäten in bekannten Enzymen zu erzeugen ist eine Herausforderung, da sich viele Arbeitsgruppen stellen. Durch die Erzeugung neuer Aktivität (aktivierte katalytische Promiskuität) können Enzymmechanismen besser verstanden werden. Ein neues Substratspektrum generiert oder ein Enzym mit verbesserten Eigenschaften wie veränderter Enantioselektivität erzeugt werden. Dabei gibt es nur wenige Beispiele, bei denen ein Enzym soweit verändert wurde, dass das kreierte Enzym den Umsatz eines neuen Substrates und einer neuen Reaktion katalysieren kann. Im Beispiel einer Thioesterase mussten dafür Loops deletiert, inseriert und ausgetauscht werden, um eine β -Lactamaseaktivität zu erzeugen^[101]. Es gibt aber auch viele Beispiele, bei denen der Austausch einer Aminosäure eine neue Enzymaktivität generieren^{[102][103]}.

Durch die Entwicklung von Computerprogrammen und Algorithmen wie Rosetta Match oder Rosetta Design konnte eine Adonase erzeugt^[104] und optimiert^[105] werden. Die Computerprogramme überprüfen, welche Faltung zu einem Theozym, einem Idealenzym für eine Reaktion mit aktivem Zentrum, am besten geeignet ist und führen eine

Energieminimierung durch simulierte Aminosäuresubstitutionen. Mit immer besseren Computerprogrammen könnte es in der Zukunft sogar möglich sein, ein noch nicht beschriebenes Reaktion mit anderen Substraten zu vergleichen und Enzyme zu finden, die ähnliche Substrate umsetzen. Mit dem folgenden Protein Engineering ist es so möglich schneller Enzyme mit einer neuen Reaktion zu generieren.

Zudem konnte durch das gesteigerte Verständnis von Enzymmechanismen und Proteinstrukturen durch Protein Engineering eine Epoxidhydrolaseaktivität^[104] und in einem weiteren Beispiel eine Hydroxynitrillylaseaktivität^[107] an einer Esterase generiert werden. Der Versuch eine Dehalogenaseaktivität an einer Epoxidhydrolase oder Esterase zu erzeugen war bis jetzt nicht erfolgreich^[108]. Enzymatische Reaktionen konnten allerdings nicht nur in Enzymen, sondern auch in katalytischen Antikörpern erzeugt werden. Katalytische Antikörper generiert, die in der Lage sind, die Carboxylierung oder eine Aldolase-Reaktion durchzuführen^[109]. Somit konnte gezeigt werden, dass katalytische Antikörper eine ähnliche Umsatz aufweisen können, wie hochentwickelte natürliche Enzyme. Zur Generierung einer neuen Aktivität ist nicht zwingend ein Enzym als Grundstruktur verwendet werden muss.

Diese Beispiele verdeutlichen, dass die Erzeugung von neuen Enzymaktivitäten möglich ist und die generierten Proteine eine gute Alternative zu natürlichen Enzymen sein können. Die neuen Eigenschaften oder ein verändertes Substratspektrum. Das gesamte Potential des *de novo* Designs wurde wahrscheinlich noch nicht erkannt und eine Forschung in dieser Richtung könnte zu einem Durchbruch in der Biotechnologie führen, indem Enzyme gewünschter Aktivität am Computer erzeugt werden und in einen Organismus^[110] integriert werden, um gewünschte Produkte herzustellen, toxische Chemikalien zu entgiften, Energie zu erzeugen oder sogar um abiologische Reaktionen durchzuführen.

2. Zielstellung

Ziel der Arbeit ist es durch gerichtete Evolution und rationalem Proteindesign die Evolution von α -Hydrolasefaltungsenzymen zu untersuchen. Die Frage, wie sich die Enzyme unter evolutionärem Stress verhalten und ob es möglich ist die Aktivität in diesen Enzymen zu erzeugen soll geklärt werden.

Hierfür ist es notwendig geeignete Mutagenesemethoden zu etablieren, die eine Mutagenese während der Selektion gewährleisten und damit eine kontinuierliche gerichtete Evolution ermöglichen. Neben dem Vergleich gängiger *in vivo* mit *in vitro* Mutagenesemethoden sollen auch Mutatorplasmide erstellt werden, um eine breitere Auswahlmöglichkeit an Mutagenesemethoden zu erhalten.

Für die erfolgreiche Durchführung einer kontinuierlichen gerichteten Evolution von α -Hydrolasefaltungsenzymen müssen Selektionsassays entwickelt werden, welche eine Vielzahl von Klonen durchmustern können. Zur Maximierung des Durchsatzes der Klone soll das Durchflusssystem für diverse Selektionsassays verwendet werden. Es sollen Methoden zur Selektion von enantioselektiven Esterasen und zur Selektion von aktiven Dehalogenasen entwickelt werden.

Des Weiteren soll ein α -Hydrolasefaltungsenzym (Esterase oder Epoxidhydrolase) die Dehalogenaseaktivität in ein Enzym mit Dehalogenaseaktivität überführt werden. Neben der Anwendung von gerichteter Evolution soll durch rationales Design eine Variante generiert werden, die eine Dehalogenaseaktivität besitzt. Dazu soll der Austausch von Domänen, Loops oder Aminosäuren, die für die Substratbindung oder den katalytischen Mechanismus essentiell sind, zum Erfolg führen. Ein struktureller Vergleich von Enzymklassen der Esterasen, Epoxidhydrolasen und Dehalogenasen soll aufzeigen, welche Aminosäuren sich im Laufe der Evolution an essentiellen Positionen im Protein durchgesetzt haben. Damit soll untersucht werden, wie eine Dehalogenaseaktivität zustande gekommen ist. Dazu ist es notwendig Assaysysteme zu entwickeln, welche die Aktivitäten der α -Hydrolasefaltungsenzyme (Esterasen und Epoxidhydrolasen) und die neu generierte Dehalogenaseaktivität nachweisen können. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität und der Enantioselektivität soll eine quantitative Analyse etabliert werden (GC-MS, HPLC).

3. Ergebnisse

Die Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte. Im ersten wurde eine kontinuierliche gerichtete Mutagenese etabliert und im Zweiten eine Dehalogenaseaktivität-Hydrolysefaltungsenzym erzeugt. Zur Generierung einer Dehalogenaseaktivität wurde eine Vielzahl von rationalen Enzymvarianten erstellt und Experimente der gerichteten Evolution durchgeführt. Zur Anwendung der kontinuierlichen gerichteten Evolution wurden geeignete Mutagenesemethoden und Selektionsassays entwickelt, um im Anschluss eine kontinuierliche gerichtete Evolution zur Veränderung der Enantioselektivität in Esterasen und zum anderen 8) -Hydrolysefaltungsenzym durchzuführen.

3.1 Mutagenesemethoden

In dieser Arbeit werden Mutagenesemethoden benötigt, die geeignet sind, das Zielgen während einer Selektion zu mutieren. Die Mutageneserate wurde von Mutatorplasmiden, Mutatorstämmen, sowie von klassischen Mutagenesemethoden bestimmt. Zum besseren Vergleich wurde in allen Beispielen die Esterase BS2 im Plasmid pET28 mutiert und mittels pNPA-Assay die Aktivität der Varianten bestimmt. Anhand des Verhältnisses von inaktiven zu aktiven Esterasevarianten konnte die Mutageneserate bestimmt werden.

3.1.1 *In vivo* Mutagenesemethoden

In dieser Arbeit wurden die zwei Mutatorplasmide Mut und pEP, welche eine *in vivo* Mutagenese ohne Einsatz von Chemikalien oder UV-Licht ermöglichen, etabliert. Zudem wurden klassische *in vivo* Mutagenesemethoden mit den Mutatorplasmiden verglichen und auf ihre Eignung für eine kontinuierliche gerichtete Evolution hin untersucht.

3.1.1.1 Anwendung des Mutatorplasmids pMut

Der *E. coli* Stamm CSH116 besitzt eine fehlerhafte Untereinheit der Polymerase (α -Subunit D5). Diese konnte mit den Primern mutD1 und mutD2 amplifiziert werden. Das Gen mutD5 wurde mittels TOPO Cloning in den TOPO Vektor integriert und anschließend mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Pst*I in die multiple Klonierungsstelle des Suizidvektors pMAK705^[11] kloniert. Selifonova et al. schlugen vor, das Gen der fehlerhaften Untereinheit

