

***Walk Through* Rekombination:
Entwicklung einer neuen Methode zur homologen
in vitro Rekombination**

und

Optimierung des diagnostischen Enzyms Creatinase

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg von

Janet Kenklies

geb. am 05.08.1973 in Aschersleben

Halle/Saale, Februar 2004

urn:nbn:de:gbv:3-000007606

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3A3Agbv%3A3-000007606>]

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1999 bis Februar 2003 am Institut für Biotechnologie in der Abteilung Proteintechnologie unter Leitung von Prof. Dr. Rainer Rudolph angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden in der Roche Diagnostics GmbH Business Area Centralized Diagnostics unter Leitung von Dr. Zhixin Shao durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am 25. Februar 2004.

Verteidigt am 01. Juli 2004.

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Rudolph; Institut für Biotechnologie, Universität Halle
2. Prof. Dr. H.-J. Fritz; Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen
3. Prof. Dr. T. Braun; Institut für Physiologische Chemie, Universität Halle

Diese Arbeit ist meinen Eltern,
meinen Großeltern und meinen
Schwestern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	5
2. Zusammenfassung	6
2.1. <i>Walk Through</i> Rekombination	6
2.2. Stabilisierung der Creatinase aus <i>Erwinia sp.</i>	6
3. Abkürzungen	8
4. Erklärung englischer Fachbegriffe	12
4.1. Warenzeichen	12
5. Einleitung	13
5.1. <i>Protein Engineering</i>	13
5.2. Rationales Proteindesign	13
5.3. Evolutionäres Proteindesign	14
5.4. „ <i>You get what you screen for</i> “	14
5.5. Zufallsmutagenese	14
5.6. Homologe <i>in vitro</i> Rekombination am Beispiel des <i>DNA Shuffling</i>	15
5.7. Die Vorteile der Mutagenese mittels homologer Rekombination	16
5.7.1. Besonders leistungstark: <i>Family DNA Shuffling</i>	16
5.8. Homologie-unabhängige Rekombination	17
5.9. Die konservative Natur des genetischen Codes	18
5.10. Beispiele für die Optimierung mittels gerichteter Evolution	19
5.11. Entwicklung neuer Technologien	20
5.12. Überblick derzeit verfügbarer Methoden der homologen <i>in vitro</i> Rekombination	21
5.12.1. <i>DNA-Shuffling</i>	21
5.12.2. <i>Random Priming</i> Rekombination	21
5.12.3. <i>Staggered Extension Process</i>	21
5.12.4. Heteroduplex Rekombination	22
5.12.5. RACHITT (<i>Random chimeragenesis on transient templates</i>)	22
5.13. Begrenzungen der Methoden und Bedarf neuer Technologien	23
5.14. Ziel der Arbeit (1)	24
5.15. Creatinase aus <i>Erwinia sp.</i>	25
5.16. Creatininbestimmung	25
5.17. Bisher bekannte Creatinasen	26
5.18. Stabilität von Proteinen	27
5.19. Gerichtete Evolution von thermostabilen Proteinen	28
5.20. Ziel der Arbeit (2)	29

6. Material und Methoden	30
6.1. Materialien , Lösungen und Medien	30
6.2. Bakterien und Plasmide	33
6.3. Oligonukleotide	34
6.4. Geräte	35
6.5. Computerprogramme	35
6.6. Molekularbiologische Methoden	36
6.6.1. Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	36
6.6.2. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	36
6.6.3. Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	36
6.6.4. Isolierung von Plasmid-DNA	37
6.6.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
6.6.6. Reinigung von PCR-Produkten	37
6.6.7. Gelelektrophorese von Doppelstrang-DNA	38
6.6.8. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Einzelstrang-DNA	38
6.6.9. Elution von DNA aus Agarose-Gelen	38
6.6.10. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	38
6.6.11. Dephosphorylierung von DNA-Enden	39
6.6.12. DNA-Ligation über Restriktionsschnittstellen	39
6.6.13. DNA-Ligation mittels TOPO [®] PCR- Klonierung	39
6.6.14. Sequenzierung von Plasmid-DNA	40
6.6.15. Zufallsmutagenese mittels fehlerhafter PCR (mPCR)	40
6.6.16. Ortsgerichtete Mutagenese	41
6.6.17. Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese	41
6.6.18. Markierung von DNA mit DIG	42
6.6.19. DNA- <i>Electroblotting</i> vom Polyacrylamid-Gel auf Nylonmembran	42
6.6.20. Detektion DIG-markierter DNA	42
6.7. Hochdurchsatz-Screening der Creatinase-Mutanten	42
6.7.1. <i>Screening</i> -Prinzip	42
6.7.2. Erste Mutantengeneration (nicht automatisiert)	43
6.7.3. Zweite Mutantengeneration (automatisiert)	44
6.8. Expression, Reinigung und Analytik von Proteinen	45
6.8.1. Expression	45
6.8.2. Gewinnung des Zellextraktes	46
6.8.3. Polyminabtrennung	46
6.8.4. Chromatographie mit DEAE-Sepharose	46
6.8.5. Chromatographie mit Phenylsepharose	47
6.8.6. Gelfiltrations-Chromatographie	47
6.8.7. Dialyse	48
6.8.8. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen und Proteinfärbung	48
6.8.9. Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	48
6.8.10. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	48
6.8.11. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorptionsspektroskopie	48
6.8.12. Bestimmung der Enzymaktivität der Creatinase	49
6.8.13. k_{cat}/K_M -Bestimmung	50
6.9. Biophysikalische Methoden	51
6.9.1. <i>Differential Scanning</i> -Kalorimetrie (DSC)	51
6.9.2. Fluoreszenzspektroskopie	51
6.9.3. Cirkular-Dichroismus-(CD)-Spektroskopie	51

6.9.4. Guanidiniumchlorid-induzierte Entfaltung	52
6.9.5. Analytische Ultrazentrifugation	53
6.9.6. Massenspektrometrie	53
6.10. Modellierung der Proteinstruktur	53
6.11. Walk Through Rekombination	54
6.11.1. Gewinnung Uracil-haltiger DNA (U-DNA)	54
6.11.2. Synthese von DNA-Fragmenten ("Fragmentleitern")	54
6.11.3. Abbau von U-DNA mittels Uracil-DNA-Glycosylase	55
6.11.4. Reinigung von DNA-Fragmenten	55
6.11.5. Reassemblierung	55
7. Ergebnisse zur Walk Through Rekombination	57
7.1. Beschreibung des resultierenden Verfahrens zur Rekombination	57
7.2. Fragmentsynthese	60
7.3. Entfernen der <i>Template</i>-DNA	61
7.4. Reinigung der DNA-Fragmente	62
7.5. Abbau der terminierenden Didesoxynukleotide und Reassemblierung	63
7.6. Rekombination von <i>ciap</i> und <i>hpap</i>	66
7.7. Sequenzdatenanalyse der Reassemblierungsprodukte	70
8. Ergebnisse zur Creatinase	74
8.1. Mutagenese der Creatinase	74
8.1.1. Erste Mutantengeneration	76
8.1.2. Zweite Mutantengeneration	76
8.1.3. Ortsgerichtete Mutagenese: CTsd2	77
8.1.4. Sättigungsmutagenese	77
8.1.5. Ortgerichtete Mutagenese: CTsd7	78
8.2. Isolierung rekombinanter Creatinase aus <i>E. coli</i>	78
8.2.1. Proteinreinigung	78
8.2.2. Identität und Homogenität von Wildtyp-Creatinase und Mutante CTsd7	80
8.3. Vergleich der Wildtyp-Creatinase mit Mutante CTsd7	81
8.3.1. Thermische Entfaltung	82
8.3.2. Modellstruktur von Mutante CTsd7	84
8.3.3. Sekundär- und Tertiärstruktur	85
8.3.4. Guanidiniumchlorid-induzierte Entfaltung	88
9. Diskussion zur Walk Through Rekombination	93
9.1. Fragmentsynthese	93
9.2. Entfernen der <i>Template</i>-DNA	95
9.3. Reinigung der DNA-Fragmente	97
9.4. Abbau der terminierenden Didesoxynukleotide	98
9.5. Reassemblierung	101
9.6. Rekombination von <i>ciap</i> und <i>hpap</i>	102
9.7. Sequenzdatenanalyse	103

9.8. Vergleich der Rekombinationsmethoden	106
10. Diskussion zur Creatinase	111
10.1. Optimierung der Creatinase mittels Mutagenese	111
10.2. Isolierung der Creatinase aus <i>E.coli</i>	114
10.3. Vergleich der Wildtyp-Creatinase mit Mutante CTsd7	115
10.3.1. Aussagen zur Sekundär- und Tertiärstruktur sind sehr begrenzt möglich	115
10.3.2. Die Mutante entfaltet unter verzögerter Aggregation	115
10.3.3. Untersuchung der Modellstruktur von Mutante CTsd7	118
11. Literatur	122
12. Anhang	129
12.1. Sequenz-Alignment der Rekombinationsprodukte (AP)	129
12.2. Sequenz der Wildtyp-Creatinase	133
12.3. Creatinase-Screening	134

1. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1	DNA-Shuffling	15
Abbildung 2	Heteroduplex Rekombination	22
Abbildung 3	RACHITT	23
Abbildung 4	Creatininbestimmung	26
Abbildung 5	Prinzip der Walk Through Rekombination	58
Abbildung 6	Prinzip der Durchmischung von DNA-Fragmenten in der Reassemblierung	59
Abbildung 7	Synthese von Fragmentleitern: Optimierung der Template-Konzentration	60
Abbildung 8	Entfernen der Template-DNA	61
Abbildung 9	Reinigung der DNA-Fragmente	62
Abbildung 10	Reassemblierung von HPAP bei verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen	64
Abbildung 11	Amplifizierung der reassemblierten Produkte	65
Abbildung 12	Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen in den Alkalischen Phosphatasen	67
Abbildung 13	Reassemblierung von <i>ciap</i> und <i>hpap</i> unter Variation von Annealingtemperatur Extensionszeit und Fragmentmenge	69
Abbildung 14	Sequenzdatenanalyse der Rekombinationsprodukte	70
Abbildung 15	Rekombinationsabstände	71
Abbildung 16	Überblick zur Herstellung der Creatinase-Mutanten	74
Abbildung 17	Vergleich der Creatinase-Mutanten hinsichtlich Effizienz (k_{cat}/K_M) und Stabilität ($T_{M(app)}$)	75
Abbildung 18	Proteinisolierung	79
Abbildung 19	ESI-MS-Spektren von Wildtyp-Creatinase und Mutante CTsd7	81
Abbildung 20	DSC- Analysen der thermischen Entfaltung	82
Abbildung 21	Thermische Inaktivierung	83
Abbildung 22	Modellstruktur der Creatinase-Mutante CTsd7	85
Abbildung 23	Fern-UV-CD-Spektren	86
Abbildung 24	Nah-UV-CD-Spektren	87
Abbildung 25	Fluoreszenzspektren	88
Abbildung 26	GdnHCl-induzierte Entfaltung und Rückfaltung	89
Abbildung 27	Aggregation während der GdnHCl-induzierten Entfaltung	91
Abbildung 28	Elektronendichte von Aminosäure Tryptophan 59 (Mutation Phe59Trp)	119
Abbildung 29	Umgebung von Asparagin 130 (Mutation Asn130Asp)	120
Abbildung 30	Sequenz-Alignment der Rekombinationsprodukte	132
Abbildung 31	DNA- und Aminosäure-Sequenz der Wildtyp-Creatinase aus <i>Erwina spec</i>	133
Tabelle 1	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	33
Tabelle 2	Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide	33
Tabelle 3	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	34
Tabelle 4	Molare Absorptionskoeffizienten und Absorptionen	49
Tabelle 5	Sequenzdatenanalyse der Rekombinationsprodukte	73
Tabelle 6	Vergleich der Creatinase-Mutanten hinsichtlich enzymatischer Effizienz und Stabilität	75
Tabelle 7	Proteinisolierung	80
Tabelle 8	Thermische Inaktivierung und thermische Entfaltung	83
Tabelle 9	Vergleich von Methoden der homologen Rekombination mit der Walk Through Rekombination	109
Tabelle 10	Vergleich der Creatinase-Mutanten hinsichtlich enzymatischer Effizienz und Stabilität	134

2. Zusammenfassung

2.1. Walk Through Rekombination

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Methode der homologen *in vitro* Rekombination entwickelt, die sogenannte *Walk Through* Rekombination, bestehend aus:

- U-DNA¹-Synthese von den Elternngen-Sequenzen
- Fragmentsynthese mittels Kettenabbruchreaktion mit U-DNA als *Template*
- Abbau der *Template*-U-DNA
- Reinigung der Fragmente
- Reassemblierung der Fragmente mit gleichzeitigem Abbau der terminierenden Didesoxynukleotide

Die Entwicklung erfolgte anhand der Gen-Mutagenese der Alkalischen Phosphatase. Jeder einzelne Schritt der Methode wurde unter Verwendung von DIG²-markierter DNA und ihrem immunlogischem DIG-Nachweis verfolgt und optimiert. Somit konnte sowohl eine zuverlässige als auch einfache Anwendung geschaffen werden. Die Funktionsfähigkeit der entwickelten Methode wurde durch Rekombination von zwei Genen der Alkalischen Phosphatase überprüft, die zueinander 81 % Sequenzidentität aufweisen. Anhand einer Sequenzdatenanalyse der rekombinierten Klone konnte die Existenz von Rekombinationsereignissen bestätigt werden. Die *Walk Through* Rekombination zeigt sich im Vergleich mit anderen Methoden der homologen *in vitro* Rekombination als leistungsstark hinsichtlich der Rekombinationseffizienz (100 %) und der Rekombinationsfrequenz (2,7 – 3,5 Rekombinationen je kbp). Die Besonderheit der *Walk Through* Rekombination ist der minimale Abstand zwischen zwei Rekombinationsereignissen, der nachweislich nur 18 bp und möglicherweise nur bis zu 3 bp beträgt. Dies wird durch die große Vielfalt der Fragmente ermöglicht. Die vergleichsweise erhöhte Rate an Spontanmutationen (2,8 – 3,2 je kbp) ist vermutlich auf die wiederholte Verwendung der *Taq*-Polymerase zurückzuführen. Durch Variation verschiedener Parameter wie z.B. Fragmentlänge, Primerwahl und Reassemblierungsbedingungen besteht ein weiteres Optimierungspotential hinsichtlich der Rekombinationsfrequenz.

2.2. Stabilisierung der Creatinase aus *Erwinia sp.*

Die thermische Stabilität der Creatinase aus *Erwinia sp.* wurde durch evolutionäres Proteindesign unter Beibehaltung der katalytischen Effizienz erhöht. Das Design umfasste zwei Zyklen fehlerhafter PCR mit anschließendem *Screening* auf thermische Stabilität und

1 U-DNA: Uracil-haltige DNA

2 DIG: Digoxigenin

Enzymaktivität bei Substratlimitation. Anschließend wurden die Aminosäuren an den identifizierten Positionen permutiert. Die finale Mutante CTsd7 unterschied sich in ihrem apparenten Schmelzpunkt um 8 °C vom Wildtyp. Die Stabilisierung wurde über thermische und GdnHCl-induzierte Entfaltung untersucht und kann vermutlich auf eine Verzögerung der Intermediatbildung im Entfaltungsprozess zurückgeführt werden, welcher mit verzögerter Aggregationsbildung verbunden ist. Die spektroskopischen Untersuchungen wurden durch ihre unterschiedliche Anzahl an Tryptophanen behindert und lassen nur begrenzt die Aussage über identische Sekundärstrukturen zu. Aussagen über Veränderungen in der Proteinstruktur, die zur Erhöhung der thermischen Stabilität führten, konnten mit Hilfe von Homologie-Modellierung der Proteinstruktur mit nur spekulativem Charakter getroffen werden.

3. Abkürzungen

AAP	4-Amino-2,3,dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on
ACN	Acetonitril
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicilin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cirkular-Dichroismus
CHOK1	<i>Chinese Hamster Ovary</i> -Zellen (Zellen aus dem Eierstock chinesischer Hamster)
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
CSPD	Disodium 3-(-4-methoxyspirofl,2-dioxethan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo- [3.3.1.1 ^{3,7}]decan)4-yl)phenylphosphat
CT	Creatinase
D	Denaturierter Zustand
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEAE-	Diethylaminoethyl-
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA	Enzymaktivität
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
Exo III	Exonuklease III
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (Fluoreszenz-aktiviertes Sortieren von Zellen)
fc	<i>Final Concentration</i> (Endkonzentration)
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GdnHCl	Guanidiniumchlorid
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
HPAP	<i>Human Placental Alkaline Phosphatase</i> (Alkalische Phosphatase aus humaner Plazenta)
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> (Hochdruckflüssigchromatographie)
ITCHY	<i>Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes</i> (Erzeugung von Hybridenzymen durch intrinsischen Abbau)
Kan	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
LacZ α	α -Peptid der β -Galaktosidase
LB	Luria Bertani (Medium)
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> (Minimale Inhibitorkonzentration)
mind.	mindestens
MLV	murines Leukämia-Virus
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mPCR	fehlerhafte PCR
MS	Massenspektrometrie
MTP	96-Well-Mitrotiterplatte
N	Nativer Zustand
n.b.	nicht bestimmt
nt	Nukleotide
oM	ortsgerichtete Mutagenese
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pI	isoelektrischer Punkt
P_{lac}	<i>lac</i> -Promotor
P_{mgl}	<i>mgl</i> -Promoter
POD	Peroxidase
RACHITT	<i>Random chimeragenesis on transient templates</i> (Zufällige Chimäragenese mit vergänglichem <i>Template</i>)
RNAse	Ribonuklease
RPR	<i>Random Priming Recombination</i> (Rekombination mit Zufalls-„Priming“)
SA	Spezifische Aktivität
Sarc-OD	Sarcosinoxidase
ScFv	<i>Singel Chain Antibody Variable Region Fragments</i> (variable Region einer einzelnen Kette des Antikörpers)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHIPREC	<i>Sequence Homology-Independent Protein Recombination</i> (Sequenz-unabhängige Rekombination von Proteinen)
sM	Sättigungsmutagenese
ssDNA	Einzelstrang-DNA
Stabwn	Standardabweichung
StEP	<i>Staggered Extension Process</i> (Gestaffelter Verlängerungsprozess)
Stfehler	Standardfehler
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAPS	N-[Tris(hydroxymethyl)]-3-amino-propansulfonsäure
<i>Taq</i>	<i>Taq</i> -Polymerase
<i>Taq/EXO</i>	<i>Taq</i> -Polymerase/Exonuklease III-Gemisch
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBHB	Tribrom-Hydroxybenzoesäure
TFA	Trifluoressigsäure
$T_{M(app)}$	apparenter Schmelzpunkt
$T_{M(EA)}$	apparenter Mittelpunkt der Inaktivierung
U-DNA	Uracil-haltige DNA
üN	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit

wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Zeo	Zeocin
ΔA	Delta Absorption
3'H	Didesoxynukleotid am 3'-Ende

Einheiten wurden dem internationalen Standard entsprechend verwendet. Aminosäuren wurden im Ein- oder Dreibuchstaben-Code abgekürzt.

4. Erklärung englischer Fachbegriffe

<i>Annealing</i>	Hybridisierung von einzelsträngigen komplementären DNA-Fragmenten
<i>Blotting</i>	Übertragen von Nukleinsäuren oder Proteinen auf Membran
<i>Forward</i>	DNA-Syntheserichtung bezüglich der codierenden Sequenz ist vom N- zum C-Terminus, Primer bindet am <i>Antisense</i> -Strang
<i>Loop</i>	ungeordnetes Sekundärstruktur-Element
<i>Mismatch</i>	Fehlpaarungen nichtkomplementärer Basen während Hybridisierung/ <i>Annealing</i>
<i>Molecular Breeding</i>	molekulare Züchtung, Bezeichnung für das <i>Shuffling</i> von homologen Genen verschiedenen Ursprungs
<i>Parental</i>	die Eltern betreffend: Elternklon, DNA des Elternklons
<i>Primer Walking</i>	Die Sequenzierung größerer DNA-Stücke mittels intern bindender Primer, die anhand der erhaltenen Sequenz entworfen werden
<i>Priming</i>	<i>Annealing</i> des Oligonukleotids („Primer“) an die <i>Template</i> -DNA zur Initiierung der DNA-Synthese
<i>Reverse</i>	DNA-Syntheserichtung bezüglich der codierenden Sequenz ist vom C- zum N-Terminus, Primer bindet am <i>Sense</i> -Strang
<i>Screening</i>	Testen einer großen Probenanzahl
<i>Shuffling</i>	Mischen von DNA-Sequenzabschnitten
<i>Spin Column</i>	(-Chromatographie): Chromatographie mittels Zentrifugation durch kleine Säulen
<i>Walk Through</i>	die zu rekombinierende DNA wird „in kleinen Schritten durchlaufen“

4.1. Warenzeichen

HIGH PURE, HIGH FIDELITY und LUMI-IMAGER sind Marken eines Unternehmens der Roche Gruppe.

5. Einleitung

5.1. Protein Engineering

„Die Natur stellt eine eindrucksvolle Auswahl an Biokatalysatoren bereit, die zwar sehr gut geeignet sind, Leben zu ermöglichen, normalerweise jedoch nicht so gut für technologische Anwendungen zu verwenden sind. Ob Biokatalysatoren eine technologische Bedeutung erlangen, hängt wesentlich davon ab, ob es uns gelingt, die natürlichen Katalysatoren entsprechend den Bedürfnissen „maßzuschneidern“ oder diese neu zu entwerfen“ (Zitat: Arnold, 2001) .

Weltweit arbeiten Forschergruppen daran, natürlich vorkommende Proteine hinsichtlich ihrer physikalischen oder enzymatischen Eigenschaften gezielt zu verändern, um sie für biotechnologische oder pharmazeutische Anwendungen nutzbar zu machen. Ihr Anwendungspotential ist sehr groß und reicht von enantioselektiven Enzymen für die organische Synthese (Koeller & Wong, 2001) über optimierte Bindungseigenschaften von Antikörpern beispielsweise für die Krebsbehandlung (Verma et al., 1998) bis hin zum Metabolic Engineering von Stoffwechselwegen für die Produktion pharmazeutischer Moleküle und pharmazeutischer Zwischenprodukte wie z.B. Steroide, unnatürliche Aminosäuren, Vitamine und pharmazeutische Intermediate (Chartrain et al., 2000 und Dannert, 2000).

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit wird sich mit der Entwicklung einer neuen Methode des Protein Engineering, der Walk Through Rekombination, beschäftigen.

5.2. Rationales Proteindesign

Für das *Protein Engineering* stehen den Forschern unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Der klassische Ansatz des rationalen Proteindesign basiert auf der Strukturanalyse des Proteins und der Vorhersage von nützlichen Mutationen, die mittels ortsgerichteter Mutagenese in das Protein eingeführt werden. Da jedoch die Mechanismen, die zur Veränderung der Proteineigenschaften führen, noch nicht vollständig verstanden sind, ist das rationale Proteindesign mit hohem Zeit- und Kostenaufwand verbunden. Zuweilen ist die erfolgreiche Veränderung der gewünschten Eigenschaften mit der Verschlechterung einer anderen notwendigen Eigenschaft verbunden (ARNOLD, 2001). Da sich insbesondere die Auswirkungen multipler Mutationen schwierig vorhersagen lassen, sind rationale Lösungen

für komplexe Anforderungen, welche das Zusammenspiel weit voneinander entfernt liegender Aminosäureaustausche benötigen, fast unmöglich (TOBIN ET AL., 2000).

5.3. Evolutionäres Proteindesign

Mit der Entwicklung von evolutionären Methoden des Proteindesign wurde ein Durchbruch im Bereich *Protein Engineering* erreicht. Diese Entwicklung ahmt die Gesetzmäßigkeiten der natürlichen Evolution nach Charles Darwin nach, welche auf der Anpassung der Organismen an veränderte Umweltbedingungen mittels Zufallsmutationen und Genrekombination beruht, nur die angepassten Organismen konnten überleben und Nachkommen bilden. Dieses Prinzip wurde zur Optimierung von Proteinen übernommen. Die „Gerichtete Evolution“ von Proteinen besteht aus zwei Schritten, der Herstellung einer Mutantenbibliothek und der Identifizierung von Mutanten mit den erwünschten Eigenschaften. Dieser Prozess kann mit den Mutanten wiederholt werden, so dass durch die Akkumulation geringer Veränderungen über mehrere Mutantengenerationen hinweg große Veränderungen der Eigenschaften erzielt werden können (ARNOLD, 2001). Die Methoden der gerichteten Evolution sind funktionsorientiert. Im Gegensatz zum (in Abschnitt 5.3 angeführtem) rationalen Proteindesign sind keine Daten zur Struktur oder zum Mechanismus des Proteins notwendig.

5.4. „You get what you screen for“

Die Suche nach veränderten Varianten erfolgt durch ein geeignetes *Screening-* oder Selektionssystem gemäß dem ersten Gesetz der Zufallsmutagenese: „You get what you screen for“ (YOU & ARNOLD, 1996). Die *Screening-*Bedingungen sollten demnach so gewählt werden, dass alle erwünschten Eigenschaften optimiert oder zumindest kontrolliert werden. Auf diese Weise können unerwünschte Nebeneffekte, wie zum Beispiel ein verringertes Expressionslevel, minimiert werden. Durch das Anlegen mehrerer *Screening-*Kriterien können verschiedene Eigenschaften simultan optimiert werden.

5.5. Zufallsmutagenese

Die einfachste Möglichkeit zur Herstellung von Mutantenbibliotheken besteht in der Einführung zufälliger Punktmutationen z.B. durch fehlerhafte PCR (CADWELL & JOYCE, 1994). Die meisten der 20 möglichen Aminosäuren an einer Position sind schädlich und zerstören die Aktivität des Proteins. Nur wenige Aminosäureaustausche führen zur gewünschten Veränderung der Funktion eines Proteins. Um einen hohen Anteil aktiver Klone zu erzeugen, wird deshalb eine Mutationsrate mit nur ein bis zwei Aminosäureaustauschen je Protein

gewählt (STEIPE, 1999). Diese Strategie der Zufallsmutagenese ist meist dann erfolgreich, wenn solche Eigenschaften wie die Stabilität oder Aktivität eines Enzyms erhöht werden sollen. Die entsprechenden Mutationen wirken hier oft additiv und können deshalb mittels aufeinander folgender Mutagenese-Runden identifiziert und miteinander kombiniert werden (DANNERT, 2001). Ist für die Etablierung neuer Proteinfunktionen jedoch ein Zusammenspiel mehrerer Mutationen nötig, ist die Zufallsmutagenese nicht geeignet (DANNERT, 2001).

5.6. Homologe *in vitro* Rekombination am Beispiel des DNA Shuffling

Im Jahre 1994 wurde von W. STEMMER (A) das „DNA Shuffling“ (siehe Abbildung 1), die erste und bahnbrechende Methode zur homologen *in vitro* Rekombination eingeführt.

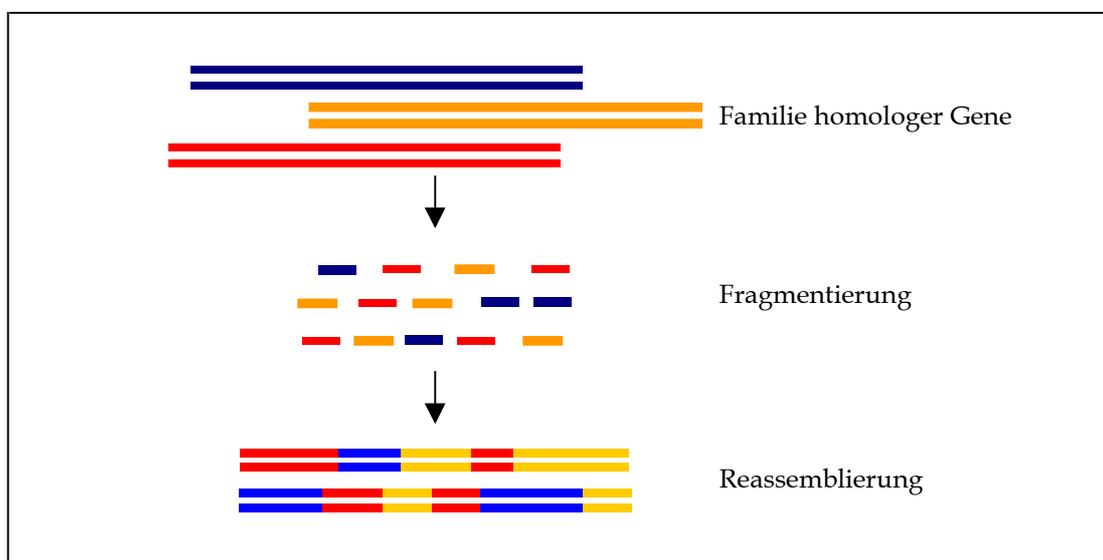


Abbildung 1 DNA-Shuffling

Die homologen Elterngene werden mit DNase I fragmentiert und größenfraktioniert. Anschließend werden die DNA-Fragmente von z.B. 100 - 200 bp Länge in einer PCR-Reaktion ohne Primer zu Sequenzen der ursprünglichen Länge reassembliert.

Beim DNA Shuffling werden ein oder mehrere mutierte Elterngene mittels DNaseI-Verdau zunächst fragmentiert und DNA-Fragmente der gewünschten Größe (z.B. zwischen 100 und 200 bp) isoliert. Die Fragmente werden in einer anschließenden Reassemblierungsreaktion zu chimären Gensequenzen der ursprünglichen Länge zusammengesetzt. Die Reassemblierungsreaktion ist eine PCR-ähnliche Reaktion ohne Primer, in der homologe Fragmente miteinander hybridisieren und an den überstehenden Enden von der Polymerase zum Doppelstrang aufgefüllt werden können. Innerhalb der Zyklen von Denaturierung, *Annealing* und Extension werden die kurzen DNA-Fragmente zu Gensequenzen der

ursprünglichen Länge rekonstituiert, welche die Mutationen der Elterngene in kombinatorischer Weise tragen. Zusätzlich produziert diese Methode Punktmutationen mit einer Rate von 7/kbp (STEMMER, 1994, A).

5.7. Die Vorteile der Mutagenese mittels homologer Rekombination

Die besonderen Vorteile der homologen *in vitro* Rekombination im Vergleich zur Zufallsmutagenese (mittels z.B. fehlerhafter PCR) bestehen in der kombinatorischen Anordnung von Mutationen und in der Fähigkeit zur Rückkreuzung, das heißt der Entfernung schädlicher oder auch neutraler Mutationen. So kann ein größerer Bereich des „Sequenzraumes“ (jede Sequenz wird durch einen Punkt im Sequenzraum vertreten betrachtet, KAUFFMAN & MACREADY, 1995) erreicht werden. STEMMER (1994, A) demonstrierte das Potential dieser Methode am Beispiel einer β -Lactamase, deren minimale Inhibitorkonzentration (MIC) gegenüber dem Antibiotikum Cefotaxim nach drei Runden DNA *Shuffling* und weiteren zwei Runden der Rückkreuzung mit der Elterngensequenz 32000-fach von 0,02 $\mu\text{g/ml}$ auf 640 $\mu\text{g/ml}$ gesteigert werden konnte. Zum Vergleich: Nach drei Runden fehlerhafter PCR konnte die MIC der β -Lactamase von W. STEMMER jedoch nur 16-fach auf 0,32 $\mu\text{g/ml}$ erhöht werden.

5.7.1. Besonders leistungsstark: *Family DNA Shuffling*

Das DNA *Shuffling* entfaltet jedoch sein volles Potential erst, wenn es zur Rekombination homologer Gene verwendet wird, die verschiedenen Organismen entstammen. Die Forschergruppe um W. STEMMER (CRAMERI ET AL., 1998) führte am Beispiel von vier Cephalosporinase-Genen das sogenannte „*Family DNA Shuffling*“ ein. Nach nur einer *Shuffling*-Runde mit allen vier Elterngenen konnte die Moxalactamaseaktivität 270 bis 540-fach erhöht werden, währenddessen das *Shuffling* einzelner Gene unabhängig voneinander nur eine achtfache Erhöhung bewirkte. Der beste Klon beinhaltete acht Segmente von drei der vier Elterngene und zusätzlich noch 33 Aminosäure-Punktmutationen. Die sehr hohe Leistungsfähigkeit des „*Family DNA Shuffling*“ (auch bekannt als „*Molecular Breeding*“ = „molekulare Züchtung“) rührt daher, dass durch den Austausch ganzer DNA-Blöcke sich die rekombinierten Sequenzen in vielen Aminosäurepositionen unterscheiden, währenddessen beim *Shuffling* eines einzelnen Gens nur Mutanten mit wenigen Aminosäureaustauschen erhalten werden. Diese erhöhte Sequenzvielfalt führt zu einer sparsameren Durchmusterung eines viel größeren Bereiches des „Sequenzraumes“.

Weitere Erklärungen zur Leistungsfähigkeit des „*Family DNA Shuffling*“ sind z.B. in dem Review von C. S. DANNERT (2001) zu finden: Im Gegensatz zur Zufallsmutagenese oder Rekombination von Einzelgen-Varianten können mit der Rekombination homologer Gene auch nichtadditive Mutationen kombiniert und somit neue Funktionen erschlossen werden. Die Aminosäureunterschiede in homologen Genen, die bereits von der Natur auf ihre Stabilität und Funktionalität hin ausgewählt wurden, ermöglichen die Rekombination zu meist funktionellen Varianten. Die Kombination von neutralen Mutationen kann sogar zur Bildung neuer Eigenschaften führen (DANNERT, 2001), was als „konstruktive neutrale Evolution“ (STOLZFUS, 1999) oder auch als „Selektive Neutralität“ (DEMETRIUS, 1997) beschrieben wurde.

Weitere wichtige Rückschlüsse zum Potential der *Family Shuffling*-Technologie wurde aus folgender Arbeit gezogen (NESS ET AL., 1999). Es wurden 26 homologe Gene aus vier phylogenetischen Unterfamilien der Protease Subtilisin rekombiniert, einschließlich einer bereits sehr ausgereiften Variante (mit dem Namen „Savinase“). Eine nur kleine Mutantenbibliothek von 654 Varianten wurde auf vier Eigenschaften getestet: Aktivität bei 23 °C, thermische Stabilität, Lösungsmittelstabilität und pH-Abhängigkeit. Die Ergebnisse belegten, dass nicht nur einzelne Eigenschaften verändert, sondern viel wichtiger, verschiedene Eigenschaften in einer Mutante kombiniert werden können. Interessanterweise wurden auch Gensequenzen inaktiver Elternvarianten in einigen hochaktiven Nachkommenklonen gefunden. Sehr bemerkenswert ist, dass für zwei der getesteten Eigenschaften, thermische Stabilität und Aktivität bei 23 °C/pH 10, der beste Elternklon nicht derjenige war, der auf Sequenzebene dem identifiziertem Nachkommen am nächsten war. Demnach wäre der beste Elternklon wahrscheinlich auch nicht der beste Ausgangsklon für eine Einzelgen-Evolution gewesen.

Diese zuletzt beschriebene Beobachtung wurde in den Review von C. S. DANNERT (2001) zu einem Gesetz zur Wahl der Elterngene formuliert: „Die genotypischen Eigenschaften eines Elternproteins werden nicht immer sichtbar phänotypisch offenbart. Ihr genetisches Potential für eine Entwicklung ist nicht einfach zu verstehen“.

5.8. Homologie-unabhängige Rekombination

Die homologe *in vitro* Rekombination weist zwei wichtige Limitationen auf, die diese von anderen, nicht evolutionären Methoden abgrenzt. Eine Begrenzung ist, dass sie recht hohe DNA-Sequenzhomologien von mindestens 70 % (SIEBER ET AL., 2001) benötigen. Um diese Barriere zu überwinden, wurden verschiedene Methoden zur Homologie-unabhängigen

Rekombination entwickelt, wie zum Beispiel ITCHY („*Incremental Truncation For The Creation Of Hybrid Enzymes*“, OSTERMEIER ET AL., 1999 A-C), Thio-ITCHY (ITCHY unter Verwendung von Phosphothioat-Nukleotiden, LUTZ ET AL., 2001) oder SHIPREC („*Sequence Homology-Independent Protein Recombination*“, SIEBER ET AL., 2001). Die Methoden führen zur Bildung von Fusionen an zufälligen Stellen zwischen zwei Proteinen oder Domänen. Diese Art der Rekombination stellt neben oder in Ergänzung zur homologen *in vitro* Rekombination ein sehr wertvolles Werkzeug dar, um einen größeren Bereich des „Sequenzraumes“ zu durchsuchen. Allerdings sind die gegenwärtigen Methoden zur Homologie-unabhängigen Rekombination noch auf ein Rekombinationsereignis pro Versuch beschränkt.

Gewissermaßen zwischen der homologen und der Homologie-unabhängigen Rekombination steht das Exon-Shuffling (KOLKMAN & STEMMER, 2001). Dies ist eine quasi homologe Rekombination, in welcher Exons oder Kombinationen von Exons, die für Domänen codieren, mit einer Mischung aus chimären Primern amplifiziert werden, die wiederum festlegen, welche Exons zusammen „gespliced“ werden. Mischungen dieser PCR-Fragmente werden dann in einer „selbst primenden Überlappungs-PCR“ kombinatorisch assembliert.

5.9. Die konservative Natur des genetischen Codes

Die zweite Begrenzung (siehe Abschnitt 5.8) der homologen *in vitro* Rekombination und auch der Zufallsmutagenese mittels fehlerhafte PCR ist die konservative Natur des genetischen Codes. Das heißt, ein Einzelbasenaustausch in einem Codon kann zu durchschnittlich 7 der 19 theoretisch möglichen Aminosäureaustauschen führen, die typischerweise ähnliche physikochemische Eigenschaften aufweisen (DANNERT, 2001). Beide Methoden, sowohl die homologe *in vitro* Rekombination als auch die fehlerhafte PCR erzeugen nur Einzelbasenaustausche. Diese Limitation kann durch Kombination mit Methoden, die ganze Codons austauschen, überwunden werden. Beispielsweise konnte durch die Anwendung von Sättigungsmutagenese nach erfolgter fehlerhafter PCR die effiziente Veränderung von Proteineigenschaften gezeigt werden (MYAZAKI & ARNOLD, 1999). Durch die Verwendung von Sättigungsmutagenesen können Mutationen nicht an zufälligen Positionen eingeführt werden, diese Positionen müssen im Vorfeld als sogenannte „Hot Spots“ identifiziert worden sein. Dieses Problem kann mit einer neuen von MURAKAMI und seinen Kollegen (2002) entwickelten Methode umgangen werden, die es ermöglicht, an jeder zufälligen Position eine frei wählbare Anzahl von Basen für eine Codon-basierende Zufallsmutagenese einzubauen.

5.10. Beispiele für die Optimierung mittels gerichteter Evolution

Im folgenden Abschnitt soll an fünf Beispielen demonstriert werden, wie mit Hilfe evolutionärer Methoden des Proteindesigns sehr verschiedene Eigenschaften von Proteinen optimiert werden konnten.

Ein Beispiel für die erfolgreiche Optimierung eines Enzyms mittels gerichteter Evolution ist die Inversion der Enantioselektivität einer Hydantoinase (OLIVER ET AL., 2000) für die Verwendung zur L-Methionin-Produktion in *E. coli*. Dies erfolgte mittels zwei aufeinander folgender Runden fehlerhafter PCR und anschließender Sättigungsmutagenese.

Im Labor von FRANCES ARNOLD (GLIEDER ET AL., 2002) wurde mit insgesamt fünf Runden fehlerhafter PCR und homologer Rekombination (StEP: „*Staggered Extension Process*“, siehe Abschnitt 5.12.3) eine C₁₂-C₁₈-Fettsäure-Monooxygenase in einen effizienten Enzymkatalysator zur Umsetzung von Alkanen zu Alkoholen konvertiert. Das entwickelte Enzym ist ein lösliches Monomer und benötigt keine weiteren Proteine zur Katalyse und eröffnet somit neue Möglichkeiten für chemische Synthesen und biologische Sanierungen.

Eine andere Forschergruppe (SOONG ET AL., 2000) veränderte ein murines Leukämia-Virus (MLV) hinsichtlich eines völlig neuen Tropismus für *Chinese Hamster Ovary* (CHOK1)-Zellen, indem sie sechs *env*-Gene, die für virale Hüllproteine von MLVs codieren, mittels DNA *Shuffling* oder *Molecular Breeding* rekombinierten. Dieses Beispiel demonstriert, dass mit Hilfe des *Molecular Breeding* Viren für die Anwendung in der Gentherapie oder als Impfstoffe optimiert werden können.

C. S. DANNERT (2000) und ihre Kollegen erweiterten die Anwendungen der gerichteten Evolution zum *Molecular Breeding* eines ganzen Stoffwechselweges zur Biosynthese von Carotinoiden in *E. coli*. Sie kombinierten die rationale Assemblierung von Carotinoid-Biosynthese-Genen mit dem *Molecular Breeding* von zwei Schlüsselenzymen, die die Richtungen in dem reich verzweigten Stoffwechselweges vorgeben. Auf diese Weise wurde gezeigt, dass durch Kombination von rationaler Assemblierung von Stoffwechselweg-Genen mit evolutionären Methoden die Produktion neuer Verbindungen in einfachen Labororganismen möglich ist, die aus natürlichen Ressourcen oder durch chemische Synthesen nicht zugänglich wären.

Ein sehr beeindruckendes Beispiel für die Optimierung von Bindungseigenschaften ist die Antigen-Bindungsaffinität eines scFv-Antikörpers (*Singel Chain Antibody Variable Region Fragments*) gegen zunächst Fluorescein (BODER ET AL., 2000). Seine Dissoziationskonstante wurde in vier Runden DNA *Shuffling* 1000-fach auf $K_D = 48$ fM gesenkt und zeigt somit eine langsamere Dissoziationskinetik als die des sehr stabilen Steptavidin-Biotin-Komplexes. Dieser Erfolg zeigte neue Wege für die Entwicklung von hochaffinen Antikörpern für ihren therapeutischen Einsatz gegen Krebs und andere Krankheiten auf.

5.11. Entwicklung neuer Technologien

Der Erfolg bei der Optimierung biotechnologisch nutzbarer Proteine mittels evolutionärer Methoden hängt im wesentlichen von folgenden drei Faktoren ab: (1) Die Auswahl und Qualität der zur Verfügung stehenden Moleküle, die als Eltern dienen sollen. (2) Die Leistungsfähigkeit der zu verwendenden Mutagenese- oder Rekombinationsmethoden, um biologische Vielfalt zu kreieren. (3) Die Art des *Screening*- oder Selektionssystems, die die maximale Anzahl der zu untersuchenden Varianten bestimmt.

Zu jedem der drei Punkte wurden in den letzten Jahren eine Reihe neuer Technologien entwickelt. Die Suche nach nützlichen Aktivitäten aus natürlichen Ressourcen wurde durch die Entwicklung neuer Hochdurchsatz-*Screening*-Technologien und Methoden zum Einsammeln von Genen aus der Umwelt und ihre rekombinante Expression erleichtert (REVIEW: ARNOLD, 2001). Das effizientere Durchsuchen von Mutantenbibliotheken wird durch die Entwicklung immer sensitiverer *Screening*-Methoden mit höheren Durchsatzraten ermöglicht, wie z.B. die phenotypische Selektion, Enzymaktivitätstests in Mikrotiterplatten, Enzymaktivitätstests auf Substrat-haltigen Agarplatten, Weiterentwicklungen der *Phage Display*-Technologie in Kombination mit Durchfluss-Zytometrie und Technologien basierend auf künstlichen Kompartimenten (Review: OLSEN, 2000). Im folgenden wird sich jedoch auf die Entwicklung der Methoden zur homologen Rekombination konzentriert, die es ermöglichen, eine große Vielfalt der biologischen Moleküle zu erstellen, um eine effiziente Durchmusterung des „Sequenzraumes“ zu erlauben.

5.12. Überblick derzeit verfügbarer Methoden der homologen *in vitro* Rekombination

Da die Technologien der homologen Rekombination sehr gute Ergebnisse bei der Optimierung von Proteinen ermöglichen, wurde viel Engagement auf die Entwicklung neuer und effizienterer Methoden verwendet. In den letzten Jahren wurden einige Methoden publiziert, die im Wesen ihrer Durchführung auf folgende fünf Methoden reduziert werden können: DNA *Shuffling*, RPR (*Random Priming* Rekombination), StEP (*Staggered Extension Process*), Heteroduplex Rekombination und RACHITT (*Random chimeragenesis on transient templates*). Diese werden in den folgenden Abschnitten genauer betrachtet.

5.12.1. DNA-*Shuffling*

Zum Prinzip des DNA *Shufflings* (STEMMER, 1994) siehe Abschnitt 5.6. Dies ist bisher die bekannteste und am häufigsten verwendete Methode der homologen *in vitro* Rekombination.

5.12.2. *Random Priming* Rekombination

Bei der *Random Priming* Rekombination (SHAO ET AL., 1998) werden kurze Einzelstrang-DNA-Fragmente von der Eltern-DNA hergestellt, indem Primer mit zufälligen Sequenzen an den Elternsträngen hybridisieren und mit Hilfe des Klenow-Fragments bis zu der Stelle verlängert werden, wo bereits der nächste Primer gebunden hatte. Die auf diese Weise erhaltenen Fragmente werden von der Eltern-DNA abgetrennt und in einer Reassemblierungs-PCR analog zum DNA *Shuffling* zu Genchimären zusammengesetzt.

5.12.3. *Staggered Extension Process*

Der *Staggered Extension Process* (ZHAO ET AL., 1998) besteht aus einer PCR-ähnlichen Reaktion mit extrem kurzen Extensionszeiten. Definierte Primer binden an die einzelsträngig vorliegende Eltern-DNA und werden um ein nur kurzes Stück verlängert. Nach dem Denaturieren können diese kurzen Fragmente an eine andere Eltern-DNA hybridisieren und wiederum um ein kurzes Stück verlängert werden. Dieser Prozess wird so oft wiederholt, bis DNA der ursprünglichen Länge erhalten wird. Die Durchmischung der Eltern-DNA wird erreicht, indem die wachsenden Fragmente zwischen den Zyklen zu jeweils andere *Template*-Moleküle wechseln können.

5.12.4. Heteroduplex Rekombination

Die Heteroduplex Rekombination (VOLKOV ET AL., 1999) basiert auf der *in vitro* Hybridisierung homologer Elterngene, die somit Heteroduplex-Formationen bilden. Nach der Transformation der Heteroduplex-DNA in einen geeigneten Wirtsorganismus, z.B. *E. coli*, werden die *Mismatch*-Positionen der Heteroduplex-DNA von der Wirtszelle repariert (Abbildung 2). Auf diese Weise entstehen doppelsträngige Moleküle, die die Sequenzen beider Elterngene enthalten.

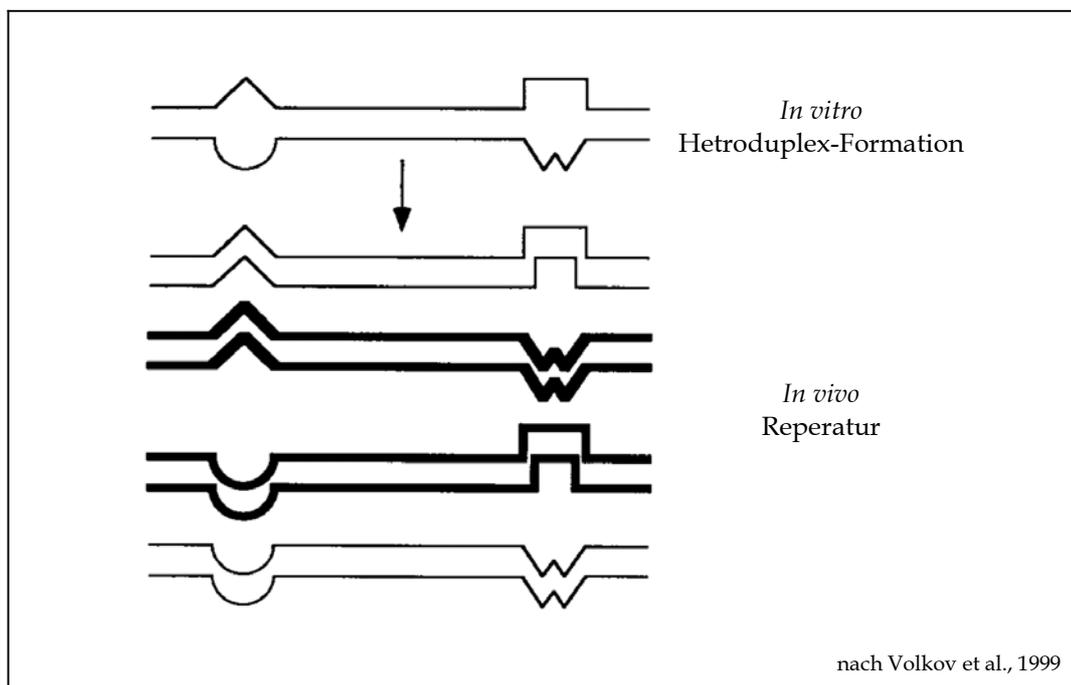


Abbildung 2 Heteroduplex Rekombination

Durch Hybridisierung homologer Elterngene werden *in vitro* Heteroduplex-Formationen gebildet. Die Heteroduplex-DNA wird in einen entsprechenden Wirtsorganismus (z.B. *E. coli*) transformiert. Die *Mismatch*-Positionen der Heteroduplex-DNA werden von der Wirtszelle repariert.

5.12.5. RACHITT (*Random chimeragenesis on transient templates*)

Die RACHITT-Methode (*Random chimeragenesis on transient templates*) besteht aus mehreren Schritten, die in Abbildung 3 schematisch dargestellt sind (COCO ET AL., 2001; WO 01/29211; WO 01/29212). Zunächst wird einzelsträngige DNA der Elterngene fragmentiert und Moleküle der gewünschten Größe isoliert. Der komplementäre DNA-Elternstrang wird als Uracil-haltige DNA präpariert und dient für den nachfolgenden Schritt als „Gerüst“. In diesem hybridisieren die einzelsträngigen DNA-Fragmente an den Uracil-haltigen komplementären DNA-Einzelsträngen. Die dabei entstehenden überhängenden

Fragmentenden werden mit Hilfe von Exonukleasen abgebaut und die Lücken mit Polymerasen aufgefüllt und mit Ligasen verschlossen. Der Uracil-haltige Strang wird durch eine Uracil-DNA-Glycosylase abgebaut und der chimäre Einzelstrang in einer PCR zum Doppelstrang aufgefüllt.

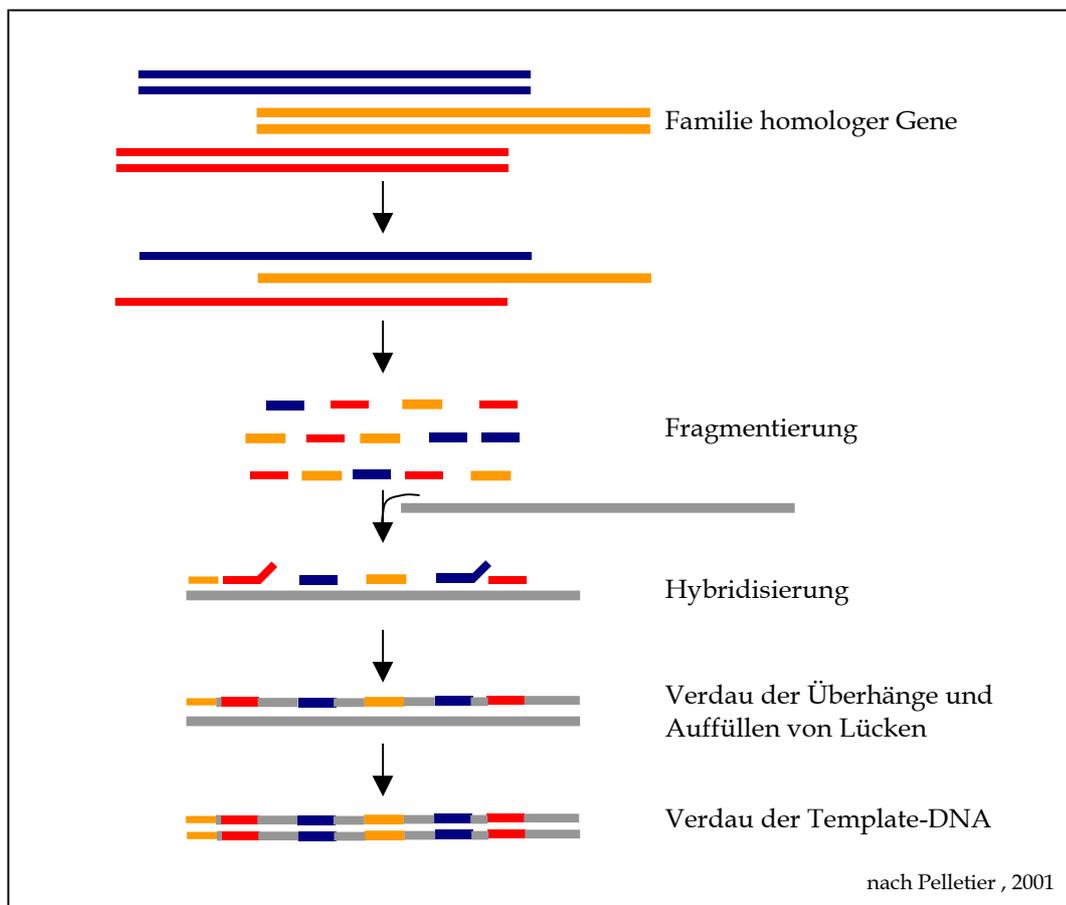


Abbildung 3

RACHITT

Einzelsträngige DNA der Elterngene wird fragmentiert und größenfraktioniert. Die einzelsträngigen Fragmente werden an einen komplementären (Uracil-haltigen) *Template*-DNA-Strang hybridisiert. Überstehende Fragmentenden werden nukleolytisch abgebaut. Lücken werden mit Hilfe von Polymerasen aufgefüllt und mit Ligasen geschlossen. Danach wird die *Template*-DNA mittels einer Uracyl-DNA-Glykosylase abgebaut und in einer PCR-Reaktion durch einem chimären Strang ersetzt (COCO ET AL., 2001; WO 01/29211; WO 01/29212).

5.13. Begrenzungen der Methoden und Bedarf neuer Technologien

Wichtige Charakteristika einer leistungsfähigen Methode der homologen *in vitro* Rekombination sind zuallererst (1) die Anzahl der Rekombinationsereignisse (Rekombinationsfrequenz) innerhalb eines Reassemblierungsproduktes und (2) die Anzahl chimärer Rekombinationsprodukte (Rekombinationseffizienz). Mit Ausnahme der RACHITT-Methode unterscheiden sich die in Abschnitt 5.12. vorgestellten Methoden

hinsichtlich dieser Parameter nicht wesentlich von einander (siehe Tabelle 9). Die Rekombinationsfrequenz beträgt im Durchschnitt bis zu fünf Rekombinationsereignisse je kbp. Fast alle der Methoden produzieren bis zu 100 % chimäre Rekombinationsprodukte. Die RACHITT-Methode (COCO ET AL., 2001; WO 01/29211; WO 01/29212) bildet hinsichtlich der Rekombinationsfrequenz eine positive Ausnahme. Im Durchschnitt konnten 11,2 Rekombinationsereignisse je kbp gezählt werden. Weitere wichtige Merkmale, die allerdings nicht den entsprechenden Veröffentlichungen zu entnehmen sind, wären (3) eine einfache technische Durchführbarkeit, (4) die gleichmäßige Verteilung der Rekombinationsereignisse ohne methodisch verursachte Präferenzen sowie (5) ein möglichst kurzer Abstand zwischen zwei Rekombinationsereignissen. Die beiden letzten Eigenschaften dienen der Erfassung eines möglichst großen Bereich des „Sequenzraumes“ (siehe Abschnitt 5.7).

Derzeit besteht Bedarf an neuen Technologien, die in allen fünf oben aufgeführten Punkten bessere Ergebnisse ermöglichen. Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, eine neue, einfache und leitungsfähige Methode der homologen *in vitro* Rekombination zu entwickeln.

5.14. Ziel der Arbeit (1)

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine neue Technologie zur homologen *in vitro* Rekombination zu entwickeln, die den in Abschnitt 5.13 benannten Kriterien entspricht. Ausgangspunkt der Arbeit war folgende Idee: Mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach SANGER (1977), die für die Sequenzierung von DNA entwickelt wurde, sollen DNA-Fragmente der Elternsequenzen synthetisiert werden. Die Synthese erfolgt in einer Polymerase-vermittelten Strangsynthese in Gegenwart von Desoxynukleotiden (dNTPs) und Didesoxynukleotiden (ddNTPs). Der Einbau eines ddNTPs führt aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Abbruch der Synthesereaktion. Da die Fragmentsynthese an jeder denkbaren Position abbricht, wird eine sehr große Vielfalt an Fragmenten erhalten. Die so erhaltene vielfältige Fragment-DNA soll anschließend in einer Reassemblierungs-PCR zu Genchimären der vollständigen Länge zusammengesetzt werden. Die Reassemblierungs-PCR ist eine PCR-ähnliche Reaktion ohne Primer, in der Fragmente aufgrund ihrer Sequenzhomologie miteinander hybridisieren und an den überstehenden Enden durch die Polymerase aufgefüllt und verlängert werden. Weil aber die Fragmente am 3'-Ende ein Didesoxynukleotid tragen, welches von Polymerasen nicht verlängert werden kann, soll dieses vorher in einer enzymatischen Reaktion abgebaut werden.

Aufgrund der methodischen Besonderheiten dieser Technologie wurden gute Ergebnisse hinsichtlich folgender Eigenschaften erwartet: Da mit Hilfe der Kettenabbruchsynthesereaktion Fragmente in sehr großer Vielfalt synthetisiert werden, wurde erstens davon ausgegangen, dass diese Methode Rekombinationsereignisse an jeder denkbaren Position zulässt, unabhängig von der Art des Nukleotides am 3'-Ende des Fragmentes. Zweitens wird aus gleichem Grund ein kürzerer Abstand zwischen zwei Rekombinationsereignissen erwartet. Drittens sollte diese Grundidee ermöglichen, eine einfache und robuste Technologie zu entwickeln. Viertens und fünftens soll diese Rekombinationsmethode gute Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl an Rekombinationsereignissen und dem Anteil chimärer Gene im Reassemblierungsprodukt ermöglichen. Diese neu zu entwickelte Technologie wird im weiteren *Walk Through* Rekombination genannt.

5.15. Creatinase aus *Erwinia* sp.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Stabilisierung der Creatinase (Creatin-Amidinohydrolase, EC 3.5.3.3) aus *Erwinia* sp. mit Hilfe von Methoden der gerichteten Evolution. Die Creatinase aus *Erwinia* sp. ist ein ca. 46 kDa großes Protein, deren DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz zu Beginn der Arbeit bekannt waren. Der apparente Schmelzpunkt dieses Proteins beträgt 58 °C. Die Creatinase aus *Erwinia* sp. ist für ihre geplante Verwendung im Creatinintest (siehe Abschnitt 5.16) nicht geeignet, da sie unter Lagerbedingung nicht stabil ist. Die Stabilität des Enzyms sollte erhöht werden, indem der apparente Schmelzpunkt der thermischen Entfaltung auf mindestens 63 °C erhöht werden sollte.

5.16. Creatininbestimmung

Die Creatinase katalysiert den zweiten Schritt der gekoppelten enzymatischen Reaktion zur Bestimmung der Creatininkonzentration in Humanserum, -plasma und -urin (siehe Abbildung 4). Der Creatinintest besteht aus vier Reaktionen: (1) Creatinin wird durch die Creatininase zu Creatin hydrolysiert. (2) Das Creatin wird durch die Creatinase zu Sarcosin und Harnstoff hydrolysiert. (3) Das Sarcosin wird durch die Sarcosinoxidase unter Verwendung von Wasser und Sauerstoff zu Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxyd umgesetzt. (4) Das entstandene Wasserstoffperoxyd bildet mit 4-Aminoantipyrin und Trijodhydroxybenzoesäure unter katalytischer Einwirkung der Peroxidase einen Chinoniminfarbstoff, der photometrisch gemessen werden kann.

Creatinin entsteht im Muskelstoffwechsel aus Creatin oder Creatinphosphat, welche sich dort zur Energiereserve befinden. Creatinin wird über die Nieren mit dem Urin ausgeschieden. Es hat für den Körper keine besondere Bedeutung. Da es von den Nieren fast vollständig filtriert wird, wird es zur Überprüfung der Nierenfunktion verwendet.

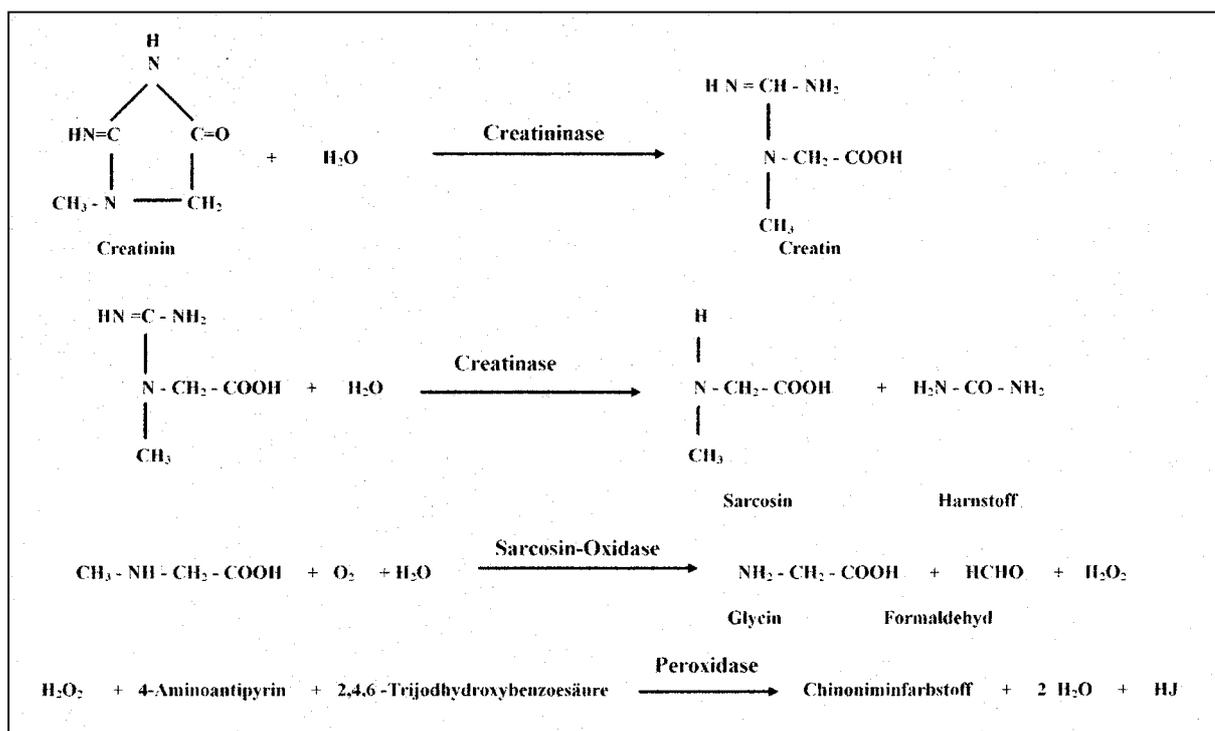


Abbildung 4 Creatininbestimmung

5.17. Bisher bekannte Creatinasen

Creatinasen wurden in einigen Bakterien, wie in *Pseudomonas putida* (HÖFFKEN ET AL., 1988), in *Alcaligenes* (MATSUDA ET AL., 1986), in *Flavobacterium* sp. U-180 (KOYAMA ET AL., 1990), in *Bacillus* sp. B-0618 (SUZUKI ET AL., 1993) und in *Actinobacillus* (PADMANABHAN ET AL., 2002) gefunden, wobei ihnen allgemein eine Rolle im bakteriellen Creatinabbau zugeordnet wird.

Die *Erwinia* sp.-Creatinase weist zur Creatinase aus *Pseudomonas putida* 64 % Sequenzidentität auf. Letztere wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eingehend charakterisiert. So wurde von HÖFFKEN und Kollegen (1988) ihre Röntgenkristallstruktur mit einer Auflösung von 1,9 Å gelöst. Dieses Enzym ist ein Homodimer mit 45 kDa je Untereinheit. Auf Basis von Röntgenkristallstrukturen der Creatinase aus *Pseudomonas putida* mit Carbamoyl-Sarcosin (ein sehr nah verwandtes Substratanalogon), Creatin (Substrat), Succinamic-Säure und Bikarbonat (beides Inhibitoren) konnte von COLL und Kollegen (1990) der mögliche Reaktionsmechanismus dieser Creatinase abgeleitet werden. Weiterhin ist bekannt, dass die

Creatinase aus *Pseudomonas putida* nur begrenzte funktionelle Stabilität zeigt und nach ihrer Deaktivierung, Denaturierung oder Dissoziation nicht rekonstituiert werden kann. Von SCHUHMANN und Kollegen (1993, A) wurde die Creatinase aus *Pseudomonas putida* hinsichtlich ihres nativen und denaturiertem Zustand ausführlich charakterisiert und ihre Stabilität mittels geeigneter Lösungszusätze erhöht. Ein weiterer Ansatz zur Stabilisierung der Creatinase aus *Pseudomonas putida* wurde von SCHUMANN ET AL (1993 B) beschrieben. Mittels Zufallsmutagenese wurde eine Variante erzeugt, deren apparenter Schmelzpunkt $T_{M(\text{app})}$ gegenüber dem des Wildtypenzym um 6,3 °C erhöht war. Die resultierende Mutante trägt drei Aminosäureaustausche.

Auch die Röntgenkristallstruktur der Creatinase aus *Actinobacillus* ist (mit 2,7 Å Auflösung) bekannt (PADMANABHAN & HORIKOSHI, 2002; PADMANABHAN ET AL., 2002). Allerdings waren zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit weder die Aminosäuresequenz noch die Raumkoordinaten dieser Creatinase zugänglich.

5.18. Stabilität von Proteinen

Die räumliche Struktur und die Stabilität globulärer Proteine wird hauptsächlich durch elektrostatische Kräfte zwischen polaren oder geladenen Gruppen und durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Aminosäureresten bedingt. Demgegenüber weist das Protein im gefalteten Zustand ein Verlust an konformationeller Entropie auf. Die resultierende Stabilität globulärer Proteine ist sehr gering und entspricht einer geringen Anzahl an schwachen intermolekularen Wechselwirkungen (JAENICKE, 1993 B; DILL, 1990).

Es gibt Mikroorganismen mit optimalen Wachstumstemperaturen von über 100 °C. Ihre Proteine wurden in Verlauf der Evolution an extreme Temperaturen adaptiert. Diese Proteine werden verwendet, um die molekulare Basis von Proteinstabilität und Enzymfunktion zu untersuchen. Es besteht ein breites Interesse darin, herauszufinden, welche Strategien von der Natur verwendet werden, um Proteine von thermophilen Organismen zu stabilisieren. Beim Vergleich der Proteinstrukturen mesophiler Organismen mit ihren thermophilen Homologen konnte herausgefunden werden, dass die thermische Stabilität auf folgende Effekte zurückgeführt werden kann: erhöhte Packungseffizienz (hauptsächlich durch „van der Waals“-Wechselwirkungen), Netzwerke von Ionenpaaren und Wasserstoffbrückenbindungen (einschließlich α -Helix-Stabilisierung), Verringerung konformationeller Spannungen (*Loop*-Stabilisierung) und Resistenz gegen chemische Modifizierungen (JAENICKE & BOEHM, 1998). Offensichtlich wurden von der Natur verschiedene Strategien zur Thermostabilisierung von Proteinen verwendet (WINTRODE &

ARNOLD, 2001). Allgemeingültige Vorhersagen oder Regeln für das Stabilisieren von Proteinen durch Aminosäureaustausche sind allerdings noch nicht möglich (BOEHM & JAENICKE, 1994; JAENICKE, 2000). Somit ist die Anwendung des rationalen Proteindesigns basierend auf bekannten Proteinstrukturen zur Lösung dieser Probleme sehr schwierig. Seit dem Aufkommen des evolutionären Proteindesigns (siehe Abschnitt 5.3 ff) wurden den Forschern neue Werkzeuge in die Hand gegeben, die die effiziente Stabilisierung von Proteinen ohne detailliertes Wissen über die Struktur-Stabilitätsbeziehungen ermöglichen. Ferner können auf diese Weise ein tieferes Verständnis der physikochemischen Beziehungen zwischen Struktur und Stabilität und auch Erkenntnisse zur evolutionären Adaptierung extrem stabiler Proteine erhalten werden.

5.19. Gerichtete Evolution von thermostabilen Proteinen

Vorrangig aus den Laboren von FRANCES H. ARNOLD wurden Beispiele zur Thermostabilisierung von Proteinen mittels wiederholter Zyklen fehlerhafter PCR, Rekombination und *Screening* publiziert. In diesen Beispielen konnte in drei bis acht Zyklen die thermische Stabilität von Proteinen um 14 °C bis 17 °C erhöht werden. Dies war mit 7 - 13 Aminosäureaustauschen verbunden (GIVER ET AL., 1998; ZHAO & ARNOLD, 1999; MIYAZAKI ET AL., 2000; GERSHENSON ET AL., 2000).

In einem Beispiel der gerichteten Evolution zur Stabilisierung von Proteinen wurde mit sechs Zyklen fehlerhafter PCR, Rekombination und *Screening* die Erhöhung des Schmelzpunktes T_M der *p*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus subtilis* (GIVER ET AL., 1998) um 14 °C erreicht. Die resultierende Mutante trägt acht Aminosäureaustausche.

In einem weiteren Beispiel (ZHAO & ARNOLD, 1999) wurde mit fünf Generationen fehlerhafter PCR, Rekombination und *Screening* das *Bacillus subtilis*-Enzym Subtilisin E in ein Enzym konvertiert, welches in seinen Eigenschaften seinem thermophilen Homolog Thermitase aus *Thermoactinomyces vulgaris* entspricht. Die Halbwertszeit bei 85 °C (3,5 min) und das Temperaturoptimum T_{opt} (76 °C) des entwickelten Enzyms Subtilisin E 5-3H5 sind identisch zu denen der Thermitase. Das Temperaturoptimum T_{opt} ist nun 17 °C höher und die Halbwertszeit bei 65 °C beträgt das 200-fache im Vergleich zum Subtilisin. Die Thermitase unterscheidet sich vom Subtilisin E in 157 Aminosäuren. Nur acht Aminosäureaustausche waren jedoch nötig, um Subtilisin E ebenso sehr zu stabilisieren.

Wie an den genannten Beispiel zu erkennen ist, sind nur wenige Aminosäureaustausche für die deutliche Erhöhung der thermischen Stabilität nötig. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit

sollte zur Stabilisierung der Creatinase die fehlerhafte PCR verwendet werden, welche ebenfalls auf dem Austausch weniger Aminosäuren beruht.

5.20. Ziel der Arbeit (2)

Die Creatinase aus *Erwinia sp.* soll hinsichtlich ihres apparenten Schmelzpunktes $T_{M(\text{app})}$ von 58 °C auf mindestens 63 °C unter Bewahrung ihrer katalytischen Eigenschaften bzw. ihrer enzymatischen Effizienz verändert werden. Dies soll mit Methoden der gerichteten Evolution, genauer gesagt, mit fehlerhafter PCR und anschließendem *Screening* erreicht werden und erfolgt in Kombination mit Sättigungsmutagenesen (Permutation von Aminosäuren) an den positiv identifizierten Positionen, um die Limitation durch die konservative Natur des genetischen Codes (siehe Abschnitt 5.9) zu überwinden. Durch vergleichende Untersuchungen zur resultierenden Mutante und dem Wildtyp-Enzym sollen anschließend Hinweise zum Mechanismus der Stabilisierung erhalten werden.

6. Material und Methoden

6.1. Materialien , Lösungen und Medien

Materialien

1,4-Dithiothreitol	ICN, Eschwege
Agarose	Roche Diagnostics GmbH
Alkalische Phosphatase (Krabbe)	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Ampicillin	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Bacto Agar	Merck KgaA, Darmstadt
Bacto Trypton	Beckton Dickinson
Bacto Yeast Extract	Beckton Dickinson
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bis-Tris NuPage-Gele	Invitrogen
B-PER®	Pierce
Centriplus YM-30	Millipore
Creatin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CSPD	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
DEAE-Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech,
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
DIG Standard V, DIG-markiert	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
DNA-Längenstandard V	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
DNA-Längenstandard VIII	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Essigsäure, p.A.	Riedel-de-Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Merck KgaA, Darmstadt
Guanidiniumhydrochlorid, ultrapure	Applichem, Darmstadt
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Kanamycin	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche

Lysozym	Applied Science, Mannheim Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Microcon 50	Millipore
Mikrotiterplatten	Beckton Dickinson
MnCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt
Novex® TBE-Urea-Gele	Invitrogen
Nukleotide	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Nylonmembran	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Orange G	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenylsapharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech,
POD	Roche Diagnostics GmbH
Proteinmarker Mark 12	Invitrogen
QIAquick Gelextraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quikchange™ Site-Directed Mutagenesis	Stratagen
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Dialyseschläuche	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Sarkosinoxidase	Roche Diagnostics GmbH
Superdex™ 200, prep grade	Amersham Pharmacia Biotech
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Taq-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Taq-Polymerase/Exonuklease III	Roche Diagnostics GmbH
TBE	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
TBHB	Roche Diagnostics GmbH
TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen

Ultrafiltrationszellen	Millipore
Uracil-DNA-Glycosylase	Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Mannheim
Xcell II™ Blott Module	Invitrogen
Xylencyanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Riedel de Haen (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Lösungen und Medien

10 x TAE	400 mM Tris-Acetat, 10 mM EDTA, pH 8
10 x TBE	890 mM Tris-Base, 890 mM Borat, 20 mM EDTA, pH 8
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10/l NaCl, pH 7,5
5 x DNA-Auftragspuffer	20 % Ficoll, 1 % SDS, 0,25 % Xylencyanol, 0,1 M EDTA, pH 8
10 x DNA-Auftragspuffer (denaturierend)	0,3 % Orange G, 50 mM EDTA in Formamid

Zur Selektion wurden den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

Zum Herstellen von Agarplatten wurden den Medien vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto-Agarpulver beigefügt. Alle zum sterilen Arbeiten mit Nukleinsäuren verwendeten Puffer, Lösungen und Medien wurden vor der Verwendung autoklaviert. Nicht hitzebeständige Komponenten, wie Antibiotika, wurden sterilfiltriert (Membranfilter von MILLIPORE, 0,25 µm Porendurchmesser) und den autoklavierten Lösungen nach dem Erkalten zugesetzt. Zum Herstellen von Puffern und Lösungen wurde Millipore-Wasser verwendet.

6.2. Bakterien und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1, die verwendeten Vektoren und Plasmide in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Sratagene
<i>E. coli</i> HB 101	<i>thi-1 hsdS20 (r_B-, m_B-) supE44 recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 (str^r) xyl-5 mtl-1</i>	Promega

Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide

Vektoren	Beschreibung	Referenz/Quelle	
pKK177-3HB	P _{mgl} , Ap ^R	Dr. Zhixin Shao, Roche Diagnostics GmbH	
pCR [®] -XL-TOPO [®]	P _{lac} , Kan ^R , Zeo ^R , lacZα, ccdB	INVITROGEN	
Plasmide	Beschreibung	Referenz/Quelle	Bezeichnung
pCA3	P _{mgl} , Creatinase aus <i>Erwinia sp.</i> , Ap ^R	Dr. Zhixin Shao, Roche Diagnostics GmbH	pCTwt (Wildtyp-Creatinase)
pCT1m7	Mutante von pCTwt	Diese Arbeit	
pCT1m24	Mutante von pCTwt	Diese Arbeit	
pCT2m9	Mutante von pCTwt	Diese Arbeit	
pCT2m10	Mutante von pCTwt	Diese Arbeit	
pCTsd2	Mutante von pCTwt	Diese Arbeit	
pCTqc2	Mutante von pCTwt	Diese Arbeit	
pCTsd7	Mutante von pCTwt	Diese Arbeit	
pES10	P _{mgl} , mgl-Signalpeptid, reife PLAP (Alkalische Phosphatase aus humaner Plazenta), Phage- <i>φ</i> -Terminator-Region, Ap ^R	Beck &urtscher, 1994	pHPAP (Human Placental Alkaline Phosphatase)
p1A2B	pES10 mit einer löslich und aktiv exprimierenden Alkalischen Phosphatase II aus Kälberdarm	Dr. Zhixin Shao, Roche Diagnostics GmbH	pCIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)

6.3. Oligonukleotide

Es wurden HPLC-gereinigte Oligonukleotide der Firma Thermo Hybaid verwendet. Für ortsgerichtete Mutagenese wurden die Oligonukleotide zusätzlich über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) gereinigt.

Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotide für Creatinase	Sequenz
<i>Für Fehlerhafte PCR:</i>	
ECF21	CAG GAA ACA GAA TTC ATG ACT
HIR21	CCA AAA CAG CCA AGC TTT CAG
<i>Für Sättigungs-mutagenese:</i>	
CT59F	GCA TCA ATT ACT ACT CTG GAN NNC TGT ACT GCT ATT TCG GCC GC
CT59R	GCG GCC GAA ATA GCA GTA CAG NNN TCC AGA GTA GTA ATT GAT GC
CT130F	CGG TAT CGA GTT CGA TCA CGT GNN NCT TGA CTT CCG CCG C
CT130R	GCG GCG GAA GTC AAG NNN CAC GTG ATC GAA CTC GAT ACC G
CT203F	CGC CAC AAC CAA TGC GNN NGT CCG CGA GAT CGC C
CT203R	GGC GAT CTC GCG GAC NNN CGC ATT GGT TGT GGC G
CT395F	CAT TAC CGG ATT CCC CNN NGG GCC TGA GCA CAA C
CT395R	GTT GTG CTC AGG CCC NNN GGG GAA TCC GGT AAT G
<i>Für Ortsgerichtete Mutagenese:</i>	
CTF59W-F	GCA TCA ATT ACT ACT CTG GAT GGC TGT ACT ACT GCT ATT TCG GCC GC
CTF59W-R	GCG GCC GAA ATA GCA GTA CAG CCA TCC AGA GTA GTA AAT GAT GC
CTF395L-F	CAT TAC CGG ATT CCC CCT GGG GCC TGA GCA CAA C
CTF395L-R	GTT GTG CTC AGG CCC CAG GGG GAA TCC GGT AAT G
Oligonukleotide für Alkalische Phosphatase	Sequenz
APhpaF	CTT CGG CGT TCA GTA ACA CGC
DIG-AP	DIG- CTT CGG CGT TCA GTA ACA CGC
APxbaR	GCT TTC GAG GTG AAT TTC GAC C
CIAPint1F	GGT CAC GTC TGT GAT CAA CCG
CIAPint1R	CGG TTG ATC ACA GAC GTG ACC

CIAPint2F	GGC AA GCT TAT ATG GCA CTG AC
CIAPint2R	GTC AGT GCC ATA TAA GCT TGC C
HPAPint1F	CCA AGA AAG CAG GGA AGT CAG TG
HPAPint1R	CAC TGA CTT CCC TGC TTT CTT GG
HPAPint2F	CAT GTT CGA CGA CGC CAT TGA G
HPAPint2R	CTC AAT GGC GTC GTC GAA CAT G

6.4. Geräte

UV-Transilluminator	Herolab GmbH, Wiesloch
Mehrkanalpipetten	Biohit
Gradientencycler	Eppendorf
Brutschüttler	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Tischzentrifuge	Neolab, Heidelberg
Photometer Cary 50	Varian
Power Supply	Amersham Biosciences
Brutschrank	WTC Binder, Tuttlingen
Inkubator	Memmert
Zentrifuge Sorvall RC 5B	Du Pont

Alle nicht genannten Geräte sind im Methodentext aufgeführt.

6.5. Computerprogramme

Die Analyse von DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Programm Clustal W, Version 1.7; die Analyse von Proteinsequenzen mit dem Programm AAMWT (beides Wisconsin Package Version 10.2, Genetics Computer Group [GCG], Madison, Wisc.). Die Berechnung und graphische Darstellung von Daten erfolgte entweder mit dem Programm SigmaPlot Version 5.0 (Jandel Scientific Software, San Rafael, USA) oder mit Microsoft® Excel 2000. Die Darstellung der DNA- oder Protein-Abbildungen erfolgte unter Verwendung des Programms LISCAP (Capture Application) und der Microsoft®-Programme Power Point® 2000 und Corel Draw 8.

6.6. Molekularbiologische Methoden

6.6.1. Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

Superkompetente XL1-Blue-Zellen (STRATAGENE) wurden nach einer vereinfachten Version des Herstellerprotokolls mit Plasmid-DNA transformiert. Dazu wurden 100 µl eiskalte 50 mM CaCl₂-Lösung mit 50 µl auf Eis aufgetauten Zellen und 1 µl DNA-Lösung gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde 45 sec im Wasserbad bei exakt 42 °C erhitzt und wiederum 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen 45-60 min bei 37 °C und 225 U/min kultiviert und schließlich je 10 und 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum appliziert. Diese Agarplatten wurden über Nacht (üN) bei 37 °C belassen.

Die Transformation von *E. coli* wurde erstmals von MANDEL & HIGA (1970) beschrieben. Spätere Modifizierungen zur Erhöhung der Transformationseffizienz beinhalteten eine verlängerte Exposition der Zellen mit CaCl₂ (DAGERT & EHRLICH, 1979).

6.6.2. Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die Herstellung elektrokompenter Zellen von *E. coli* sowie die Transformation mit Plasmid-DNA wurde gemäß dem Protokoll aus CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 1.8.4 durchgeführt.

Elektroporation ist eine effiziente Methode, um Nukleinsäuren in pro- oder eukariotische Zellen einzubringen. Bei dieser Technik werden die Zellen für kurze Zeit einem elektrischen Hochspannungsfeld ausgesetzt, wobei offenbar in der Zellmembran Löcher entstehen, durch die DNA aufgenommen wird (SHIGEKAWA & DOWER, 1988).

6.6.3. Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Die *E. coli*-Stämme XL1-Blue und HB101 wurden bei 37 °C und 225 U/min in LB-Medium kultiviert. Stämmen mit Plasmiden wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Kulturen mit Inkubationszeiten von mindestens 14 h wurden als Übernacht-(üN)-Kulturen bezeichnet. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agarplatten oder direkt aus einer Glycerinkultur angeimpft. Zur Konservierung der Bakterienstämme wurden zu 500 µl einer üN-Kultur 500 µl einer 40 %-igen Glycerinlösung gegeben und diese bei -80 °C gelagert.

6.6.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch Verwendung des ‚HIGH PURE PLASMID ISOLATION KITS der ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE (Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit Wasser eluiert.

Diese Methode beruht auf folgendem Prinzip: Nach alkalischer Lyse nach BIRNBOIM & DOLY (1979) und RNase-Verdau wird der Extrakt in Anwesenheit des chaotropen Salzes GdnHCl auf Glasfaser-Säulchen gegeben, an denen die Plasmid-DNA selektiv bindet (VOGELSTEIN & GILLESPIE, 1979). Die gebundene Plasmid-DNA wird in mehreren Waschschrritten gereinigt und mit Niedrigsalz-Puffer oder Wasser eluiert.

6.6.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für analytische Amplifizierung und die Methodenentwicklung der *Walk Through* Rekombination wurde wegen ihrer hohen Prozessivität die *Taq*-Polymerase (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE, Mannheim) verwendet. Der PCR-Ansatz enthielt 10 - 20 ng *Template*-DNA, je 10 - 20 pmol der Primer, je 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ und 1 - 2,5 U *Taq*-Polymerase in 50 µl. Die Temperaturprogramme wurden in Hinblick auf die Amplifizierung des Creatinase-Gens und des Alkalische-Phosphatase-Gens optimiert:

Vorgang	Creatinase	Alkalische Phosphatase	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C, 5 min	94 °C, 5 min	1
Denaturierung	95 °C, 1 min	94 °C, 1 min	
<i>Annealing</i>	65 °C, 1 min	60 °C, 1 min	30
Extension	72 °C, 2 min	72 °C, 2 min	
Finale Extension	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min	1

6.6.6. Reinigung von PCR-Produkten

Zum Abtrennen von Nukleotiden, Primern und Salzen von den PCR-Produkten für ihre anschließende Behandlung mit Restriktionsenzymen wurde der QIAQUICK PCR PURIFICATION KIT der Firma QIAGEN gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wurde mit Wasser eluiert.

Das QIAQUICK-Prinzip beruht auf Bindung von Nukleinsäuren an Silicagel-Membran-Säulchen in Anwesenheit des chaotropen Salzes GdnHCl (VOGELSTEIN & GILLESPIE, 1979). Die gebundene DNA wird in mehreren Waschschrinen gereinigt und mit Nidrigsalz-Puffer oder Wasser eluiert.

6.6.7. Gelelektrophorese von Doppelstrang-DNA

Doppelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von 0,5 - 5 kb wurden in 1 %-igen Agarose-Gelen mit entweder 1 x TBE oder 1 x TAE (bei präparativen Agarose-Gelen) als Elektrophoresepuffer in horizontalen Gelkammern (PHARMACIA BIOTECH) spannungslimitiert bei 100 - 120 V aufgetrennt. Die Elektrophoresedauer betrug je nach Gelgröße 30 - 120 min. Die Markierung der DNA erfolgte mit Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml, das der flüssigen Agaroselösung vor dem Gießen der Gele zugesetzt wurde.

6.6.8. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Einzelstrang-DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von Einzelstrang-DNA-Fragmenten erfolgte in denaturierenden 6 %-igen Polyacrylamid-Gelen (NOVEX[®] TBE-UREA-GEL) in TBE-Laufpuffer bei 180 V gemäß den Herstellerangaben. Die Proben wurden vor dem Auftrag 5 min bei 95 °C in Auftragspuffer (10 x Auftragspuffer: 0,3 % Orange G, 50 mM EDTA in Formamid) denaturiert. Zum Auflösen von Doppelsträngen oder Sekundärstrukturen enthielten die Gele 7 M Harnstoff. Für einen sehr sensitiven Nachweis der DNA wurde diese vorher mit DIG markiert (siehe Abschnitt 6.6.18). Nach der Elektrophorese wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und immunologisch detektiert (siehe Abschnitte 6.6.19 f).

6.6.9. Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Die Elution von DNA aus Agarose-Gelen wurde mit dem QIAQUICK GELEXTRACTION KIT der Firma QIAGEN gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Methode beruht auf einer Solubilisierung der Agarose und anschließender Bindung der DNA an Silicagel-Membran, wie in Abschnitt 6.6.6 beschrieben wurde.

6.6.10. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur DNA-Spaltung wurden Restriktionsenzyme der Firma ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE (Mannheim) verwendet. Die eingesetzte Enzymmenge berechnete sich anhand der Unit-Definition für Restriktionsenzyme. Es wurde darauf geachtet, dass das Volumen der Enzymlösung nicht mehr als 10 % (v/v) des Restriktionsansatzes betrug, um eine Unspezifität der Enzymaktivität zu vermeiden

(„Sternaktivitäten“). Die Inkubationstemperatur richtete sich nach den Angaben des Herstellers und wurde für eine Dauer von 30 min bei analytischen Restriktionen bzw. für eine Dauer von 2 h bei präparativen Restriktionen durchgeführt.

6.6.11. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Dephosphorylierung des linearisierten Vektors verhindert dessen Rezirkularisierung während der Ligation über Restriktionsschnittstellen und wurde bei schwierigen Klonierungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Alkalische Phosphatase aus Krabben (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

6.6.12. DNA-Ligation über Restriktionsschnittstellen

Die Ligation von Restriktions-gespaltenen DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung der T4 DNA LIGASE (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE, Mannheim) oder des RAPID DNA LIGATION KITS (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE, Mannheim; enthält ebenfalls T4 DNA-Ligase) gemäß den Angaben des Herstellers. Als Ligationskontrolle wurde stets die Vektor-DNA in Abwesenheit der Insert-DNA mitgeführt, um den Anteil der Rezirkularisierung kontrollieren zu können.

6.6.13. DNA-Ligation mittels TOPO[®] PCR- Klonierung

Die sehr effiziente Klonierung in den Vektor pCR[®]-XL-TOPO[®] (TOPO[®] XL PCR CLONING KIT, INVITROGEN) wurde angewendet, wenn die Strategie der Klonierung über Restriktionsschnittstellen ohne Erfolg war. Sie besteht aus einer Topoisomerase-vermittelten Ligation (SHUMAN, 1994) eines PCR-Produktes mit Einzel-3′Deoxyadenosin-Überhang (A) in einen Vektor mit Einzel-3′Deoxythymidin-Überhang (T). Die Stelle der Insertion befindet sich im Leseraster für das letale Gen *ccdB* (DNA-Gyrase-Inhibitor), welches mit dem C-Terminus des LacZ α -Fragments fusioniert ist. Die Ligation eines langen PCR-Produktes unterbricht die Expression der *lacZ α -ccdB*-Genfusion und ermöglicht somit nur positiven Rekombinanten das Überleben nach der Transformation (BERNARD ET AL., 1994).

Der für die Klonierung benötigte A-Überhang am PCR-Produkt wird während der PCR-Reaktion an die DNA angefügt, da die *Taq*-Polymerase über eine *Template*-unabhängige Terminale Transferase-Aktivität verfügt. Die TOPO[®]-Klonierung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

6.6.14. Sequenzierung von Plasmid-DNA

DNA-Sequenzierungen wurden bei der Firma SEQUIERVE (Vaterstetten) in Auftrag gegeben. Die DNA aller Mutanten der Creatinase oder der Alkalischen Phosphatase wurden, auch bei gezielten Punktmutationen, komplett sequenziert.

6.6.15. Zufallsmutagenese mittels fehlerhafter PCR (mPCR)

Zur Einführung verschiedener Mutationen ohne Präferenzen für eine der möglichen Arten des Basenaustausches wurde ein Protokoll für fehlerhafte PCR nach CADWELL ET AL. (1994) angewendet. In diesem Protokoll wurden einige Parameter optimiert:

- Für die fehlerhafte PCR wird üblicherweise die *Taq*-Polymerase verwendet, da sie nicht über die Fähigkeit zur Fehlerkorrektur verfügt. Die Menge an eingesetzter Polymerase wird erhöht, um die Kettenverlängerung hinter Positionen mit *Mismatch*-Paarungen zu unterstützen.
- Der Einsatz höherer $MgCl_2$ -Konzentrationen erleichtert die Hybridisierung der DNA-Stränge und führt somit zur Stabilisierung nichtkomplementärer Basenpaare.
- $MnCl_2$ wird hinzugefügt, um die *Template*-Spezifität der *Taq*-Polymerase zu stören.
- Die Konzentrationen an dCTP und dTTP sind erhöht, um Fehleinbau zu begünstigen.

Die fehlerhafte PCR wurde zur Herstellung von zwei Mutantengenerationen der Creatinase (erste und zweite mPCR) verwendet. Die PCR-Ansätze enthielten 40 ng *Template*-DNA, je 10 pmol der Primer (ECF21 und HIR21), je 0,2 mM dATP und dTTP, 7 mM $MgCl_2$ und 5 U *Taq*-Polymerase in 100 μ l. Die $MnCl_2$ -Konzentration wurde in dem Bereich von 0-0,5 mM in der ersten mPCR und von 0-0,9 mM in der zweiten mPCR variiert. Das Temperaturprogramm wurde für die Amplifizierung des Creatinase-Gens mit der Primern ECF21 und HIR 21 optimiert. Dabei betrug die *Annealing*-Temperatur für die erste PCR 46 °C und für die zweite PCR 70 °C:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	
<i>Annealing</i>	46/70 °C	1 min	30
Extension	72 °C	2 min	
Finale Extension	72 °C	10 min	1

Zur Bewertung der fehlerhaften PCR wurde zunächst die Produktausbeute auf einem Agarose-Gel überprüft. Einige dieser PCR-Produkte wurden kloniert und auf ihren Anteil aktiver Klone getestet. In der ersten Mutantengeneration der Creatinase wurde schließlich ein PCR-Produkt verwendet, das in Anwesenheit von 0,5 mM MnCl₂ generiert wurde und ca. 60 % aktive Klone lieferte. Für die zweite Mutantengeneration das PCR-Produkt der 0 mM-MnCl₂-Reaktion verwendet, welches ca. 60 % aktive Klone generierte.

6.6.16. Ortsgerichtete Mutagenese

Zum Einbringen gezielter Punktmutationen in die DNA-Sequenz wurde der QUIKCHANGE™ SITE-DIRECTED MUTAGENESIS KIT der Firma STRATAGENE angewendet. Zwei komplementäre Primer, die die mutierte Sequenz in ihrer Mitte tragen, dienen der linearen Amplifizierung des gesamten Plasmids. Anschließend wird das parentale Plasmid mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut, welches eine methylierte 4bp-Erkennungssequenz besitzt und somit die DNA der meisten bakteriellen Präparationen schneiden kann, nicht jedoch die neu synthetisierte DNA der Mutagenese-Reaktionen. Die mutierte Plasmid-DNA liegt nun ringförmig mit versetzten Einzelstrangbrüchen vor, die nach der Transformation in *E. coli* von den bakteriellen Enzymen repariert werden.

Die ortsgerechte Mutagenese an Creatinase-Sequenzen wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 20 ng *Template*-DNA, je 10 pmol der Primer, je 0,2 mM der dNTPs, 1,5 Mm MgCl₂ und 2,5 U *PfuTurbo*-Polymerase (STRATAGENE) in 50 µl. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	1
Denaturierung	95 °C	30 s	
<i>Annealing</i>	55 °C	1 min	18
Extension	68 °C	8 min	

6.6.17. Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese

Die ortsgerechte Sättigungsmutagenese geschieht identisch zur ortsgerechten Mutagenese (siehe Abschnitt 6.6.16) mit einer Ausnahme: Die Primer an der Stelle der Mutation tragen ein NNN (N: IUB-Code für A, C, G und T) und codieren für jede kanonische Aminosäure an dieser Position. Als Ergebnis der ortsgerechten Sättigungsmutagenese-Reaktion sollte der

Mutanten-*Pool* 20 Mutanten enthalten, die sich in dieser einen Position unterscheiden, zuzüglich den drei Stop-Codon tragenden Deletionsmutanten.

6.6.18. Markierung von DNA mit DIG

DNA-Fragmente wurden nicht-radioaktiv durch den Einbau von DIG markiert. Dies erfolgte durch Verwendung eines DIG-tragenden Primers (Firma THERMO HYBAID) anstelle eines normalerweise zu verwendenden Primers in der Fragmentsynthese oder in der PCR-Reaktion.

6.6.19. DNA-*Electroblotting* vom Polyacrylamid-Gel auf Nylonmembran

Der Transfer der Einzelstrang-DNA-Fragmente aus dem Polyacrylamid-Gel auf die Nylonmembran (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE, Mannheim) erfolgte mittels *Electroblotting* in einer Apparatur der Firma INVITROGEN (XCELL II™ BLOTT MODULE). Der Aufbau des *Blotting-„Sandwiches“* aus Gel, Membran und Schaumstoffzwischenlagen entsprach dem Western-Transfer-Protokoll des Herstellers. Der Transfer erfolgte in 1 x TBE-Puffer bei 25 V für 1 - 2 h. Die auf die Nylonmembran transferierte DNA wurde durch eine dreiminütige UV-Exposition quervernetzt.

6.6.20. Detektion DIG-markierter DNA

Der immunologische Nachweis DIG-markierter DNA erfolgte chemilumineszent mit dem DIG LUMINESCENT DETECTION KIT und CSPD® (beides ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE, Mannheim) als Substrat für die alkalische Phosphatase. Das chemilumineszente Signal wurde durch Exposition an dem Photodetektionssystem LUMI-IMAGER (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE, Mannheim) aufgezeichnet.

Die DIG-markierte Probe wird mit einem Anti-DIG-Fab-Fragment immunodetektiert, welches mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist und mit dem chemilumineszenten Substrat CSPD visualisiert wird. Die enzymatische Dephosphorylierung von CSPD führt zu einer Lichtemission mit einer Wellenlänge von 477 nm.

6.7. Hochdurchsatz-Screening der Creatinase-Mutanten

6.7.1. Screening-Prinzip

Im Hochdurchsatz-Screening der ersten Mutantengeneration wurde auf erhöhte thermische Stabilität getestet. Dieses *Screening* war nicht automatisiert, das Animpfen der Klone erfolgte

manuell mit sterilen Zahnstochern. Für alle Arbeitsschritte wurden Mehrkanalpipetten verwendet. In der zweiten Mutantengeneration wurde auf thermische Stabilität und Enzymaktivität bei Substratlimitation „gescreent“, automatisiert unter Verwendung von Robotern.

Das *Screening* der Creatinase-Mutanten auf thermische Stabilität und Enzymaktivität bei Substratlimitation erfolgte nach folgendem Prinzip. Der Rohextrakt einer Creatinase-exprimierenden *E. coli*-Kultur wurde gedrittelt und diente zur

- (1) Bestimmung der Creatinase-Aktivität (= MTP 1)
- (2) Bestimmung der Creatinase-Aktivität nach einer Temperaturbehandlung (= MTP 2) und
- (3) Bestimmung der Creatinase-Aktivität bei einer Substratkonzentrationen weit unterhalb des Substratsättigungsbereiches (= MTP 3).

Aus dem Verhältnis der Aktivitäten von (2) oder (3) zur Ausgangsaktivität (1) kann auf eine relative Veränderung der Eigenschaften geschlossen werden: Ein hohes Verhältnis von (2)/(1) steht für eine Thermostabilisierung. Ein hohes Verhältnis von (3)/(1) steht für erhöhte Aktivität bei niedrigen Substratkonzentrationen, was mit einer Verschiebung des K_M -Wertes zu niedrigen Substratkonzentrationen einhergeht. Das *Screening* erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten (MTPs). Auf jeder Platte wurden einige Positionen mit dem „Elternklon“ als Kontrolle besetzt.

6.7.2. Erste Mutantengeneration (nicht automatisiert)

Animpfen der Kulturen von der Agarplatte und Kultivierung

Die Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern in 200 μ l LB-Amp-Medium in MTPs überimpft und üN bei 37 °C inkubiert.

Zellaufschluss und Aliquotieren

Die Bakterienkulturen wurden 10 %-ig (v/v) mit einem Gemisch aus B-PER® BACTERIAL PROTEIN EXTRACTION REAGENT der Firma PIERCE und Lysozym (1 mg/ml in B-PER) versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Reagens beinhaltet laut Hersteller ein mildes nichtionisches Detergens in 20 mM Tris (pH 7,5). Je 2 x 20 μ l Aliquots wurden für die Aktivitätstests (1) und (2) entnommen.

Temperaturbehandlung

Der Rohextrakt der MTP (2) wurde in maßangefertigten Metall-Formen, bestehend aus

Boden und Deckel, für 40 min bei 50 °C in einem Inkubator (MEMMERT TYP II 25) erhitzt. Die Kontroll-MTP (1) wurde 5 min bei 50 °C inkubiert, um Temperatureffekte im Material der MTP zu relativieren.

Messung der Enzymaktivität

Der Creatinase-Enzymtest erfolgte mit einem MTP-Reader (THERMO RAINBOW, TECAN) und der Software EASYWINKINETICS (TECAN). Zu 10-20 µl Probe wurde 80 µl Substratlösung pipettiert, die alle Komponenten des Creatinase-Tests (siehe Abschnitt 6.8.12) im gleichen Verhältnis enthielten. Es wurde 10 min bei 25 °C die Absorption bei 546 nm detektiert (Messintervalle 1 min, vor jeden Messpunkt 5 s schütteln). Die linearen Anstiege der Absorptionen im Zeitintervall von 5 - 10 min wurden für die Berechnung der relativen Restaktivitäten nach Temperaturbehandlung verwendet und mit der Kontrolle (Wildtyp Creatinase) verglichen.

Nachttest

Zur Verifizierung des *Screening*-Ergebnisses wurden die interessanten Klone jedes Plattensatzes auf neue MTPs überimpft und getestet. Nach einer engeren Auswahl wurden die Klone in Volumina von 6 ml angezogen und ihre Aktivität in einem in Küvetten durchgeführten Test gemessen: Nach dem Zellaufschluss (wie oben beschrieben mit Lysozym und B-PER™) folgte die K_M -Wert-Ermittlung (siehe Abschnitt 6.8.13) sowie die Bestimmung der relativen Restaktivität im Rohextrakt nach einer Temperaturbehandlung von 22 min bei 54 °C im Thermocycler.

6.7.3. Zweite Mutantengeneration (automatisiert)

Animpfen der Kulturen von der Agarplatte und Kultivierung

Die Creatinase-Mutanten wurden mit dem Roboter BIOPICK und der Software BIOPICK 2.0 (beides BIOBOTICS) gemäß den Angaben des Herstellers in MTPs überimpft. Die Einzelkolonien wurden in je 200 µl LB-Amp-Medium üN bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert.

Zellaufschluss und Aliquotieren

30 µl des Zellaufschluss-Reagenzes B-PER™ (siehe Abschnitt 6.7.2) wurde mit 120 µl der bakteriellen Zellkultur unter Verwendung des Pipettierroboters MULTIMEK™ 96 mit der Software MULTIMEK PRO SOFTWARE VERSION 1.4 gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Je 3 x 30 µl Aliquots wurden unter Verwendung des Pipettierroboters entnommen (MTPs (1), (2) und (3)).

Temperaturbehandlung

Die MTP (2) wurde für 35 min bei 55 °C in einem Inkubator (MEMMERT TYP II 25) in maßangefertigten Metall-Formen, bestehend aus Boden und Deckel, erhitzt.

Messung der Enzymaktivität

Der Creatinase-Enzymtest erfolgte automatisch an einer Pipettierstation (TECAN GENESIS RSP 150) mit einem MTP-Reader (THERMO RAINBOW, TECAN) und Software GEMINI/FACTS (TECAN) gemäß den Herstellerangaben. Die Pipettierstation wurde mit 3 x 9 MTPs und den Substratlösungen (siehe Abschnitt 6.7.2) bestückt. Für die Messungen (1) und (2) enthielt die Substratlösung 90 mM Creatin, für (3) nur 6 mM. Es wurde 10 min bei 25 °C die Absorption bei m detektiert (Messintervalle 1 min, vor jeden Messpunkt 5 s schütteln). Die linearen Anstiege der Absorptionen im Zeitintervall von 5 - 10 min wurden für die Berechnung der relativen Restaktivitäten nach Temperaturbehandlung bzw. in Anwesenheit reduzierter Substratkonzentration verwendet und mit der Kontrolle (Wildtyp Creatinase) verglichen.

Nachtest

Zur Verifizierung des *Screening*-Ergebnis wurden von jedem Plattensatz 5 - 10 interessante Klone auf neue MTPs überimpft und getestet. Es erfolgte eine engere Auswahl an Klonen, die nun in Volumina von 3 - 10 ml angezogen, durch Hochdruck oder durch Ultraschall (siehe Abschnitt 6.8.2) aufgeschlossen und mit in Küvetten durchgeführten Enzymtest bewertet wurden. Hierfür erfolgte die K_M -Wert-Ermittlung (siehe Abschnitt 6.8.13) sowie die Bestimmung der relativen Restaktivität im Rohextrakt nach einer Temperaturbehandlung von 16 min bei 54 °C im Thermocycler.

6.8. Expression, Reinigung und Analytik von Proteinen

6.8.1. Expression

Die Expression erfolgte unter Kontrolle des *mgl*-Promotors als cytoplasmatisches lösliches Protein. Der *mgl*-Promotor unterliegt der Katabolit-Repression durch Glucose und andere Katabolit-reprimierende Zucker (PCT/EP/88/00446). Die Induktion des *mgl*-Promotors erfolgte durch Animpfen (1 %, v/v) von Vorkulturen in LB-Amp-Medium ohne Zuckerzusatz. Die Kultur wurde 6 - 12 h bei 37 °C und 225 U/min inkubiert.

6.8.2. Gewinnung des Zellextraktes

Nach dem Zentrifugieren der *E. coli*-Kultur für 15 min bei 4 °C und 4000 U/min (SORVALL-Zentrifuge, GSA-Rotor oder BIOFUGE FRESCO, HERAEUS) wurde das Zellpellet in 10 Volumen 20 mM Tris, pH 8 suspendiert. Je nach Volumen der Suspension erfolgte der Zellaufschluss durch Ultraschall an der SONICS VIBRACELL (1 min Pulse bei 150 W, 1-10 ml) oder durch Hochdruckaufschluss am CONSTANT SYSTEMS LTD CELL DISRUPTION EQUIPMENT BASIC Z (950 bar, mind. 30 ml) oder am ONE SHOT MODEL (1,5 kbar, 5 ml, beide Geräte von AMERST BUSINESS CENTRE).

6.8.3. Polyminabtrennung

Polymin ist ein Anionenaustauscher und dient dem Abtrennen der DNA aus dem Zellextrakt. Um eine Bindung der ebenfalls negativ geladenen Creatinase zu vermeiden, wurde die Leitfähigkeit im Zellextrakt mit einer NaCl-Lösung auf 7 mS eingestellt. In Vorproben der Polyminabtrennung (1 ml Volumen) wurde die Polyminkonzentration ermittelt, bei der mindestens 90 % der Enzymaktivität erhalten bleiben (zwischen 0,1 - 0,5 %, w/v). Für die präparative Polyminabtrennung wurde eine 10 %-ige Polymin G20-Lösung (w/v) in den Zellextrakt gegeben, 5 min bei 4 °C gerührt und der Ansatz 15 min bei 10000 U/min bei 4 °C im GSA-Rotor der SORVALL-Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde für die DEAE-Chromatographie verwendet.

6.8.4. Chromatographie mit DEAE-Sepharose

DEAE-Sepharose ist ein schwacher Anionenaustauscher, an den die Creatinase aufgrund ihres niedrigen pI (pI der verschiedenen Mutanten zwischen 5,0 und 5,3. Berechnung mit dem Programm AAMWT) binden und mit steigender Salzkonzentration eluiert werden kann. DEAE-Sepharose besteht aus vernetzter Agarose als Trägermaterial, das mit kationischen Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE-) derivatisiert ist.

Pro Gramm Protein wurden 50 ml DEAE-Sepharose verwendet. Das Säulenmaterial wurde zunächst mit Wasser und mit Puffer A gewaschen, in eine Leersäule gepackt und die Flussrate bestimmt. Die Chromatographie erfolgte entweder an der ÄKTA PRIME der Firma AMERSHAM BIOSCIENCES oder an einer FPLC-Anlage, bestehend aus der Pumpe PUMP P-50, dem Fraktionssammler SUPERFRAC (beides AMERSHAM BIOSCIENCES), dem Detektor 2138 UVICORD S sowie dem Schreiber 2210 2-CHANNEL RECORDER (beides Firma LKB BROMMA). Es wurde jeweils die Absorption bei 280 nm bzw. an der ÄKTA PRIME zusätzlich die Leitfähigkeit detektiert.

Die Chromatographie an DEAE-SEPHAROSE FAST FLOW (AMERSHAM BIOSCIENCES) bestand aus folgenden Schritten: Equilibrieren der Säule mit Puffer A, Probenauftrag, Waschen mit Puffer A und B jeweils bis die UV280-Absorption die Basislinie erreicht hat und Elution mit 15 Säulenvolumen eines steigenden Salz-Gradienten von Puffer B nach Puffer C jeweils mit der vorher ermittelten Flussrate. Creatinase eluierte bei ca. 0,2 M NaCl.

Puffer A	20 mM Tris, pH 8
Puffer B	20 mM Tris, pH 8, 0,1 M NaCl
Puffer C	20 mM Tris, pH 8, 0,35 M NaCl

6.8.5. Chromatographie mit Phenylsepharose

Die Chromatographie an Phenylsepharose beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen, die in wässriger Lösung und in Anwesenheit hoher Konzentrationen nicht chaotroper Ionen ausgebildet und durch fallende Konzentrationen gelöst werden. Phenyl-Sepharose besteht aus mit Phenylresten derivatisierter vernetzter Agarose. Das Protokoll zum Packen der Säule sowie die verwendeten Anlagen sind identisch zu der im Abschnitt 6.8.4 beschriebenen Methode.

Die Chromatographie an PHENYLSEPHAROSE FAST FLOW (AMERSHAM BIOSCIENCES) bestand aus folgenden Schritten: Equilibrieren der Säule mit Puffer A, Probenauftrag, Waschen mit Puffer A bis die UV280-Absorption die Basislinie erreicht hat und Elution mit 10 Säulenvolumen eines fallenden Salz-Gradienten von Puffer A nach Puffer B jeweils mit der vorher ermittelten Flussrate. Creatinase eluierte bei ca. 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Puffer A	20 mM Tris, pH 8, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Puffer B	20 mM Tris, pH 8, 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

6.8.6. Gelfiltrations-Chromatographie

Mit der Größenausschlusschromatographie an einer HiLOAD™ 26/60 SUPERDEX™ 200 PREP GRADE (AMERSHAM BIOSCIENCES, Säulenvolumen 320 ml) wurden zum Zweck der Kristallisation letzte Verunreinigungen und eventuelle Aggregate entfernt. Bis zu 13 ml Probe wurde auf die mit entgastem Laufpuffer (50 mM Tris, pH 8, 0,2 M NaCl) equilibrierte Säule bei einem Fluss von 1 ml/min aufgetragen. Der Säulendurchlauf wurde bei einer Flussrate von 1,6 ml/min in 4 ml-Fractionen aufgefangen. Die Chromatographie erfolgte an der im Abschnitt 6.8.4 beschriebenen FPLC-Anlage. Das Säulenmaterial der SUPERDEX™ 200

PREP GRADE besteht aus vernetzter Agarose und Dextran mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 34 μm .

6.8.7. Dialyse

Proteinlösungen wurden in 10-kDa-Dialyseschläuchen der Firma ROTH 3 x für mindestens 2 h gegen Puffer mit 100-fachen Volumen bei 4 °C dialysiert.

6.8.8. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen und Proteinfärbung

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in 10 %-igen Polyacrylamid-Gelen, den Bis-Tris NUPAGE-Gelen, mit MOPS-Laufpuffer (beides INVITROGEN). Zur Probenvorbereitung wurde diese im Probenpuffer (2 x Probenpuffer: 500 μl NUPAGE Sample Buffer, 500 μl Wasser, 10 mg DTT) 10 min bei 70 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Proteine wurden mit Coomassie (SIMPLY BLUE SAFE STAIN, INVITROGEN) gefärbt.

6.8.9. Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Das Aufkonzentrieren von Proteinlösungen erfolgte je nach Ausgangsvolumen in rührbaren Ultrafiltrationszellen (MILLIPORE) und Membranen mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa (PALL FILTRON) oder mit Zentrifugenvorrichtungen CENTRIPLUS YM-30 (MILLIPORE, 30 kDa, 15 ml) gemäß den Anleitungen des Herstellers.

6.8.10. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Standardmäßig wurden Proteinkonzentrationen mit der schnellen und sensitiven Methode nach Bradford (BIO-RAD PROTEIN ASSAY) bestimmt, die auf Bindung des blauen Farbstoffes Coomassie an das Protein beruht. Die unpolare Triphenylmethan-Gruppe bindet an unpolare Strukturen und die anionische Sulfonat-Gruppe interagiert mit kationischen Protein-Seitenketten. Als Referenzprotein diente Rinderserumalbumin oder Creatinase (Mutante CTsd7) in bekannter Konzentration.

6.8.11. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorptionsspektroskopie

Für die biophysikalischen Untersuchungen sowie die Kristallisationsexperimente wurden die Proteinkonzentrationen über die Absorption bei 280 nm ermittelt. Die Methode basiert auf der Absorption von UV-Licht durch aromatische Protein-Seitenketten, hauptsächlich der Tryptophan- und Tyrosin-Reste und zu geringen Anteilen der Disulfidbrücken. Voraussetzung ist, dass die Lösung keine anderen UV-absorbierenden Substanzen enthält.

Die Absorption wurde mit Hilfe von Gleichung 1 nach *Pace et al.* (1995) berechnet:

Gleichung 1

$$\epsilon_{280} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}] = 5500 \cdot n_{\text{Tryptophan}} + 1400 \cdot n_{\text{Tirosin}} + 125 \cdot n_{\text{Disulfidbrücken}}$$

ϵ Absorptionskoeffizient

n Anzahl der entsprechenden Aminosäuren oder Disulfidbrücken

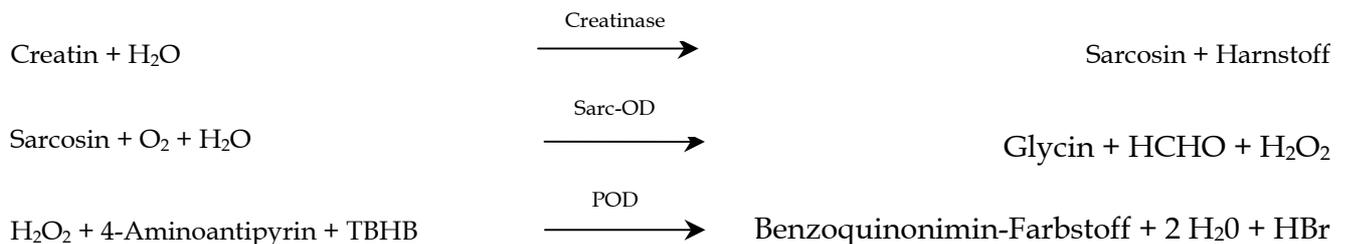
Die berechneten Absorptionskoeffizienten und die entsprechende Absorption sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4 Molare Absorptionskoeffizienten und Absorptionen

Protein	Molarer Absorptionskoeffizient	Absorption bei 280 nm (1 cm Schichtdicke, 1mg/ml Protein)
CTwt	74830 M ⁻¹ cm ⁻¹	1,630
CTsd7	80330 M ⁻¹ cm ⁻¹	1,750

6.8.12. Bestimmung der Enzymaktivität der Creatinase

Die Bestimmung der Creatinase-Aktivität ist der in der Einleitung beschriebenen Creatininbestimmung (siehe 4) angelehnt und beruht auf dem enzymatischen Abbau von Creatin und seines Reaktionsproduktes Sarcosin durch die Creatinase und Sarcosinoxidase (Sarc-OD). Das bei der Oxidation des Sarkosin produzierte H₂O₂ wird in einer kolorimetrischen Reaktion umgesetzt.



Für die Bestimmung wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

0,1 M Creatinlösung (in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,8)	833 μ l
30 mM 4-Aminoantipyrinlösung	17 μ l
143,5 mM TBHB-Lösung, pH 7,8	33 μ l
150 U/ml Sarcosinoxidase	33 μ l
Probe	20 μ l

Die Messung erfolgte an einem CARY 50 BIO UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER mit einem CARY PCB 150 WATER PELTIER SYSTEM zur Temperaturkontrolle. Der Reaktionsansatz wurde bei 25 °C inkubiert und mit Zugabe der Probe gestartet. Es wurde die Absorption bei 546 nm für eine Dauer von 10 min gemessen. Aus dem Anstieg der Absorption ($\Delta A/\text{min}$) in dem linearen Bereich von 5 - 10 min wurde mit Hilfe von Gleichung 2 die Enzymaktivität berechnet.

Gleichung 2

$$\text{Aktivität [U/ml]} = \frac{\text{Testvolumen} \cdot \Delta A/\text{min}}{\varepsilon \cdot \text{Probenvolumen} \cdot \text{Schichtdicke}}$$

$$\varepsilon_{546} = 18,0 \text{ [l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Testvolumen} = 0,943 \text{ ml}$$

$$\text{Probenvolumen} = 0,02 \text{ ml}$$

6.8.13. k_{cat}/K_M -Bestimmung

k_{cat}/K_M entspricht der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion des Enzyms mit dem Substrat unter Bildung der Reaktionsprodukte und kann als Maß für die Wirksamkeit eines Enzyms gewertet werden. Die Katalysekonstante k_{cat} berechnet sich aus der durch die Enzymkonzentration geteilten Maximalgeschwindigkeit (V_{max}/E_0). Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) und der Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) erfolgte mit dem Enzymaktivitätstest (siehe Abschnitt 6.8.12) bei Substratkonzentrationen zwischen 90 mM und 0,39 mM Creatin. Aus den linearen Anstiegen ($\Delta A/\text{min}$ entspricht v) wurden mit Hilfe des Computerprogramms DATA ANALYSIS WIZARD (MICROSOFT EXCEL) nach dem Michaelis-Menten Steady-State-Model die kinetischen Größen K_M und V_{max} durch Anpassen der Gleichung 3 an die v/S -Kurve berechnet.

Gleichung 3

$$v = V_{\max} / (1 + K_m / S)$$

S Substratkonzentration

v Reaktionsgeschwindigkeit ($\Delta A/\text{min}$) V_{\max} Maximalgeschwindigkeit K_m Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit

6.9. Biophysikalische Methoden

6.9.1. Differential Scanning-Kalorimetrie (DSC)

Die thermische Entfaltung der Creatinase-Mutanten wurde mittels *Differential Scanning-Kalorimetrie* verfolgt, welche die Änderung der partiellen Wärmekapazität C_p einer (Protein)-Lösung in Abhängigkeit von der Temperatur und im Vergleich mit einer Referenzlösung bestimmt. Die Messungen wurden an dem NANO DIFFERENTIAL SCANNING CALORYMETER der Firma APPLIED THERMODYNAMICS durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/ml in 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 8. Die Probe wurde nach Erreichen der Starttemperatur 60 sec equilibriert und dann mit einer Rate von 1 K/min von 5 auf 85 °C erhitzt. Wurde die Reversibilität der Entfaltung getestet, wurde nur bis 65 °C bzw. 70 °C (Wildtyp-Creatinase und Mutante CTsd7) aufgeheizt, mit 1 °K/min abgekühlt und wiederholt unter analogen Bedingungen erhitzt.

6.9.2. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde an einem FLUOROMAX-2-Spektrofluorimeter (SPEX INSTRUMENTS) mit 1-cm-Küvetten durchgeführt. Es wurden Emissionsspektren von 300 – 400 nm bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufgenommen (1 Aufnahme, 0,2 sec Integrationszeit, 1 nm Schritte, Signal S/R, 5 nm Spaltbreite, 20 °C). Die Spektren wurden gegen Puffersignale korrigiert.

6.9.3. Cirkular-Dichroismus-(CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie liefert Informationen über die ungleiche Absorption von links- und rechtsdrehend zirkular polarisierten Lichts in optisch aktiven Substanzen. Die CD-Banden von Proteinen treten hauptsächlich in zwei spektralen Regionen, den Fern-UV- und den Nah-UV-Regionen auf. In der Fern-UV-CD-Spektroskopie von 170 – 250 nm (Amid-Region) werden hauptsächlich Peptidbindungen in asymmetrischer Umgebung, das heißt, Sekundärstrukturelemente detektiert (SCHMID, 1995). In diesen Bereichen liefern

hauptsächlich α -helikale Strukturen, bei 222 nm und 208 nm, starke und charakteristische Signale, während β -Faltblattstrukturen nur schwache CD-Signale geben. Auch aromatische Aminosäuren oder Disulfide zeigen Banden in dieser Region. Ihr Beitrag ist von der Anzahl der Aminosäuren und der Art der direkten Umgebung abhängig. Aromatische Aminosäuren können, hauptsächlich in Proteinen mit niedrigem α -Helix-Anteil, einen großen Anteil am CD-Signal ausmachen (VUILLEUMIER ET AL., 1993; FRESKGARD ET AL., 1994; SCHMID, 1995).

In der Nah-UV-CD-Spektroskopie (250 – 300 nm) werden vorwiegend Signale aromatischer Aminosäuren in asymmetrischer Umgebung detektiert. Auch Disulfidbrückenbindungen können in diesem Bereich Signale liefern, allerdings zu einem geringeren Anteil. Es können Vorzeichen, Betrag oder Wellenlänge von aromatischen CD-Banden nicht vorhergesagt werden, da sie von der direkten strukturellen und elektronischen Umgebung des Chromophors abhängen (FRESKGARD ET AL., 1994; SCHMID, 1995). Die nah-UV-CD-Spektren werden wegen ihrer charakteristischen Signale als *fingerprint* für die korrekte Faltung eines Proteins angewendet.

Für CD-Spektren wurde ein JASCO J-715 Spektropolarimeter verwendet. Zur Aufnahme von Fern-UV-CD-Spektren wurde das Signal von 260 – 190 nm aufgezeichnet (0,1-cm-Küvetten, 0,2 nm Schrittweite, 1 nm Bandbreite, 50 nm/min Aufnahmegeschwindigkeit, 10 Akkumulationen, 1 sec Response, 10 °C). Nah-UV-Spektren wurden im Bereich von 320-250 nm aufgenommen (1-cm-Küvetten, 0,2 nm Schrittweite, 1 nm Bandbreite, 50 nm/min Geschwindigkeit, 25 - 100 Akkumulationen, 2 sec Response, 10 °C). Die Spektren wurden gegen Puffersignale korrigiert.

6.9.4. Guanidiniumchlorid-induzierte Entfaltung

Die Proteinentfaltung in Gegenwart des Denaturierungsmittels Guanidiniumchlorid (GdnHCl) wurde in Anlehnung an das Protokoll von RUDOLPH ET AL. (1997) durchgeführt. Natives Protein (20 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7) wurde im gleichen Puffer mit 0 - 5 M GdnHCl entfaltet. Entfaltetes Protein (gleicher Puffer mit 8 M GdnHCl) wurde im gleichen Puffer mit 0 - 5 M GdnHCl zurückgefalten. Die Proben wurden 24 - 48 h bei 20 °C inkubiert und mittels Fluoreszenzspektroskopie, Cirkular-Dichroismus und Creatinase-Aktivität analysiert.

Für die fluorimetrische Detektion wurden Fluoreszenzemissionsspektren (Abschnitt 6.9.2) aufgenommen und das Signal bei 340 nm ausgewertet. Zur Kontrolle von Proteinaggregation wurde am gleichen Gerät die Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 360 nm (20 sec

Akkumulationsdauer, 1-cm-Küvetten) gemessen. Die Elliptizität wurde bei 225 nm über einen Zeitraum von 5 min an einem AVIV 62A DS Spektropolarimeter bei 20 °C in 0,1-cm-Küvetten akkumuliert und gemittelt. Alle Messwerte wurden gegen Puffersignale korrigiert.

Im Anschluss an die Messungen wurden die Guanidiniumchlorid-Konzentrationen der Proben refraktometrisch und mit Hilfe von Gleichung 4 (PACE, 1986) bestimmt.

Gleichung 4

$$\text{GdnHCl}[M] = 57,147 \cdot (\Delta N) + 38,68 \cdot (\Delta N)^2 + 91,60 \cdot (\Delta N)^3$$

ΔN Differenz in Brechungsindex einer Lösung mit GdnHCl im Vergleich zur Referenzlösung ohne GdnHCl

6.9.5. Analytische Ultrazentrifugation

Für Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe wurde eine OPTIMA XL-A analytische Ultrazentrifuge der Firma BECKMANN INSTRUMENTS mit Doppelsektor-Zellen in einem An60Ti-Rotor verwendet. Creatinase-Proben in Konzentrationen von 0,3 mg/ml wurden in Anwesenheit verschiedener Guanidiniumchlorid-Konzentrationen (0, 1,5 und 4 M GdnHCl in 20 mM Natrium-Phosphat, pH 7) bei 40000 U/min und 20 °C analysiert. Die Ultrazentrifugation wurde freundlicherweise von Dr. H. Lilie (Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität in Halle) durchgeführt und ausgewertet.

6.9.6. Massenspektrometrie

Elektrospray-Ionisations-Massenspektren (ESI-MS) wurden an dem Gerät Q-TOF 2 (Quadrupole-Time of Flight) der Firma MICROMASS durchgeführt (Ionenmodus ESI+, Continuum-Mode). Den ESI-MS-Messungen ging eine Reversed Phase HPLC an einer C18-Säule (2,1 x 250 mm, VYDAC) voraus. Die Proteinprobe (1 mg/ml) wurde in einem Gradienten von 0 % - 100 % Acetonitril (Lösung A: 0,025 % TFA, Lösung B: 0,025 % TFA in ACN) im Zeitraum von 3 - 30 min mit 0,3 ml/min Flussrate eluiert.

Die Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von der Abteilung LR-DC ANALYTICS der Firma ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (Penzberg) durchgeführt.

6.10. Modellierung der Proteinstruktur

Die Modellierung der Struktur der Creatinase-Mutante CTsd7 wurde freundlicherweise von Dr. Gerald Boehm (ACGT PROGENOMICS AG, HALLE) mit dem Programm MODELLER 6.0 (SALI & BLUNDELL, 1993) durchgeführt.

6.11. Walk Through Rekombination

Diese *in vitro*-Rekombinationsmethode beruht auf der Reassemblierung von Fragmenten, die in großer Variabilität durch den Einbau von Didesoxynukleotiden bei der DNA-Synthesereaktion erhalten werden können („Fragmentleitern“). Der Einbau von Didesoxynukleotiden führt aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Kettenabbruch und ist als Sequenzierungsmethode nach SANGER (1977) bekannt. Diese terminierenden Didesoxynukleotide werden im Reassemblierungsschritt durch den Zusatz einer thermostabilen 3'-Exonuklease abgebaut. Als *Template* für die Fragmentsynthese wird Uracilhaltige DNA verwendet, die später mit Uracil-DNA-Glycosylase abgebaut und entfernt werden kann, um Interferenzen in der Reassemblierung zu vermeiden. Da die Fragmentlänge viel kürzer als die *Template*-DNA (U-DNA) ist, werden je nach DNA-Länge mehrere Primer benötigt. Im Fall der Alkalischen Phosphatase mit ca. 1,6 kb wurden 6 Primer pro *Template* verwendet.

6.11.1. Gewinnung Uracil-haltiger DNA (U-DNA)

Die U-DNA wurde in PCR-Reaktionen (siehe Abschnitt 6.6.5) mit 0,2 mM dUTPs anstatt der dTTPs sowie 2,5 mM MgCl₂ synthetisiert. Als *Template* diente Plasmid-DNA. Das PCR-Produkt wurde zur vollständigen Abtrennung kontaminierender Uracil-freier Plasmid-DNA gereinigt (Gelextraktion (siehe Abschnitt 6.6.9)) und erneut als *Template* in die PCR mit dUTPs eingesetzt. Das letztere PCR-Produkt wurde nach Gelextraktions-Reinigung als *Template*-DNA für die Synthese von „Fragmentleitern“ verwendet.

6.11.2. Synthese von DNA-Fragmenten („Fragmentleitern“)

Zur Fragmentsynthese wurde anfangs der heute nicht mehr erhältliche DIG TAQ DNA SEQUENCING KIT FOR STANDARD AND CYCLE SEQUENCING der Firma ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE (Mannheim) mit verändertem Protokoll verwendet. Der Reaktionsmaßstab wurde erhöht und die vier Didesoxynukleotide wurden in einem Reaktionsansatz vereinigt. Für jede Kombination aus *Template*-DNA (U-DNA) und Primer wurde ein Reaktionsansatz mit folgenden Bestandteilen pipettiert: 3 µl 10 x Reaktionspuffer (250 mM Tris, pH 9), 1 µl Primer (1 pmol/µl), 175 ng U-DNA, 10 µl Terminations-Mix, 0,6 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) und Wasser ad 30 µl. Der Terminations-Mix enthielt 25 µM dNTP, 850 µM ddATP, 400 µM ddCTP, 75 µM ddGTP, 1275 µM ddTTP und 750 µM Mg₂Cl in 10 mM Tris, pH 5. Die Synthese erfolgte in einer PCR-ähnlichen Reaktion mit folgendem Temperaturprogramm:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	
<i>Annealing</i>	60 °C	30 Sec	30
Extension	72 °C	1 min	

6.11.3. Abbau von U-DNA mittels Uracil-DNA-Glycosylase

Nach der Fragmentsynthese wurde jedem Reaktionsansatz 1 µl hitzelabile Uracil-DNA-Glycosylase (UNG, ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE, Mannheim; 1 U/µl) zugegeben, 4 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym 2 min bei 95 °C inaktiviert. Uracil-DNA-Glycosylasen hydrolysieren Uracil-glycosidische Bindungen in Einzel- und Doppelstrang-DNA, wobei sie Uracil abspalten. Die daraus resultierenden abasischen Stellen können dann durch Alkali-Behandlung oder hohe Temperaturen gespalten werden. Ebenso können Endonukleasen verwendet werden, die spezifisch an abasischen Stellen spalten, wie z.B. T4-Endonuklease. Zur Kontrolle auf quantitativen Abbau der U-DNA wurde stets ein Aliquot der Reaktion mittels PCR analysiert.

6.11.4. Reinigung von DNA-Fragmenten

Da Salze, ddNTPs, Primer und vor allem die vergleichsweise großen Mengen an U-DNA-Abbauprodukten die empfindliche Reassemblierungsreaktion stören können, wurden die Reaktionsansätze mittels Zentrifugation durch Zentrifugenvorrichtungen mit 30 - 100 kDa-Membranen gereinigt. Die Ansätze wurden zunächst vereinigt, gemäß den Herstellerangaben in MICROCONS-30,-50 oder -100 (MILLIPORE) zentrifugiert und das Retentat 2 x mit Wasser aufgefüllt und zentrifugiert.

6.11.5. Reassemblierung

Die Reassemblierung der Fragmente erfolgte in einer PCR-artigen Reaktion in Abwesenheit von Primern. Die Reaktion wird durch erhöhte Zugabe an Nukleotiden, niedrige *Annealing*-Temperatur und große Zyklenzahl unterstützt. Der Reaktionsansatz enthielt 5 µl 10 x Puffer (EXPAND™ HIGH FIDELITY PCR SYSTEM; ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE, Mannheim), 0,5 mM dNTPs, gereinigte Fragmente (Menge entsprechend 6-12 gereinigten Fragmentsyntheseansätzen), 1,5 mM MgCl₂, 1 µl *Taq/Exo III*-Gemisch (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) und Wasser ad 50 µl. Das Temperaturprogramm wurde variiert, für die Reassemblierung der in dieser Arbeit analysierten Klone wurde folgendes Programm verwendet:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	
<i>Annealing</i>	45 °C	1 min	50
Extension	72 °C	30 sec	
Finale Extension	72 °C	10 min	1

Nach 30 Zyklen wurde wiederholt 1 μ l *Taq/Exo III*-Gemisch zugegeben.

7. Ergebnisse zur *Walk Through* Rekombination

7.1. Beschreibung des resultierenden Verfahrens zur Rekombination

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Rekombination homologer DNA-Sequenzen, die *Walk Through* Rekombination, entwickelt. Die Entwicklung erfolgte am Beispiel der Alkalischen Phosphatasen aus humaner Plazenta (*hpap*) und aus dem Kälberdarm (*ciap*). Das resultierende Verfahren (Abbildung 5) besteht aus folgenden Schritten:

- (1) PCR zur Synthese von Uracil-haltiger DNA (U-DNA)
- (2) Kettenabbruchreaktion zur Synthese von DNA-Fragmenten
- (3) Entfernen der U-DNA
- (4) Reinigung der Fragmente
- (5) Reassemblierung mit gleichzeitigem Abbau der terminierenden Didesoxynukleotide

(1) Der erste Schritt der *Walk Through* Rekombination besteht aus der Herstellung Uracil-haltiger DNA (U-DNA) von den Elternengen. In der U-DNA ist jedes Thymin durch ein Uracil ersetzt. Die DNA kann an diesen Positionen durch Uracil-DNA-Glycosylase-(UNG)-Verdau und anschließender Hitze-Behandlung gespalten und somit effizient abgebaut werden. Diese U-DNA wird als *Template*-DNA für die Synthese von Fragmenten verwendet und kann anschließend durch soeben beschriebenen UNG-Verdau entfernt werden. Die Herstellung der U-DNA erfolgt in einer PCR-Reaktion unter Verwendung von dUTPs anstelle von dTTPs.

(2) Nach der Präparation der U-DNA wird diese DNA als *Template* für die Synthese von DNA-Fragmenten verwendet. Die Fragmentsynthese erfolgt über die Kettenabbruchsynthese-Reaktion nach SANGER (1977), welche als Methode zur Sequenzierung von DNA bekannt ist. Sie beruht auf einer Polymerase-vermittelten DNA-Synthese unter Verwendung eines Gemisches aus dNTPs und ddNTPs, wobei der Einbau eines Didesoxynukleotids zum Abbruch der Synthese führt. Da der Abbruch der DNA-Synthese an jeder möglichen Position der Sequenz erfolgt, kann auf diese Weise eine große Vielfalt an Fragmenten („Fragmentleitern“) generiert werden. Um möglichst viel Fragment-DNA zu erhalten, werden die Fragmente unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase (*Taq*-DNA-Polymerase) in aufeinander folgenden Zyklen von *Annealing*, *Extension* und *Denaturierung* (oder „*Cycle Sequencing*“) hergestellt. Die synthetisierten DNA-Fragmente waren im Durchschnitt 100 bis 300 Nukleotide lang und somit viel kürzer

als die DNA der Elterngene (1650 Basenpaare). Deshalb wurden zur Fragmentsynthese Reaktionen mehrerer Primer verwendet. Neben den Primern, die an den Enden der Elterngen-Sequenzen binden können, wurden zwei komplementäre Primerpaare verwendet, die innerhalb der Elterngene binden.

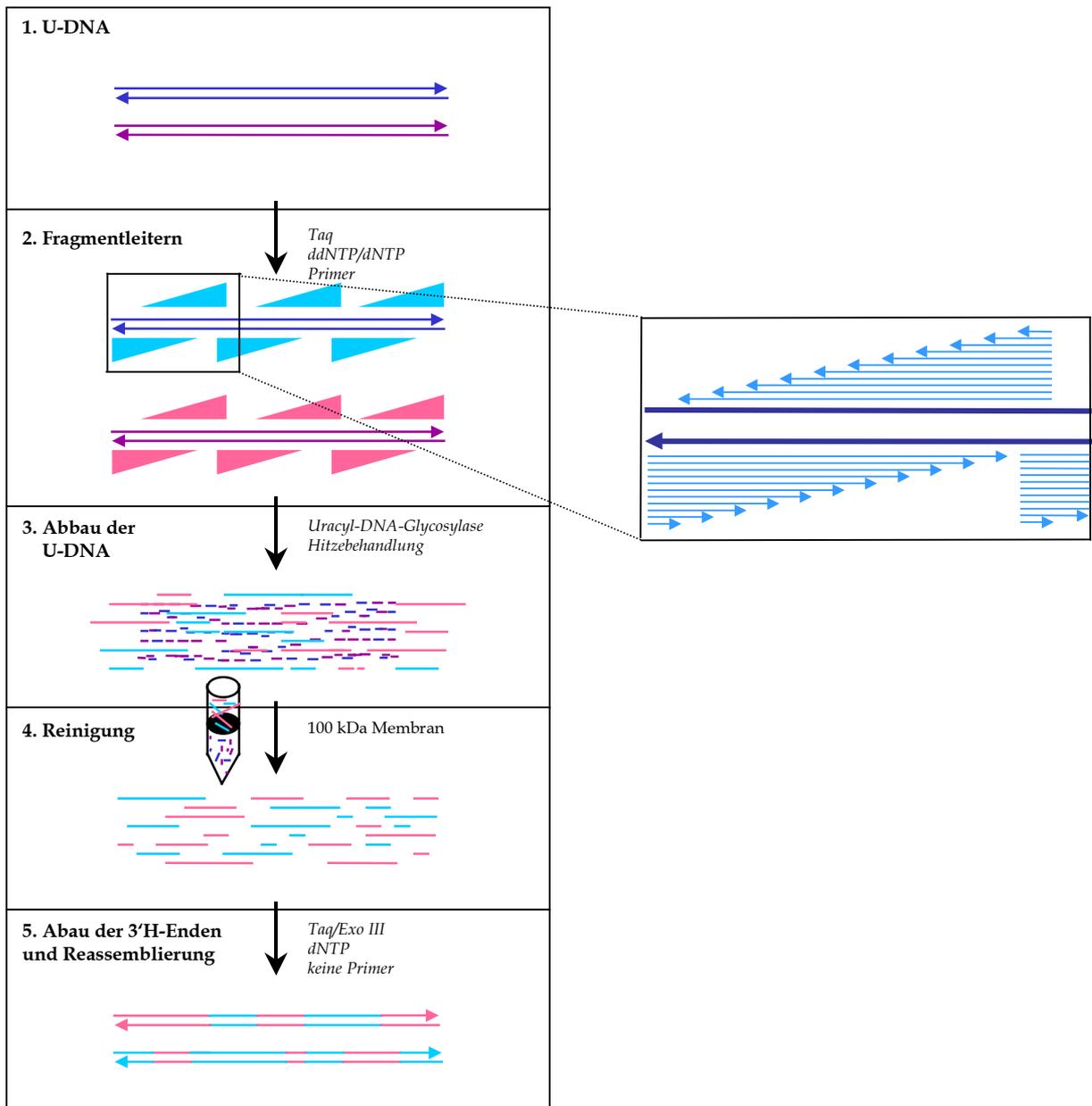


Abbildung 5 Prinzip der *Walk Through* Rekombination

(3) Nach der Fragmentsynthese wird die als *Template* verwendete U-DNA mit Hilfe von UNG (Uracil-DNA-Glycosylase) und Hitzebehandlung abgebaut. Die Entfernung der *Template*-DNA ist nötig, um sicherzustellen, dass nur Fragmente miteinander reassemblieren. Anschließend (4) werden die „Fragmentleitern“ von UNG-Abbauprodukten, Primern, Nukleotiden und Salzen abgetrennt, indem der Ansatz durch Membranen mit Ausschlussgrenzen bis zu 100 kDa filtriert werden.

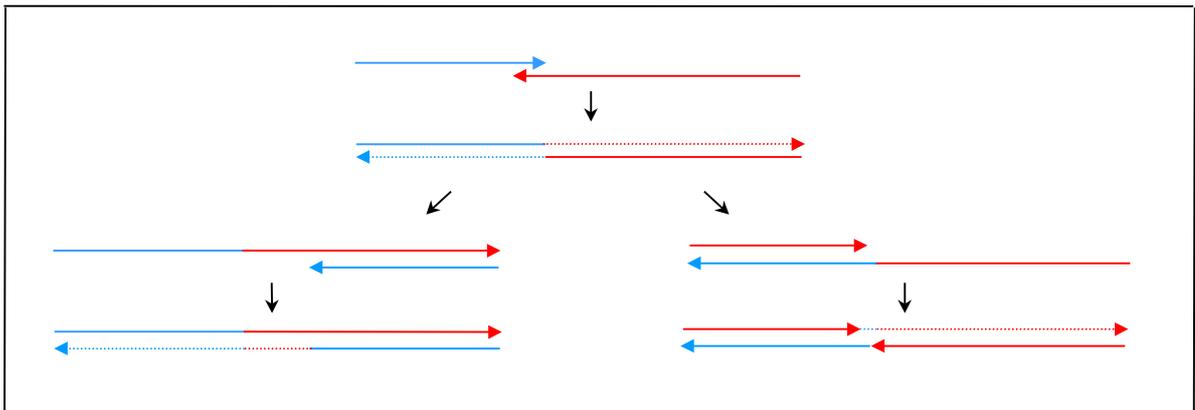


Abbildung 6 Prinzip der Durchmischung von DNA-Fragmenten in der Reassemblierung

(5) Danach werden die Fragmente reassembliert. Die Reassemblierung ist eine PCR-ähnliche Reaktion ohne Primer, in der Fragmente miteinander hybridisieren und die überstehenden Enden aufgefüllt und somit verlängert werden. Die gereinigten Einzelstrang-DNA-Fragmente tragen am 3'-Ende ein Didesoxynukleotid, welches von Polymerasen nicht verlängert werden kann. Der Abbau der Didesoxynukleotide erfolgt exonukleolytisch durch eine thermostabile Exonuklease III, die dem Reassemblierungsansatz zugegeben wird. Die Reassemblierung erfolgt wie eine PCR-Reaktion in mehreren Zyklen. Die Durchmischung der Elternsequenzen wird durch die Hybridisierung und Verlängerung von Fragmenten durchgeführt, die verschiedenen Elternngen entstammen. Dies führt zu chimären DNA-Fragmenten. Im Laufe der Zyklen können solche chimäre Fragmente mit weiteren chimären oder auch nicht chimären Fragmenten hybridisieren und somit zur weiteren Durchmischung der Eltern-Sequenzen beitragen (Abbildung 6). Ort und Anzahl solcher Rekombinationsereignisse wird stark durch die Vielfalt der zu reassemblierenden Fragmente beeinflusst. Da die Vielfalt der eingesetzten Fragmente sehr groß ist, wurden gute Ergebnisse hinsichtlich der Rekombinationsfrequenz (Anzahl) und den Rekombinationsabständen (Abstand zwischen zwei Rekombinationsereignissen) von der *Walk Through* Rekombination erwartet.

7.2. Fragmentsynthese

Für die Fragmentsynthese wurde U-DNA als *Template* benötigt. Die Synthese der U-DNA erfolgte durch PCR mit dUTPs anstatt von dTTPs. Außerdem wurden die Primer APhpaF und APhpaR und Plasmid-DNA mit dem Gen der HPAP als *Template*-DNA verwendet. Das PCR-Produkt wurde elektrophoretisch von der Plasmid-DNA getrennt und aus dem Agarose-Gel extrahiert. Zur Entfernung kontaminierender Plasmid-DNA wurde diese Präparation als *Template* in eine wiederholte PCR mit dUTPs eingesetzt und über Gelextraktion gereinigt. Ein Test-Verdau mit UNG und anschließender Kontroll-PCR mit den Primer APhpaF und APxbaR bestätigte den quantitativen Abbau der U-DNA.

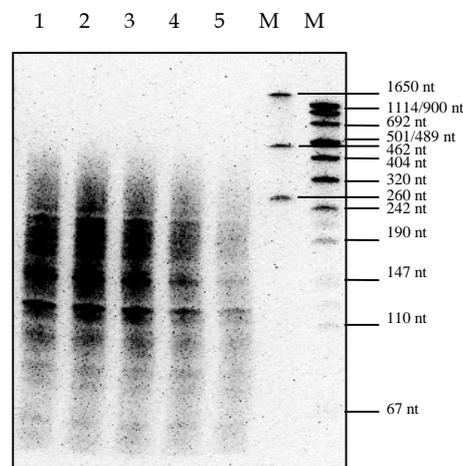


Abbildung 7 **Synthese von Fragmenteiten: Optimierung der *Template*-Konzentration**

Analyse mittels denaturierender PAGE (6 %), DNA-Blotting und DIG-Detektion (20 min Exposition): Pro Reaktionsansatz à 30 µl wurden 50 ng (1), 100 ng (2), 150 ng (3), 200 ng (4) und 250 ng (5) U-DNA (*hpap*) und 1 pmol DIG-markierter Primer DIG-AP für die Fragmentsynthese (30 µl) verwendet. Nach Uracil-DNA-Glycosylase-Verdau wurden je 8 µl der Probe aufgetragen. Spuren (M) zeigen Molekulargewichtsstandards.

Die Bereitstellung der DNA-Fragmente erfolgte durch eine PCR-ähnliche Reaktion mit 1 pmol Primer, 100 – 250 ng *Template*-DNA und *Taq*-Polymerase in einem Volumen von 30 µl, der neben den Desoxynukleotiden jedes der vier Didesoxynukleotide zugegeben wurde. Durch die Verwendung eines DIG-markierten Primers wurde die Detektion der entstandenen DNA-Fragmente ermöglicht. Um überflüssige Verwendung der U-DNA zu vermeiden, wurde die Ausbeute der Fragmentsynthese in Abhängigkeit der eingesetzten *Template*-U-DNA in dem Bereich von 50 – 250 ng U-DNA (*hpap*) pro Reaktionsansatz getestet (Abbildung 7). Die synthetisierten DIG-markierten Einzelstrang-DNA-Fragmente wurden in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (6%) aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und immunologisch über Chemilumineszenz detektiert.

Gute Ausbeuten der Fragmentsynthese wurden mit 50 – 150 ng Template erzielt. Die optimale Konzentration an Template-DNA betrug ca. 100 ng. Die durchschnittliche Fragmentlänge betrug zwischen 100 und 300 Nukleotide. Das hieß, je nach Template-Länge mussten Fragmentsynthese-Ansätze von entsprechend vielen Primern durchgeführt werden. Zum Beispiel: Bei einer Template-DNA-Länge von 1650 bp wurden je Elterngen Fragmente von mindestens sechs Primern benötigt, um den gesamten Template-Bereich abzudecken.

7.3. Entfernen der *Template*-DNA

Der UNG-Verdau wurde hinsichtlich der verwendeten Uracil-DNA-Glycosylase, der eingesetzten Enzym-Menge, Temperatur und Dauer der Inkubation optimiert (Daten nicht gezeigt). Das beste Ergebnis wurde mit einer hitzelabilen UNG und Inkubation von 4 h bei 37 °C erzielt (Abbildung 8). Zur Detektion wurde DIG-markierte U-DNA mit den Primern DIG-AP und APxbaR hergestellt. Danach wurde 250 ng DIG-markierte U-DNA in der Fragmentsynthesereaktion eingesetzt und anschließend mit UNG verdaut. Dazu wurde 1 µl UNG (1U/µl) dem Reaktionsansatz direkt zugegeben, 4 h bei 37 °C inkubiert und 2 min bei 95 °C denaturiert, wobei auch die DNA an den abasischen Stellen thermolytisch fragmentierte. Aliquots der U-DNA vor und nach dem Verdau wurden mittels Auftrennung in einer 6 %-igen PAGE, Transfer auf Nylonmembran und chemilumineszenter Detektion analysiert.

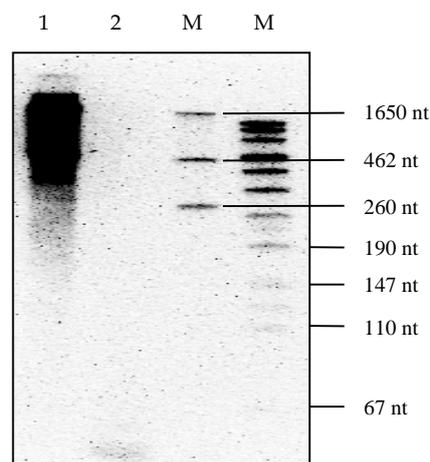


Abbildung 8 Entfernen der *Template*-DNA

Analyse mittels denaturierender PAGE (6 %), DNA-Blotting und DIG-Detektion (20 min Exposition): 250 ng DIG-markierte U-DNA mit einer Größe von 1650 bp (PCR mit den Primern DIG-AP und APxbaR und Plasmid pHPAP) diente als *Template* der Fragmentsynthese (1) und wurde 4 h bei 37 °C mit Uracil-DNA-Glycosylase und 2 min bei 95 °C behandelt (2). Je 10 µl der Proben (entsprechend 85 ng U-DNA) wurden aufgetragen. Spuren (M) zeigen Molekulargewichtsstandards.

Die Template-DNA wurde mittels UNG-Verdau sehr effizient abgebaut. Bei der Analyse der Abbauprodukte konnten nur Restmengen detektiert werden, die zudem kürzer als 67 Basenpaare lang waren.

7.4. Reinigung der DNA-Fragmente

Die DNA-Fragmente mussten vor der Reassemblierungsreaktion von UNG-Abbauprodukten, Primern, Nukleotiden und Salzen abgetrennt werden. Um möglichst viel DNA für die Reassemblierung bereit zu stellen, wurde ein Reinigungsverfahren mit wenig DNA-Verlusten benötigt. Hierzu wurden verschiedene Methoden zur Reinigung der „Fragmentleitern“ getestet. Techniken, die auf Bindung der DNA an Silica-Materialien beruhen, hatten hohe Ausbeuteverluste zur Folge (Daten nicht gezeigt). Bei der Verwendung von *Spin Column*-Chromatographie mit Sephadex 200-Säulenmaterial konnte keine DNA wiedergefunden werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich wurde die Einzelstrang-DNA sehr fest an die Materialien gebunden oder ließ sich aufgrund ausgeprägter Sekundärstrukturen nicht eluieren. Hinzu kommt, dass die eingesetzten DNA-Mengen weit unterhalb der Bindungskapazitäten der verwendeten Säulen lag.

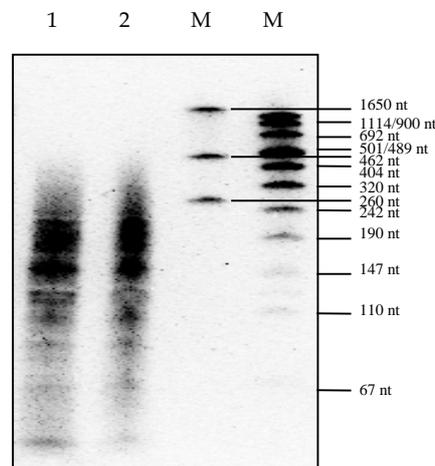


Abbildung 9

Reinigung der DNA-Fragmente

Analyse mittels denaturierender PAGE (6 %), DNA-Blotting und DIG-Detektion (20 min Exposition): In Spur (1) sind 8 μ l einer Uracil-DNA-Glycosylase-behandelten Fragmentsynthesereaktion, in Spur (2) ist ein entsprechendes Volumen des Retenats nach Filtration des Ansatzes durch eine 100 kDa-Membran aufgetragen. Spuren (M) zeigen Molekulargewichtsstandards.

Schließlich wurde zur Reinigung der „Fragmentleitern“ die Filtration durch Cellulose-Membranen mit Ausschlussgrenzen von 30 – 100 kDa erfolgreich angewendet. Nach der Herstellung DIG-markierter DNA-Fragmente und dem Verdau der U-DNA wurde der gesamte Ansatz durch eine Membran mit 100 kDa Ausschlussvolumen filtriert (Microcon-Zentrifugationsvorrichtungen der Firma MILLIPORE). Das Retentat wurde zweimal mit Wasser gewaschen, indem es wieder durch die Membran zentrifugiert wurde. Äquivalente Aliquots vor und nach der Filtration wurden mittels denaturierender PAGE (6 %), DNA-Transfer auf Nylonmembran und DIG-Detektion analysiert (Abbildung 9). Nach der Filtration konnte ein Großteil der DNA-Fragmente wiedergefunden werden. Kurze Fragmente, die kürzer als 67 Nukleotide waren, konnten in diesem Schritt abgereichert werden. Ein Vergleich von Membranen mit Ausschlussgrenzen von 30, 50 und 100 kDa zeigte nur geringe Unterschiede bei der Abreicherung von kurzen DNA-Strängen (Daten nicht gezeigt). Ein der Filtration vorangestellter Denaturierungsschritt zur Auflösung eventuell ausgebildeter Doppelstrangstrukturen zwischen Fragmenten oder UNG-Abbauprodukten (5 min 95 °C und sofort auf Eis abkühlen) führte zu keiner verbesserten Abreicherung der Abbauprodukte (Daten nicht gezeigt).

Die Reinigung der „Fragmentleitern“ erfolgte mittels Filtration durch Cellulose-Membranen. Dieser Reinigungsschritt verlief ohne bemerkenswerte Ausbeuteverluste bei Fragmenten der gewünschten Größe. Fragmente, die kürzer als 67 Nukleotide waren, also auch Primer oder UNG-Abbauprodukte, wurden weitgehend abgereichert.

7.5. Abbau der terminierenden Didesoxynukleotide und Reassemblierung

Die zu reassemblierenden Fragmente lagen gereinigt vor, allerdings trugen diese das terminierende Didesoxynukleotid am 3'-Ende. Um die Fragment-Vielfalt zu erhalten, wurde für den Abbau des Didesoxynukleotids ein Verfahren angestrebt, welches einen kontrollierten Abbau der DNA-Enden ermöglichte. Zunächst wurde am Beispiel der *Pfu*-Polymerase getestet, ob durch Verwendung einer DNA-Polymerase mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität dieser Abbau gleichzeitig mit der Reassemblierung erfolgen konnte. Auf diese Weise konnten jedoch keine Reassemblierungsprodukte erhalten werden. Vermutlich war die *Pfu*-Polymerase nicht in der Lage, das Didesoxynukleotid als falsches Nukleotid zu erkennen, da kein *Mismatch* vorlag. Dieses Problem wurde aber durch die Verwendung eines Enzymgemisches aus *Taq*-Polymerase und thermostabiler Exonuklease III (*Taq/Exo*) umgangen. Die Exonuklease III ist eine Doppelstrang-3'→5'-Exonuklease, die aufgrund dieser Aktivität erst nach dem *Annealing* der DNA-Fragmente, d. h. nachdem die DNA

Doppelstrang-Strukturen gebildet hat, aktiv werden kann.

In Abbildung 10 ist die Reassemblierung von Fragmenten des HPAP-Gens unter Variation der Mg^{2+} -Konzentration von 1,5 – 3,5 mM zu sehen. Dazu wurde U-DNA mit den Primern APhpaF und APxbaR und *Template* pHPAP synthetisiert. Sechs Primer dienten zur Synthese der „Fragmentleitern“, wobei ein Primer eine DIG-Markierung besaß: Die Primer DIG-AP und APxbaR banden jeweils an den Enden der 1650 bp-langen *Template*-DNA. Die zwei komplementären Primerpaare HPAPint1F, HPAPint1R, HPAPint2F und HPAPint2R banden innerhalb der DNA-Sequenz an den Positionen 538 und 1119. Nach der Fragmentsynthese folgte der UNG-Verdau und die Reinigung der vereinigten Reaktionsansätze über eine Filtration durch eine 50 kDa-Membran.

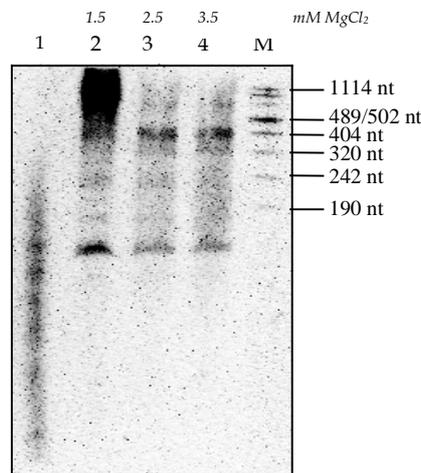


Abbildung 10 Reassemblierung von HPAP bei verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen

Analyse mittels denaturierender PAGE (6 %), DNA-Blotting und DIG-Detektion (20 min Exposition): Zur Reassemblierung von HPAP wurden „Fragmentleitern“ unter Verwendung eines DIG-markierten Primers und 5 unmarkierten Primern synthetisiert, die *Template*-DNA mittels UNG-Verdau abgebaut und der Ansatz über Filtration gereinigt. Die gereinigte DNA aus je 12 Fragmentsyntheseansätzen wurde im Reaktionsvolumen von 50 μ l reassembliert. Je 22 μ l des Reaktionsansatzes vor der Reassemblierung (1) und nach der Reassemblierung mit 1,5 mM (2), 2,5 mM (3) und 3,5 mM $MgCl_2$ (4) wurden auf das Gel aufgetragen. Spuren (M) zeigen Molekulargewichtsstandards.

Um genügend DNA bereitzustellen, wurde für die Reassemblierung jeweils die gesamte DNA aus je zwölf gereinigten Fragmentsynthese-Ansätzen verwendet. Die Reassemblierung erfolgte wie im Methodenteil beschrieben, aber mit folgenden Besonderheiten: Es gab drei Ansätze mit 1,5, 2,5 und 3,5 mM $MgCl_2$ und die *Annealing*-Temperatur wurde schrittweise erhöht. Das *Annealing* erfolgte je 15 Zyklen bei 40 °C, 45 °C und 50 °C, und zusätzlich 10 Zyklen bei 50 °C. Nach 40 Zyklen wurde erneut 1 μ l des *Taq*/Exo-Gemisches den

Reaktionen zugegeben. Aliquots der Reassemblierungsprodukte sowie ein äquivalentes Aliquot nicht reassemblierter Fragmente wurden mittels denaturierender PAGE (6 %), DNA-Transfer auf Nylonmembran und DIG-Detektion analysiert. In Abbildung 11 ist das Ergebnis der Detektion zu sehen. Die markierten Fragmente der drei Ansätze konnten nach der Reassemblierung auffallend verlängert werden. Das bedeutete, dass die Verwendung des Enzymgemisches aus *Taq*-Polymerase und thermostabiler Exonuklease III den Abbau der Didesoxynukleotide und die Verlängerung der DNA-Fragmente in einem Schritt ermöglichte. In dem Ansatz mit 1,5 mM MgCl₂ konnte die deutlichste Bildung von Reassemblierungsprodukten detektiert werden.

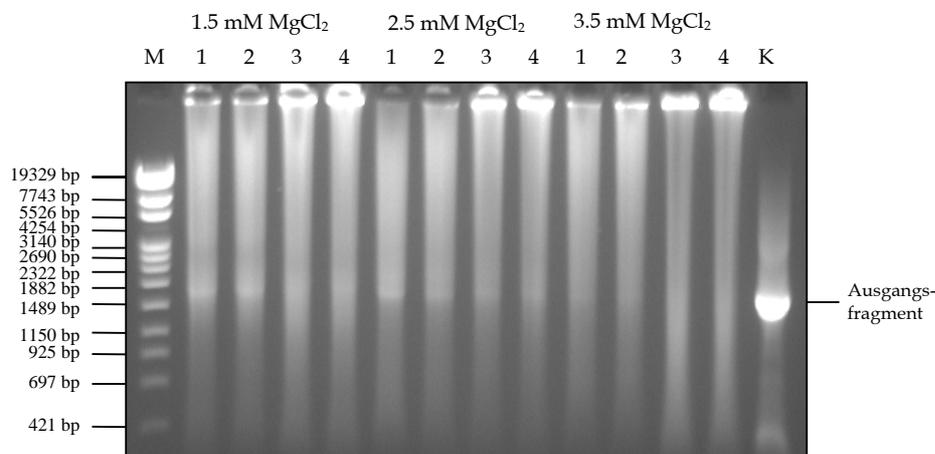


Abbildung 11 **Amplifizierung der reassemblierten Produkte**

Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese (1 %) und Ethidiumbromidfärbung: Jeweils 0,5 µl (1), 1 µl (2), 3 µl (3) und 5 µl (4) der Reassemblierungsprodukte aus Abbildung 10 wurden amplifiziert (50 µl Reaktionsvolumen). In Spur (K) wurde Kontroll-PCR mit Plasmid-*Template* aufgetragen. Je 5 µl wurden auf das Gel geladen. Spur (M) zeigt den Molekulargewichtsstandard.

Jeweils 0,5, 1, 3 und 5 µl der Reassemblierungsprodukte wurden mit den Primern APhpaF und APxbaR in einem Reaktionsvolumen von 50 µl amplifiziert. Die Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese ist in Abbildung 11 dargestellt. In allen Spuren wurde DNA detektiert, die über einen Größenbereich von kürzer als 421 bp bis länger als 19329 bp erschien. Auf Höhe des Ausgangsfragmentes von 1650 Basenpaare war in allen Spuren vermehrt DNA zu sehen, wobei diese Bande deutlicher war, wenn weniger Reassemblierungsprodukt verwendet wurde.

Durch die Verwendung des *Taq/Exo*-Gemisches konnte erfolgreich reassembliert werden. Eine Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration über standardmäßig 1,5 mM führte nicht zu einer erhöhten Produktausbeute.

7.6. Rekombination von *ciap* und *hpap*

Die prinzipielle Durchführbarkeit der *Walk Through* Rekombination konnte bereits gezeigt werden. Als nächstes sollte diese neue Methode mit zwei homologen Genen wiederholt werden, um Rekombinationsereignisse anhand der Sequenz überprüfen zu können. Die Gene für die Alkalischen Phosphatasen aus dem Kälberdarm (*ciap*) und aus humaner Plazenta (*hpap*) sollten miteinander rekombiniert werden. Die Gene haben eine Länge von 1533 bp bzw. 1524 bp und besitzen 81 % Sequenzidentität. Diese Unterschiede dienten als Marker für Rekombinationsereignisse. Mit den Primern APhpaF und APxbaR, die Bindungsstellen im Plasmid außerhalb der Gensequenz besitzen, wurde U-DNA von beiden Genen synthetisiert, welche jeweils eine Länge von ca. 1650 bp besaß. Die Erzeugung der Fragmente für das Gen der HPAP erfolgte wie beschrieben (Abschnitt 7.2) mit sechs Primern. Für das *Template ciap* wurden analog die Primer DIG-AP, APxbaR, CIAPint1F, CIAPint1R, CIAPint2F und CIAPint2R verwendet. Die Bindungsstellen der Primer in der jeweiligen *Template*-DNA sind in Abbildung 12 schematisch dargestellt. Die zwei außerhalb der Gensequenz bindenden Primer waren für beide Gene gleich. Jeweils zwei komplementäre Primerpaare binden innerhalb der Gensequenzen. Nach der Fragmentsynthese erfolgte der Abbau der U-DNA. Danach wurden die Reaktionsansätze vereinigt und mittels Filtration durch eine 100 kDa-Membran gereinigt.

Für die Reassemblierung (Reaktionen a – f) wurden verschiedene *Annealing*-Temperaturen, DNA-Konzentrationen und Extensionszeiten getestet. Für den Reassemblierungsansatz (a) wurde als Positivkontrolle nur DNA eines *Templates*, des HPAP-Gens, verwendet. In allen anderen Ansätzen wurden die Fragmente beider *Templates* in gleichen Verhältnissen gemischt. In den Ansätzen (b), (c) und (d) wurde die *Annealing*-Temperatur mit 45 °C, 50 °C und 55 °C variiert. Ansatz (e) war eine Negativkontrolle, zur Reassemblierung wurde anstelle des *Taq/Exo*-Gemisches die *Pfu*-Polymerase verwendet. Die *Pfu*-Polymerase ist nicht in der Lage, die Didesoxynukleotide am 3'-Ende abzubauen (Abschnitt 7.5). Für Ansatz (f) wurde die halbe Menge Fragment-DNA im Vergleich zu den anderen Reaktionen verwendet. Für Ansatz (g) galt eine verlängerte Extensionszeit von 2 min. Ansonsten wurden standardmäßig 50 Zyklen von 1 min 95 °C Denaturierung, 1 min 45 °C *Annealing* und 30 sec

72 °C Extension angewendet. Außer in Reaktion (f) wurde die gesamte Menge aus je zwölf gereinigten Fragmentsynthese-Ansätzen eingesetzt. Alle Ansätze enthielten 1,5 mM MgCl₂.

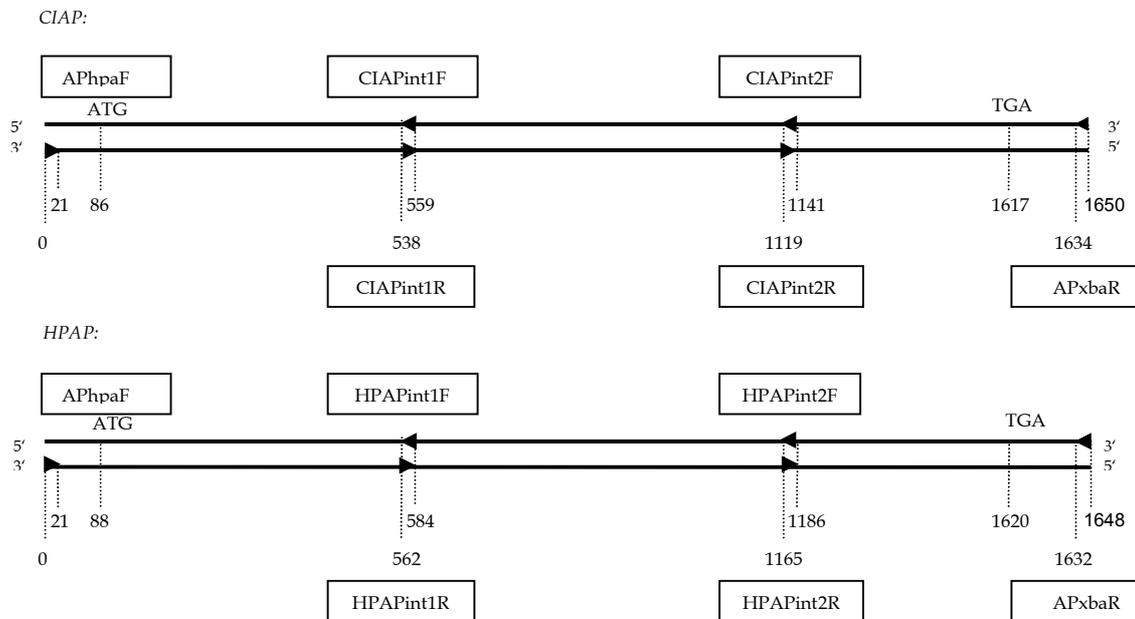


Abbildung 12 Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen in den Alkalischen Phosphatasen
Die Primerbindungsstellen sind maßstabsgerecht als schwarze Pfeile eingezeichnet.

Die Reassemblierungsprodukte wurden nach Auftrennung mittels PAGE (6 %), DNA-Transfer auf Nylonmembran und DIG-Detektion analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 (A) zu sehen. In allen Proben, die mit dem *Taq*/Exo-Gemisch reassembliert wurden, konnte Reassemblierungsprodukt detektiert werden, das über einen weiten Größenbereich von mindesten 400 bis zu größer als 1650 Nukleotide erschien. In Probe (f), die weniger Fragment-DNA enthielt, war eine distinkte Bande der richtigen Größe von 1650 Nukleotide zu sehen. Wie zu erwarten, war in der Kontrollreaktion (e) mit der *Pfu*-Polymerase keine Größenzunahme der Fragmente erkennbar.

Jeweils 0,5 und 3 µl, die nach 30 und 50 Zyklen Reassemblierung entnommen wurden, dienten als *Template* einer Amplifizierungs-PCR (50 µl gesamt). Es wurden die Primer APhpaF und APxbaR verwendet, die an beiden Elternngen die gleiche Bindungsstelle besaßen. Die Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte in Abbildung 13 (B) zeigte, dass nach

30 Zyklen außer in den Proben (a) und (g) mit jeweils 3 µl Reassemblierungsprodukt als *Template* kein PCR-Produkt amplifiziert werden konnte. Das Ausgangsfragment konnte jedoch nach 50 Zyklen unabhängig von den eingesetzten Mikrolitern an Reassemblierungsprodukt als *Template* amplifiziert werden. Das beste Amplifizierungsergebnis konnte bei der Reassemblierung der einzelnen *hpap*-Sequenz erreicht werden. Die vergleichbare Reaktion (b) mit beiden Sequenzen *ciap* und *hpap* erzielte weniger Produktausbeute. Wurden beide Sequenzen rekombiniert, konnte mit Probe (f) das deutlichste Produkt der richtigen Größe von 1650 bp amplifiziert werden, was das Reassemblierungs-Gel von Abbildung 13 (A) bestätigte. Der Reassemblierungsansatz (e) mit *Pfu*-Polymerase konnte, wie zu erwarten, nicht amplifiziert werden. Die dargestellten Reassemblierungsergebnisse können folgendermaßen zusammengefasst werden:

Fragmente nur eines Elterns ließen sich besser reassemblieren als Fragmente zweier Elterns mit 81 % Sequenzidentität. Die Erhöhung der Annealing-Temperatur oder die Verlängerung der Extensionszeit führte zu keiner weiteren Erhöhung der Produktausbeute im Vergleich zum Standard-Ansatz. Durch die Verwendung von weniger Fragment-DNA konnte mehr spezifisches Reassemblierungsprodukt erhalten werden. Dieses Reassemblierungsprodukt wurde für eine anschließende Klonierung mit Sequenzdatenanalyse ausgewählt.

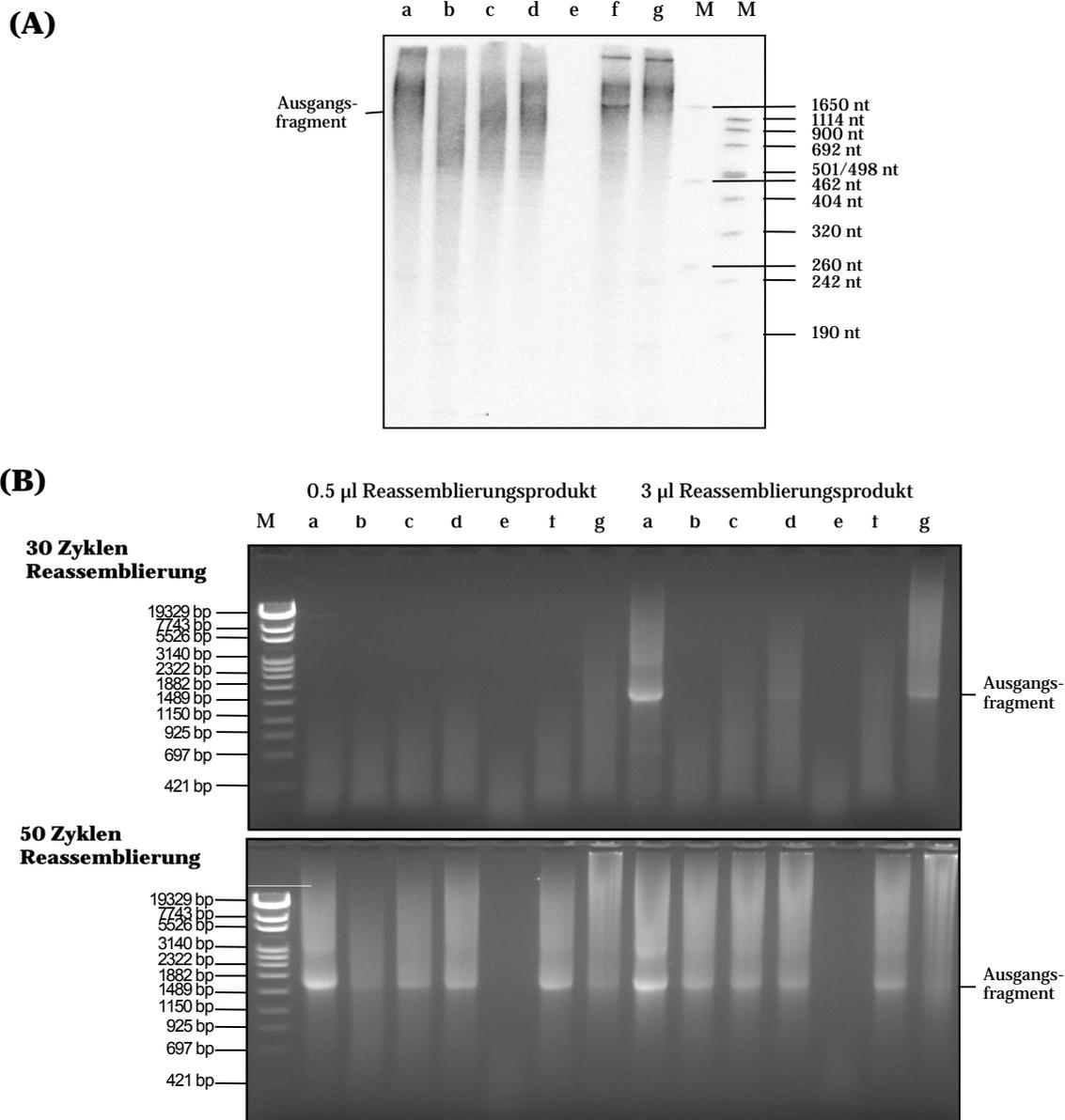


Abbildung 13

Reassemblierung von *ciap* und *hpap* unter Variation von Annealing-Temperatur, Extensionszeit und Fragment-Menge

(A) Analyse mittels denaturierender PAGE (6 %), DNA-Blotting und DIG-Detektion (1 min Exposition): Zur Reassemblierung von *ciap* und *hpap* wurden „Fragmentleitern“ unter Verwendung eines DIG-tragenden Primers und je 5 unmarkierten Primern synthetisiert, die *Template*-DNA mittels UNG-Verdau abgebaut und der Ansatz über Filtration gereinigt. Die gereinigten Fragmente aus je 12 Fragmentsyntheseansätzen wurden unter verschiedenen Bedingungen reassembliert (50 μ l): (a) nur *hpap*, (b) *Annealing*-Temperatur 45 °C, (c) *Annealing*-Temperatur 50 °C, (d) *Annealing*-Temperatur 55 °C, (e) Reassemblierung mit *Pfu*-Polymerase, (f) Verwendung der halben Menge Fragmente, (g) verlängerte Extensions-Zeit von 2 min. Je 6 μ l des Reassemblierungsansatzes wurde auf das Gel aufgetragen. (B) Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese (1 %) und Ethidiumbromidfärbung: Nach 30 und 50 Zyklen Reassemblierung (siehe Abbildung 13 (A)) wurden jeweils 0,5 μ l und 3 μ l entnommen und amplifiziert. Je 5 μ l wurden auf das Gel geladen. Spuren (M) beider Abbildungen zeigen Molekulargewichtsstandards.

7.7. Sequenzdatenanalyse der Reassemblierungsprodukte

Das Reassemblierungsprodukt (f) der zwei homologen Gene *hpap* und *ciap* (siehe Abschnitt 7.5) wurde amplifiziert, gelelektrophoretisch von unspezifischen Nebenprodukten getrennt und aus dem Gel extrahiert. Die Amplifizierungsprimer APhpaF und APxbaR schlossen am 3'-Ende direkt an die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *HpaI* und *XbaI* an. Die Klonierung über diese Restriktionsschnittstellen in entsprechend gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pHPAP blieb ohne Erfolg. Alternativ wurde das gereinigte PCR-Produkt mittels Topoisomerase über Einzel-3'-Desoxyadenosin-Überhänge in den pCR®-XL-TOPO®-Vektor ligiert und in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Bei geringer Transformantenzahl (bis 50 je 100 µl Ansatz) wurden insgesamt 29 Klone mittels Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse mit *HpaI* und *XbaI* auf Insertgröße analysiert. Die Hälfte der Transformanten trug das zu erwartende Insert (ca. 1650 bp), ein Transformant besaß ein ca. 500 bp-Insert, alle anderen keines.

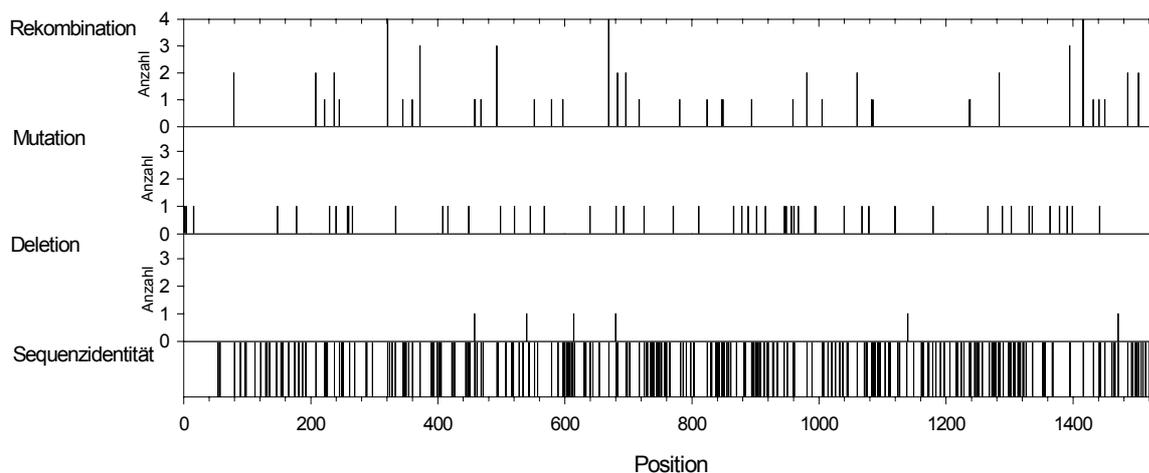


Abbildung 14 Sequenzdatenanalyse der Rekombinationsprodukte

Graphische Darstellung der Sequenzidentität (Sequenzunterschiede sind schwarz gekennzeichnet) mit den Positionen der Rekombinationsereignisse, Punktmutationen, Deletionen sowie der prozentuale Anteil der *ciap*-Sequenz in allen analysierten Reassemblierungsprodukten.

Insgesamt 13 Klone, auch der Klon mit verkürztem Insert, wurden mittels *Primer Walking* vollständig sequenziert. In Abbildung 14 ist ein Überblick über die Rekombinationsorte sowie Mutationen und Deletionen in den Klonen dargestellt. Im Anhang (Abbildung 30) ist ein Sequenz-*Alignment* dieser Klone abgebildet.

In allen Klonen konnte anhand der Sequenzunterschiede zu den Elterngenen auf Rekombinationsereignisse geschlossen werden, die über die gesamte Gensequenz verteilt

waren. Orte erhöhter Rekombinationsanzahl von 3-4 waren von mindestens einer Seite mit Regionen hoher Sequenzidentität flankiert. Es gab keine auffällige Häufung von Rekombinationen in Primernähe. In den chimären Genen wurden außerdem Mutationen und Deletionen entdeckt.

(A)	
CIAP	GCACGGCGTGCAGCGAGACCTTGTGCGCAATCATGGCCTT
HPAP	TCACGGCGTGCAGCCAGACCTTATACGCAGTCATGGCCTT
AP4	GCACGGCGTGCAGCGAGACCTTATACGCAATCATGGCCTT
(B)	
CIAP	CTCCATCCTC
HPAP	GGTCCTCCTA
AP9	GGCCCTCCTA
(C)	
CIAP	AATGCCATCGCC
CIAP	GACGCCATTGAG
AP8	GACGCCATCGAG

Abbildung 15

Rekombinationsabstände

Beispiele für dicht beieinander liegende Rekombinationsabstände: Sequenzunterschiede sind mit Farbkodierung gekennzeichnet: (A) Der Abschnitt, in dem das erste Rekombinationsereignis stattgefunden hat, beträgt 9 bp, für das zweite Rekombinationsereignis 7 bp. Der Abstand zwischen beiden Rekombinationsereignissen beträgt eine nicht zu ermittelnde Zahl zwischen 4 und 18 bp. (B) Die Abschnitte der Rekombinationsereignisse sind 1 und 2 bp, der Abstand zwischen beiden Ereignissen 2-3 bp lang. (C) Die Abschnitte der Rekombinationsereignisse sind 6 und 2 bp, der Abstand zwischen beiden Ereignissen 3-8 bp lang. Bei Beispielen (B) und (C) ist die Sequenzänderung möglicherweise nicht auf Rekombination sondern auf Mutation zurückzuführen.

Der Anteil des HPAP-Eltergens überwog in den reassemblierten Sequenzen. Am 5'-Ende einiger Klone wurden sich wiederholende Sequenzen des Primers APhpaF entdeckt. Da diese Sequenzwiederholungen nicht am 3'-Ende der Reassemblierungsprodukte gefunden wurden, konnte man davon ausgehen, dass es sich um ein Sequenz-spezifisches Problem handelt und nicht typisch für diese Rekombinationsmethode war. Allerdings könnte diese Beobachtung eine Erklärung für aufgetretenen Schwierigkeiten der Klonierung liefern.

Lagen zwei mögliche Rekombinationsereignisse sehr dicht beieinander, war nicht auszuschließen, dass es sich nicht um Rekombination, sondern um Punktmutation handelte. Das soll an drei Beispielen veranschaulicht werden, die bei der Auswertung der Sequenzdaten entdeckt wurden. In Abbildung 15 wurden Ausschnitte aus Sequenz-*Alignments* der Rekombinationsklone mit den Elternsequenzen abgebildet. In Beispiel (A) konnte anhand der Sequenz tatsächlich von zwei Rekombinationsereignissen ausgegangen werden, die innerhalb eines Abstandes von 4 bp – 18 bp stattgefunden haben: Die Klonsequenz begann mit der *ciap*-Sequenz, wie anhand von zwei Positionen mit Sequenzunterschieden nachgewiesen werden konnte. Danach wechselte die Klonsequenz zur *hpap*-Sequenz (wieder an zwei Positionen mit Sequenzunterschieden zu erkennen). Der genaue Ort dieses Rekombinationsereignisses konnte nicht ermittelt werden, da sich zwischen beiden „Markern“ ein acht Basenpaar langer Bereich identischer Sequenz befand. Nach weiteren sechs Basen identischer Sequenz konnte wieder ein Rekombinationsereignis ermittelt werden. Wie an zwei Positionen mit Sequenzunterschied zu sehen, war die Sequenz des Klons zur *ciap*-Sequenz gewechselt.

Der kürzeste Abstand zwischen zwei Rekombinationsereignissen beträgt nachweislich nur 18 bp, eventuell sogar nur vier bp.

Die Rekombinationsabstände in den Beispielen (B) und (C) sind möglicherweise noch geringer: In diesen Beispielen betragen die Abstände zwischen zwei Rekombinationsereignissen 2 bp – 3 bp bzw. 3 bp – 8 bp. Allerdings konnten diese Sequenzänderungen auch durch einzelne Punktmutationen eingeführt worden sein. Das konnte anhand der Sequenz nicht nachgewiesen werden, da als Marker für die Rekombinationsereignisse jeweils nur eine einzelne Position des Sequenzunterschieds verwendet werden konnte. Für die Betrachtung solcher Fälle musste man folglich davon ausgehen, dass entweder zwei Rekombinationen oder eine Punktmutation stattgefunden hatten.

In Tabelle 5 wurden die Ergebnisse der Sequenzdatenanalyse zusammengefasst. Sieben Klone trugen Deletionen. Das heißt, sieben der 13 Klone können nicht für funktionsfähiges Protein codieren. Zum jetzigen Zeitpunkt ist ungeklärt, ob die Deletionen auf die verwendete Rekombinationsmethode zurückzuführen sind. Für die Zählung der Rekombinationsereignisse und Punktmutationen im oben dargestellten Zweifelsfall wurde in den Spalten (A) unter Annahme von Punktmutationen und in den Spalten (B) unter Annahme von Rekombinationsereignissen vorgegangen.

Tabelle 5

Sequenzdatenanalyse der Rekombinationsprodukte

An einigen Positionen ist unklar, ob dicht beieinander liegende Rekombinationsereignisse oder Mutationen vorliegen. Hier wurde einmal unter Annahme von Mutationen (A) und das andere Mal unter Annahme von Rekombinationen (B) gezählt.

Klon	Rekombinationen		Punktmutationen		Deletionen
	(A)	(B)	(A)	(B)	
AP1	3	5	2	1	1 bp
AP2	4	4	4	4	
AP3	6	6	5	5	
AP4	7	11	8	6	1 bp
AP5	3	3	5	5	28 bp
AP6	2	2	4	4	
AP7	2	2	1	1	verkürzt (540 bp)
AP8	4	6	4	3	
AP9	5	7	5	4	
AP10	8	12	6	4	
AP11	1	1	4	4	2 bp
AP12	2	2	7	7	1 bp
AP13	5	7	6	5	1 bp
Durchschnitt	2,7/kb	3,5/kb	3,2/kb	2,8/kb	

In allen 13 analysierten Klonen konnten Rekombinationsereignisse ermittelt werden. Die durchschnittliche Anzahl betrug je nach Einzelfallbetrachtung zwischen 2,7 und 3,5 pro Kilobasenpaar, die beste beobachtete Anzahl betrug 8 bis 12 pro Gen (bzw. 4,8 bis 7,3 pro Kilobasenpaar). Die Rate an Spontanmutationen betrug, wieder je nach Einzelfallbetrachtung, durchschnittlich 3,2 bis 2,8 pro kbp.

8. Ergebnisse zur Creatinase

8.1. Mutagenese der Creatinase

Aus genannten Gründen (siehe Abschnitt 5.15) sollte die thermische Stabilität der Creatinase aus *Erwinia spec.* auf einen apparenten Schmelzpunkt $T_{M(app)}$ von mindesten 63 °C. erhöht werden. Zur Optimierung wurden Zufallsmutagenesen mittels fehlerhafter PCR, Sättigungsmutagenesen und ortsgerechtere Mutagenesen verwendet.

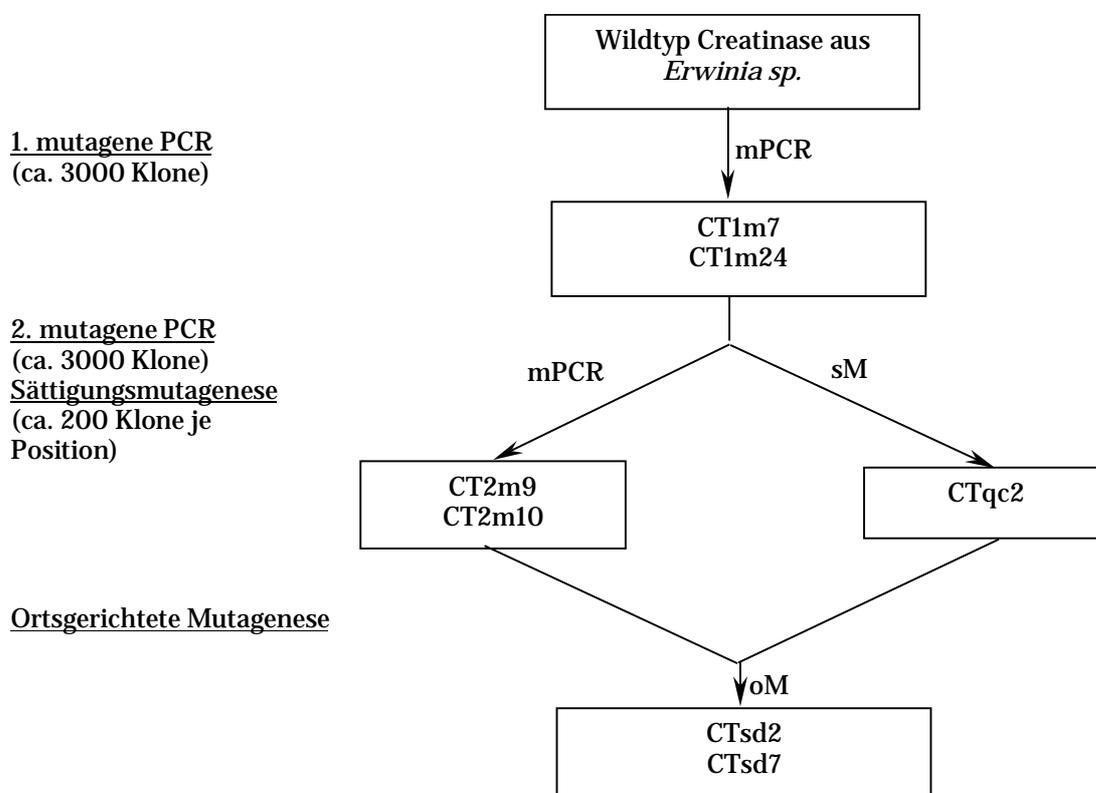


Abbildung 16 Überblick zur Herstellung der Creatinase-Mutanten

Nach Zufallsmutagenese der Wildtyp-Creatinase mittels fehlerhafter PCR wurden aus ca. 3000 Klonen zwei Mutanten CT1m7 und CT1m24 identifiziert. CT1m24 diente als Ausgangsklon für die Herstellung einer zweiten 3000 Klone umfassenden Mutantenbibliothek, aus welcher zwei Mutanten CT2m9, und CT2m10) isoliert wurden. Die in diesen vier Klonen identifizierten Aminosäureaustausche wurden mittels Sättigungsmutagenese permutiert, wobei ein weiterer Aminosäureaustausch in Mutante CTqc2 erhalten wurde. Mittels ortsgerechtere Mutagenese wurden schließlich die erhaltenen Sequenzinformationen miteinander kombiniert (CTsd2 und CTsd7).

Eine Übersicht zur Herstellung der Mutanten ist in Abbildung 16 zu sehen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst sowie in Abbildung 17 graphisch dargestellt. Standardabweichungen und Standardfehler der zu Grunde liegenden Proteinbestimmungen, K_M - und V_{max} -Berechnungen sowie die Zwischenergebnisse sind im Anhang (Tabelle 10) ersichtlich. Die Generierung der Mutanten wird in den folgenden Abschnitten 8.1.1 – 8.1.5 ausführlich beschrieben.

Tabelle 6 Vergleich der Creatinase-Mutanten hinsichtlich enzymatischer Effizienz und Stabilität
Standard-Abweichungen und -Fehler der zu Grunde liegenden Proteinbestimmungen, K_M - und V_{max} -Berechnungen sowie Zwischenergebnisse sind im Anhang (10) ersichtlich: (K_M) Michaelis-Menten-Konstante., (k_{cat}) Katalysekonstante, ($T_{M(app)}$) apparenter Schmelzpunkt.

Position/ Aminosäure	59	130	203	395	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [mMol ⁻¹ x s ⁻¹]	SA [U/mg]	$T_{M(app)}$ [°C]
CTwt	F	N	M	F	4,2	$3,13 \times 10^4$	7,8	58
CT1m7	Y	N	M	F	2,9	$2,22 \times 10^4$	3,9	59
CT1m24	F	D	M	F	7,4	$2,43 \times 10^4$	9,9	59
CT2m9	F	D	V	F	6,2	$1,43 \times 10^4$	5,1	63
CT2m10	F	D	M	L	3,1	$2,80 \times 10^4$	5,2	59
CTqc2	W	D	M	F	6,9	$2,26 \times 10^4$	8,6	63
CTsd2	F	D	V	L	2,2	$2,74 \times 10^4$	3,6	62
CTsd7	W	D	V	L	2,0	$3,30 \times 10^4$	4,0	66

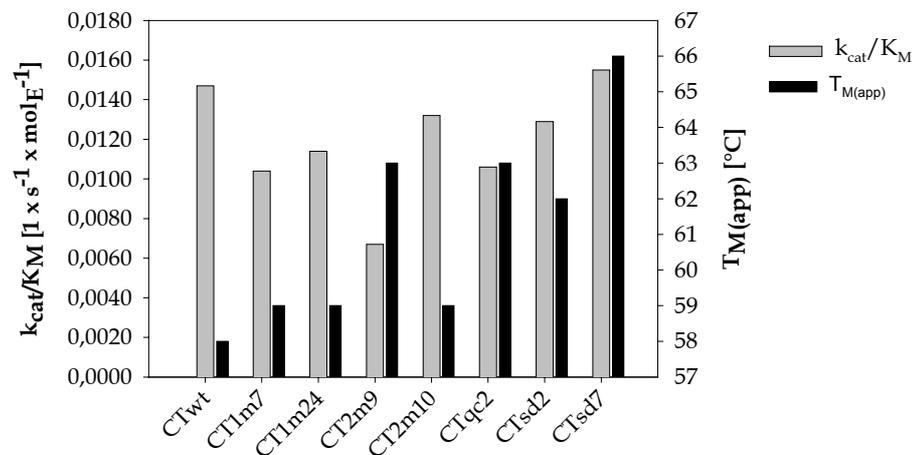


Abbildung 17 Vergleich der Creatinase-Mutanten hinsichtlich Effizienz (k_{cat}/K_M) und Stabilität ($T_{M(app)}$)

8.1.1. Erste Mutantengeneration

Das 1,2 kb lange Gen der Wildtyp-Creatinase wurde unter Verwendung der Primer ECF 21 und HIR 21 mittels fehlerhafter PCR mutagenisiert. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCA3 kloniert (Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII*) und in *E. coli* HB101 transformiert. Ungefähr 60 % der erhaltenen Klone zeigten Creatinase-Aktivität. Eine 3000 Klone umfassende Mutantenbibliothek wurde in Mikrotiterplatten auf erhöhte thermische Stabilität der Creatinase getestet. Dies erfolgte durch Messung der Enzymaktivität eines Aliquots nach einer Hitzebehandlung von 40 min bei 50 °C im Vergleich zu einem unbehandelten Aliquot. Eine mögliche Renaturierung nach Abkühlung der hitzebehandelten Creatinase-Proben konnte ausgeschlossen werden.

Aus insgesamt neun Klonen wurde das Protein isoliert, der K_M -Wert bestimmt und ein Stabilitätstest durchgeführt. Die Proteine wurden dazu mit einer Volumenaktivität von 32 U/ml für 24 h bei 42 °C in 30 mM TAPS, pH 8.1 mit Detergens (Puffer R1 des CREA PLUS-Tests der Firma ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) inkubiert. Die Enzymaktivitäten der inkubierten Creatinasen wurden im Vergleich zu einer bei 4 °C inkubierten Probe bestimmt. Zwei Klone CT1m7 und CT1m24 zeigten nach der Inkubation bei 42 °C erhöhte Restaktivitäten (ca. 80 %) im Vergleich zum Wildtyp (50 %). Die apparenten Schmelzpunkte (DSC-Analyse) der Mutanten CT1m7 und CT1m24 waren ein Grad höher als für den Wildtyp ($T_{M(\text{app})} = 58$ °C). Beide Mutanten trugen je einen Aminosäureaustausch: CT1m7 trug die Mutation Phe59Tyr und CT1m24 die Mutation Asn130Asp. Diese Mutationen führten neben der Erhöhung der thermischen Stabilität auch zur Veränderung der enzymatischen Eigenschaften: Die Effizienz der Enzyme, ausgedrückt als k_{cat}/K_M -Wert, verringerte sich von $3,13 \times 10^4$ auf $2,22 \times 10^4$ bzw. $2,43 \times 10^4$ [$\text{mMol}^{-1} \times \text{s}^{-1}$]. Dies war außerdem mit Veränderungen der K_M -Werte von 4,2 auf 2,9 bzw. 7,4 [mM] verbunden.

Eine mittels ortsgerichteter Mutagenese durchgeführte Kombination von Mutationen Phe59Tyr und Asn130Asp zu einer Doppelmutante führte zu einer thermolabilen Creatinase-Variante³.

8.1.2. Zweite Mutantengeneration

Aus der ersten Mutantengeneration konnten zwei Creatinase-Varianten CT1m7 und CT1m24 mit erhöhter thermischer Stabilität identifiziert werden. Im Gegensatz zur Mutante CT1m24 neigten Wildtyp und Mutante CT1m7 zur Aggregationsbildung. Deshalb wurde Mutante CT1m24 als Target für weitere Optimierungen gewählt. Gemäß dem ersten Gesetz der gerichteten Evolution „*You get what you screen for*“ (YOU & ARNOLD, 1996) wurde die erhöhte

3 Relativmessung in anderem System, deswegen nicht in Tabelle 6 aufgeführt

thermische Stabilität in CT1m24 auf Kosten der im *Screening*-System nicht beachteten enzymatischen Effizienz erhöht. Um die enzymatische Effizienz, ausgedrückt als k_{cat}/K_M -Wert, wieder zu erhöhen, wurde in den darauf folgenden Mutagenese-Experimenten sowohl auf thermische Stabilität als auch auf Enzymaktivität bei Substratlimitation „gescreent“. Direktes *Screening* auf k_{cat}/K_M -Werte mit *E. coli*-Zellextrakten war nicht möglich, da zur Bestimmung dieses Parameters gereinigtes Protein notwendig wäre. Das K_M -Wert-*Screening* erfolgte über die Bestimmung der relativen Restaktivität bei Substratlimitation (siehe Abschnitt 6.7.1.).

Die zweite Mutantengeneration wurde wie die erste Mutantengeneration mittels fehlerhafter PCR generiert. Die DNA wurde in *E. coli* XL1 Blue transformiert. Ungefähr 60 % der Klone zeigten enzymatische Aktivität. Ungefähr 3000 Klone wurden auf Enzymaktivität bei Substratlimitation und thermische Stabilität „gescreent“. Insgesamt 18 Klone, die im *Screening* gute relative Restaktivitäten zeigten, wurden als Schüttelkultur angezogen, um die Ergebnisse im Rohextrakt zu verifizieren. Zu diesem Zweck erfolgte eine Bestimmung der relativen Restaktivität im Rohextrakt nach 16 min Inkubation bei 54 °C sowie eine K_M -Wert-Bestimmung. Nach Sequenzdatenanalysen der Klone konnten schließlich zwei optimierte Mutanten identifiziert werden, die jeweils einen weiteren Aminosäureaustausch besaßen. Die „Temperatur-Mutante“ CT2m9 trug die Mutation Met203Val und besaß eine um 4 °C erhöhte thermische Stabilität ($T_{M(\text{app})} = 63$ °C) im Vergleich zum Elternklon CT1m24. Die „ K_M -Mutante“ CT2m10 (Phe395Leu) wies im Vergleich zum Elternklon CT1m24 einen verminderten K_M -Wert (von 7,4 auf 3,2 mM) und einen erhöhten k_{cat}/K_M -Wert (von $2,43 \times 10^4$ auf $2,80 \times 10^4$ mMol⁻¹ × s⁻¹) auf.

8.1.3. Ortsgerichtete Mutagenese: CTsd2

Im *Screening* der zweiten Mutantengeneration konnten eine „Temperatur-Mutante“ (CT2m9) und eine „ K_M -Mutante“ (CT2m10) mit optimierten Eigenschaften identifiziert werden. Beide Creatinase-Varianten trugen je einen Aminosäure-Austausch. Diese Aminosäuren wurden mittels ortsgerechter Mutagenese in die Creatinase CT1m24 eingeführt, um eine Kombination der optimierten Eigenschaften zu erhalten. Die resultierende Mutante CTsd2 vereinte gute thermische Stabilität ($T_{M(\text{app})} = 62$ °C) mit guten enzymatischen Eigenschaften ($K_M = 2,2$ mM, $k_{\text{cat}}/K_M = 2,74 \times 10^4$ [mMol⁻¹ × s⁻¹]).

8.1.4. Sättigungsmutagenese

Aus dem *Screening* von zwei Mutantengenerationen konnten vier Aminosäurepositionen bestimmt werden (siehe Abschnitt 8.11 f), die wichtig für Stabilität und enzymatische

Aktivität der Creatinase waren. Im nächsten Schritt sollte mittels Sättigungsmutagenese (Permutation von Aminosäuren) getestet werden, ob der Einbau anderer Aminosäuren in diesen Positionen zur weiteren Erhöhung der gewünschten Eigenschaften führen konnte. Insgesamt wurden im Wildtyp die Positionen 59 und 130 und in Mutante CT1m24 die Positionen 59, 203, und 395 permutiert. Aus jedem Mutationsansatz wurden ca. 200 Klone auf thermische Stabilität und Enzymaktivität bei Substratlimitation „gescreent“. Die Ergebnisse wurden mit Rohextrakten von Schüttelkulturen wie in Abschnitt 8.1.2 beschrieben verifiziert.

Es konnte ein Aminosäureaustausch identifiziert werden, der zur thermischen Stabilisierung führte: Mutante CTqc2, entstanden durch die Einführung eines Tryptophans an Position 59 des Elternklons CT1m24, besitzt einen um 4 °C höheren apparenten Schmelzpunkt ($T_{M(\text{app})} = 63 \text{ °C}$) als ihr Elternklon.

8.1.5. Ortgerichtete Mutagenese: CTsd7

Der mittels Sättigungsmutagenese identifizierte Austausch Phe59Trp, der zu einer deutlichen thermischen Stabilisierung von CT1m24 führte, wurde mittels ortsgerechter Mutagenese in Mutante CTsd2 eingeführt. Die resultierende Mutante CTsd7 verfügte über einen weiter erhöhten apparenten Schmelzpunkt $T_{M(\text{app})}$ von nun 66 °C sowie über effizientere enzymatische Eigenschaften ($K_M = 2,0 \text{ mM}$; $k_{\text{cat}}/K_M = 3,30 \times 10^4 \text{ mMol}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) im Vergleich zum Elternklon. Die Aminosäureaustausche Phe59Trp, Asn130Asp, und Met293Val bewirken eine nahezu additive Erhöhung des apparenten Schmelzpunktes $T_{M(\text{app})}$.

Mit einer Kombination von zufälliger und ortsgerechter Mutagenese konnte die thermische Stabilität der finalen Creatinase-Mutante CTsd7 im Vergleich zum Wildtyp aus *Erwinia spec.* um 8 °C auf den apparenten Schmelzpunkt $T_{M(\text{app})} = 66 \text{ °C}$ erhöht werden. Da einige Mutationen zur Thermostabilisierung negativ die enzymatischen Eigenschaften beeinflussten, wurden parallel der K_M -Wert bzw. der k_{cat}/K_M -Wert beobachtet und optimiert. Mutante CTsd7 zeigte die gleiche Effizienz wie der Wildtyp bei der Umsetzung des Substrats Creatin ($k_{\text{cat}}/K_M = 3,30 \times 10^4 \text{ mMol}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) bzw. eine Abnahme des K_M -Wertes von 4,2 mM auf 2,0 mM Creatin.

8.2. Isolierung rekombinanter Creatinase aus *E. coli*

8.2.1. Proteinreinigung

Die Wildtyp-Creatinase und ihre Mutanten wurden in *E.coli* HB101 als cytoplasmatische Proteine exprimiert. Zur Expression des Proteins wurde der *mgl*-Promotor verwendet, der

einer Katabolit-Repression durch Glucose oder anderen Kataboliten unterliegt. Der *mgl*-Promotor wurde durch Animpfen der Vorkultur in LB-Amp-Medium ohne Zuckerzusatz induziert. Nach dem Zellwachstum bei 37 °C wurden die Bakterien pelletiert und mittels Hochdruckdispersion aufgeschlossen. Im Zellrohextrakt enthaltene chromosomale DNA wurde durch Zusatz von 0,1 – 0,5 % (w/v) des Anionenaustauschers Polymyxin G20 gebunden und zusammen mit den Zelltrümmern sedimentiert. Die Konzentration an Polymyxin G20 wurde mit Vorproben optimiert. Mit dem klaren Überstand nach der Polymyxinabtrennung erfolgte eine Chromatographie an DEAE-Sephrose. Die Creatinasen konnten aufgrund ihres niedrigen pI-Wertes von 5,0 – 5,3 (Berechnung mit dem Programm AAMWT) an den schwachen Anionenaustauscher gebunden und mit steigenden NaCl-Gradienten bei ca. 0,2 M NaCl von der Säule eluiert werden. Im Anschluss daran wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie durchgeführt. Das Protein wurde in 1 M (NH₄)₂SO₄ auf eine Phenylsepharose aufgezogen und in einem linearen Gradienten bei ca. 0,8 M (NH₄)₂SO₄ eluiert. Zur Abtrennung von Aggregaten wurde das Protein zusätzlich über präparative Gelfiltrations-Chromatographie an einer Superdex 200 gereinigt. Die Creatinasen eluierten als Einzelpeak.

Abbildung 18 zeigt ein Coomassie-gefärbtes Polyacrylamid-Gel mit Proben der Reinigungsschritte am Beispiel der Wildtyp-Creatinase. Die Ausbeuten der Reinigungsschritte sind in Tabelle 7 aufgelistet. Aus 1 l Schüttelkultur konnten 64 mg Wildtyp-Creatinase isoliert werden.

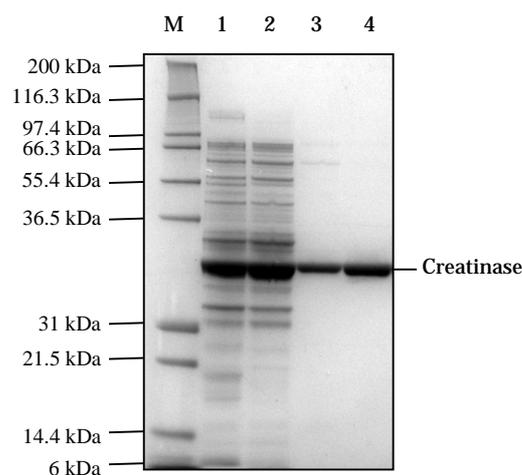


Abbildung 18

Proteinisolierung

Coomassie-gefärbtes Polyacrylamid-Gel mit Proben der Reinigung von Wildtyp-Creatinase, exprimiert in *E. coli* HB 101. Spuren: (M) Molekulargewichtsstandard, (1) Rohextrakt, (2) Überstand der Polymyxinabtrennung, (3) Elution von DEAE-Sephrose und (4) Elution von Phenylsepharose.

Tabelle 7 **Proteinisolierung**
 Ausbeuten der Reinigungsschritte am Beispiel rekombinanter Wildtyp-Creatinase aus 1 l Schüttelkultur
 (exprimiert in *E. coli* HB101)

Reinigungsschritt	Creatinase- Aktivität	Creatinase- Aktivität	Protein	Spezifische Aktivität
Zellaufschluss	1,57 kU	100 %	n.b.	n.b.
Polymminabtrennung	1,45 kU	92 %	692 mg	2,1 U/mg
DEAE-Sepharose	1,10 kU	65 %	174 mg	6,3 U/mg
Phenyl-Sepharose	0,77 kU	49 %	94 mg	8,2 U/mg
Superdex 200	0,57 kU	36 %	64 mg	9,0 U/mg

8.2.2. Identität und Homogenität von Wildtyp-Creatinase und Mutante CTsd7

Die Identität und Homogenität von Wildtyp-Creatinase und Mutante CTsd7 wurde mittels ESI-Massenspektrometrie analysiert. Die Auswertung der MS-Spektren (Abbildung 19) ergab die Existenz zweier Spezies für den Wildtyp. 90 % des Wildtyp-Proteins besaßen die Molekülmasse von 45928 Da, welche um 0,02 % von der berechneten Masse von 45917 Da abweicht. Die Fehlerrate lag gemäß der Spezifikation des verwendeten Gerätes im Rahmen der Meßgenauigkeit für Proteine dieser Größe. Eine zweite Spezies mit 10 %-igem Anteil zeigte eine um 132 Da geringere Molekülmasse. Diese Differenz entspricht ungefähr einem Methioninrest (131 Da). Die N-terminale Sequenzierung bestätigte die korrekte Sequenz des Proteins.

Die ESI-MS-Analyse der Mutante CTsd7 ergab einen Hauptpeak (ca. 85 %) bei 45916 Da und einen um 25 Da kleineren Nebenpeak (ca. 15 %) bei 45891 Da. Diese Differenz entspricht ungefähr der Molekülmasse eines Natrium-Moleküls (23 Da) und weist darauf hin, dass der Hauptpeak einem Natrium-Addukt des Proteins entspricht. Natrium-Addukte können entstehen, wenn Natrium-haltige Puffer für die Isolierung von Proteinen verwendet wurden. Der Natrium-freie Nebenpeak weicht um nur 0,04 % von der berechneten Molekülmasse von 45911 Da ab und entspricht im Rahmen der experimentellen Meßgenauigkeit dem erwarteten Wert.

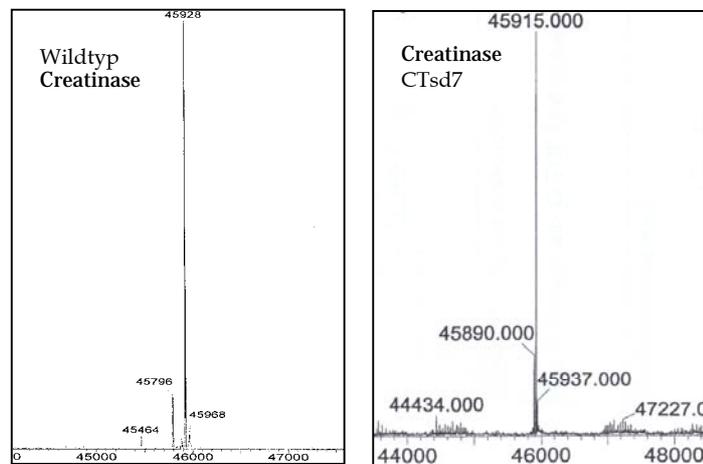


Abbildung 19 ESI-MS-Spektren von Wildtyp-Creatinase und Mutante CTsd7 (nach MAX-ENT-Überarbeitung)

Die Homogenitäten von Wildtyp-Creatinase und Mutante CTsd7 wurden mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Dazu wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe (40000 U/min) mit Protein durchgeführt, das 24 h bei 20 °C mit einer Konzentration von 0,3 mg/ml in 20 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7) inkubiert worden war (siehe Abschnitt 8.3.4, Abbildung 27). Beide Creatinasen sedimentierten als homogene Spezies. Die Sedimentations-Koeffizienten s betragen für den Wildtyp 5,35 S und für die Mutante 5,26 S. Diese waren im Rahmen des Messfehlers identisch. Die apparenten Molekulargewichte $M_{r(\text{app})}$ betragen 89110 Da bzw. 82250 Da. Da die anhand der Aminosäuresequenz berechneten Größen M_r der Untereinheiten 45917 Da bzw. 45891 Da betragen, konnte gezeigt werden, dass beide Proteine unter diesen experimentellen Bedingungen als Dimer vorlagen.

Mittels ESI-Massenspektrometrie konnte für Wildtyp-Creatinase und Mutante CTsd7 das erwartete Molekulargewicht bestätigt werden. Mit Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen wurde gezeigt, dass beide Proteine homogen als Dimer vorlagen.

8.3. Vergleich der Wildtyp-Creatinase mit Mutante CTsd7

Die Wildtyp-Creatinase aus *Erwinia spec.* und die optimierte Mutante CTsd7 unterschieden sich in vier Aminosäuren, die eine Erhöhung des apparenten Schmelzpunktes $T_{M(\text{app})}$ von 58 °C auf 66 °C sowie eine Verringerung des K_M -Wertes von 4,2 auf 2,0 mM bewirkten. Mit folgender vergleichender Charakterisierung sollte untersucht werden, worauf die Änderung der betrachteten Eigenschaften zurückzuführen war.

8.3.1. Thermische Entfaltung

Die thermische Entfaltung der Creatinasen wurde mittels *Differential Scanning*-Kalorimetrie (DSC) verfolgt, welche die Änderung der partiellen Wärmekapazität c_p in Abhängigkeit von der Temperatur aufzeichnet. Der Wildtyp wurde zunächst auf Reversibilität der Entfaltung getestet. Dazu wurden zwei aufeinander folgende Messungen bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml in 20 mM Natrium-Phosphat (pH 8) durchgeführt. Zuerst wurde die Probe mit einer Aufheizrate von 1 °C/min von 10 °C auf 65 °C erwärmt. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, wurde ein Signal bei $T_{M(\text{app})} = 58$ °C erhalten. Danach wurde die Probe abgekühlt und wieder erhitzt. Innerhalb der zweiten Messung wurde kein Signal detektiert. Die thermische Entfaltung des Wildtyps erfolgte also irreversibel. DSC-Messungen mit Mutante CTsd7 ergaben, dass ihre thermische Entfaltung ebenfalls irreversibel war (Abbildung 20). Der Schmelzpunkt $T_{M(\text{app})}$ von Mutante CTsd7 betrug 66 °C.

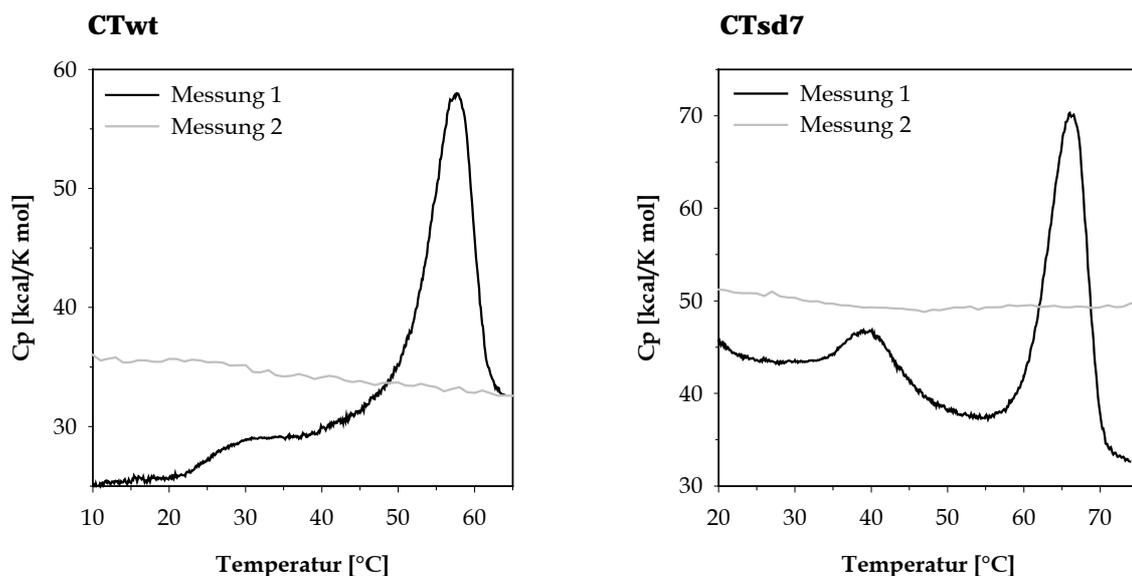


Abbildung 20 DSC- Analysen der thermischen Entfaltung
Für die Messungen der partiellen molaren Wärmekapazität wurde 1 mg/ml Creatinase in 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 8) in zwei aufeinander folgenden Messungen von 10 °C auf 65 °C (CTwt) bzw. 70 °C (CTsd7) mit 1 °C/min Aufheizrate erwärmt.

Die DSC-Kurven von Wildtyp und Mutante CTsd7 zeigten zusätzlich zum Schmelzpeak $T_{M(\text{app})}$ bei 58 °C bzw. 66 °C ein schwächeres Signal bei ca. 30 °C bzw. 39 °C. Um einen Hinweis auf die Ursache zu erhalten, wurden DSC-Messungen durchgeführt, die die Reversibilität der Prozesse prüfen sollten. Dazu wurde die Wildtyp-Creatinase bis 45 °C und

die Mutante CTsd7 bis 50 °C in zwei aufeinander folgenden Messungen mit 1 °C/min aufgeheizt. Bei beiden Proteinen waren die untersuchten Prozesse irreversibel (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurden Temperaturprofile mittels Lichtstreuungsmessungen bei 360 nm unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt. Ab ca. 30 °C (CTwt) bzw. 40 °C (CTsd7) wurde eine langsame und lineare Zunahme der Lichtstreuung beobachtet (Daten nicht gezeigt), die auf Bildung von Aggregaten zurückgeführt werden kann.

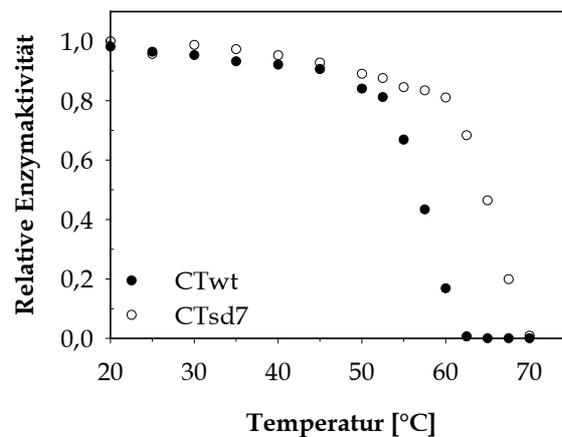


Abbildung 21

Thermische Inaktivierung

Für die Messungen der thermischen Inaktivierung wurde 1 mg/ml Creatinase in 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 8) mit einer Aufheizrate von 1 °C/min erwärmt und Aliquots entnommen, in denen die Enzymaktivitäten bestimmt wurden.

Tabelle 8

Thermische Inaktivierung und thermische Entfaltung

Die apparenten Mittelpunkte der thermischen Inaktivierung $T_{M(EA)}$ und die apparenten Schmelzpunkte der thermischen Entfaltung $T_{M(app)}$ ergeben sich aus den Experimenten der Abbildungen 20 und 21.

Creatinase	Thermische Inaktivierung	Thermische Entfaltung
	$T_{M(EA)}$	$T_{M(app)}$
CTwt	57 °C	58 °C
CTsd7	65 °C	66 °C

Um weitere Daten zur thermischen Stabilität zu erhalten, wurde die thermische Inaktivierung der Creatinase-Aktivitäten untersucht. Dazu wurde das Protein bei einer Konzentration von 1 mg/ml in 20 mM Natrium-Phosphat (pH 8) von 15 auf bis zu 70 °C mit einer Aufheizrate von 1 °C/min erwärmt und im Abstand von 2,5 – 5 min Aliquots entnommen, um die relative Rest-Aktivität zu bestimmen (Abbildung 21). Eine

Reaktivierung der Creatinasen nach ihrer thermischen Inaktivierung konnte ausgeschlossen werden. Die apparenten Mittelpunkte dieser thermischen Inaktivierung der Creatinase-Aktivität $T_{M(EA)}$ ergaben bei Wildtyp-Creatinase und Mutante CTsd7 57 °C bzw. 65 °C. Für beide Creatinasen sind die apparenten Mittelpunkte der Inaktivierung $T_{M(EA)}$ somit 1 °C niedriger als die apparenten Schmelzpunkte $T_{M(app)}$ (Tabelle 8). Die Inaktivierung von Wildtyp oder Mutante erfolgt bei höheren Temperaturen als die Prozesse bei 30 °C bzw. 39 °C, die in den DSC-Messungen detektiert wurden.

Die Creatinasen entfalteten sich unter Temperaturerhöhung irreversibel. Die apparenten Schmelzpunkte $T_{M(app)}$ betragen 58 °C und 66 °C für Wildtyp-Creatinase und Mutante CTsd7. Wildtyp und Mutante gaben bei 30 °C bzw. 39 °C bereits schwächere Signale, die mit dem Einsetzen einer langsamen und linearen Zunahme von Aggregation zusammenfielen. Die apparenten Mittelpunkte der thermischen Inaktivierung der Enzymaktivität $T_{M(EA)}$ betragen 57 °C bzw. 65 °C.

8.3.2. Modellstruktur von Mutante CTsd7

Die Modellstruktur der Mutante CTsd7 wurde mit dem Programm MODELLER 6.0 (SALI AND BLUNDELL, 1993) basierend auf der Röntgenkristall-Struktur der Creatinase aus *Pseudomonas putida* (HÖFFKEN ET AL., 1988) ohne Berechnungen zur Energieminimierung modelliert. Die Aminosäure-Sequenzen beider Proteine weisen zueinander 64 % Identität auf, die Auflösung der Kristallstruktur beträgt 1,9 Å. Anhand des Modells (Abbildung 22) ist zu erkennen, dass die Mutationen weder im direkten Kontakt miteinander stehen noch sich an der Kontaktfläche der beiden Untereinheiten, an der Moleküloberfläche oder in der Nähe des aktiven Zentrums befinden, welches an der Kontaktfläche zwischen den Untereinheiten lokalisiert ist (HÖFFKEN ET AL., 1988).

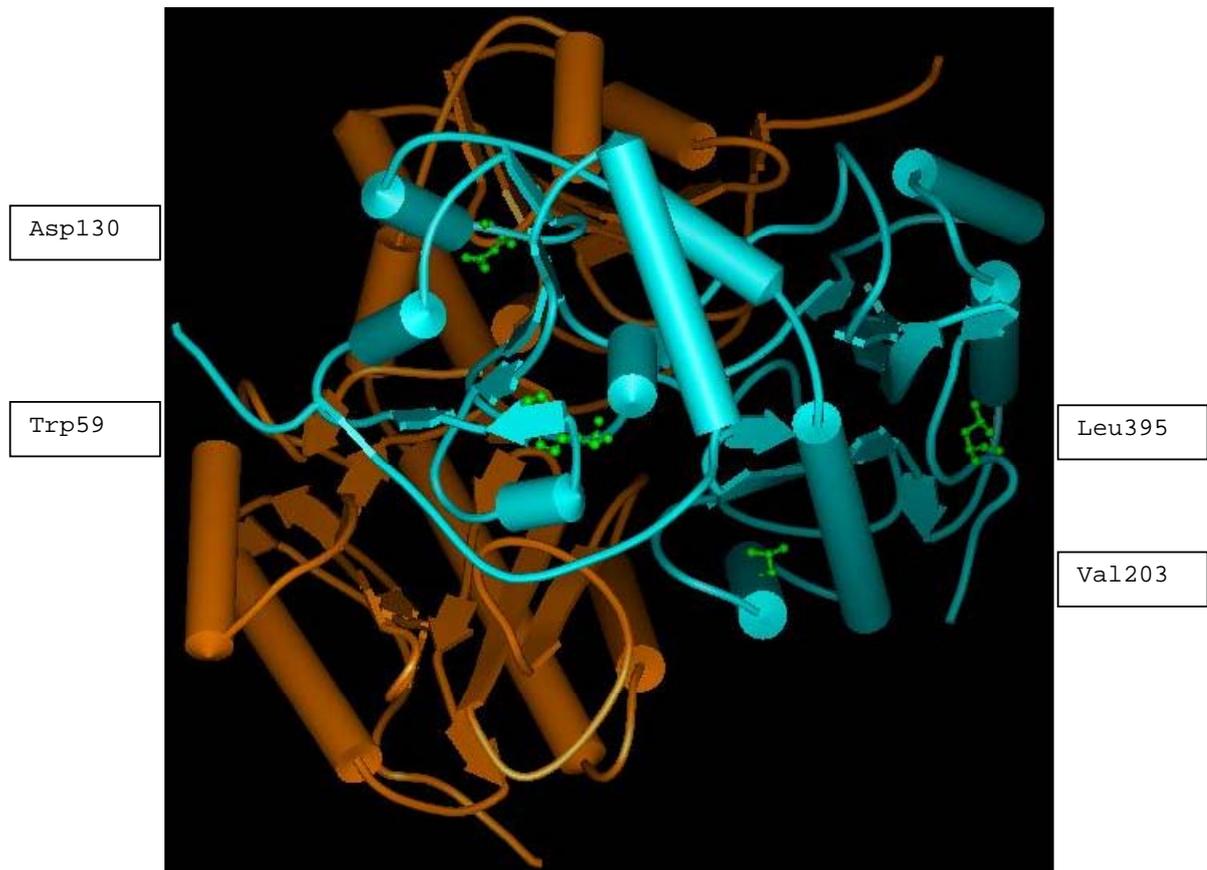


Abbildung 22 Modellstruktur der Creatinase-Mutante CTsd7
 Schematische Darstellung der dimeren Creatinase-Mutante CTsd7 basierend auf Homologiemodellierung nach der Röntgenkristallstruktur der Creatinase aus *Pseudomonas putida*. Das Creatinase-Modell besteht aus zwei identischen Untereinheiten (farbig markiert); jede Untereinheit setzt sich aus einer großen N-terminalen und einer kleinen C-terminalen Domäne zusammen. Die vier mutierten Aminosäure-Positionen sind grün markiert und beschriftet.

8.3.3. Sekundär- und Tertiärstruktur

Die Sekundär- und Tertiärstrukturen der nativen (20 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7) und entfalteten (gleicher Puffer mit 4,5 M GdnHCl) Proteine wurden mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie, Nah-UV-CD-Spektroskopie und Fluoreszenz-Spektroskopie miteinander verglichen.

Spektroskopische Untersuchungen hängen stark von der Art und Anzahl der als Chromophore oder Fluorophore dienenden aromatischen Aminosäuren eines Proteins ab. Die Creatinase aus *Erwinia sp.* besitzt eine große Anzahl aromatischer Aminosäure. Der Wildtyp verfügt über neun Tryptophane, 17 Tyrosine und 19 Phenylalanine. Die Mutante besitzt ein zusätzliches Tryptophan an Position 59.

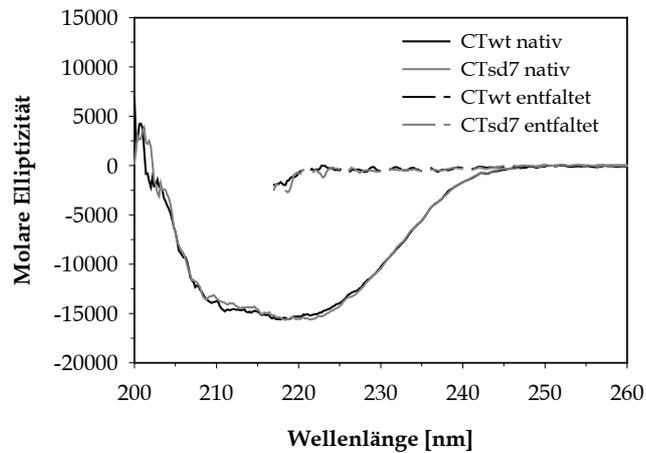


Abbildung 23 Fern-UV-CD-Spektren
 Das native Protein lag in 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7) gelöst vor; das entfaltete Protein im gleichen Puffer mit 4,5 M GdnHCl. Die Proteinkonzentration betrug 0,3 mg/ml.

Die Fern-UV-CD-Spektren der Creatinasen (Abbildung 23) wurden miteinander verglichen. Zwischen den Spektren der nativ strukturierten Proteine sind nur minimale Unterschiede in der Umgebung von 213 nm und 223 nm zu beobachten. Beide Spektren zeigen Minima bei jeweils ca. 222 nm und 209 nm, welche den CD-Banden α -helikaler Sekundärstrukturen entsprechen (222 nm und 208 nm (SCHMID, 1995)). Der Vergleich dieser Spektren lässt auf gleiche Sekundärstrukturen bei Wildtyp und Mutante schließen. Die Spektren der entfalteten Creatinasen in GdnHCl weisen die typischen Formen für entfaltete Proteine auf (SCHMID, 1995).

Die Nah-UV-CD-Spektren (Abbildung 24) der Creatinasen sind außergewöhnlich komplex. Das ist wahrscheinlich auf den sehr hohen Anteil an Tryptophanen in diesen Proteinen zurückzuführen. Tryptophane beeinflussen Nah-UV-CD-Spektren hauptsächlich in dem Bereich von 250 nm – 280 nm (FRESKGARD ET AL., 1994). Dabei können sich ihre CD-Banden in Abhängigkeit ihrer Umgebung sehr voneinander unterscheiden, denn dabei spielen z.B. die Lösungsmittelzugänglichkeit als auch eventuelle aromatische Cluster eine wesentliche Rolle (FRESKGARD ET AL., 1994). Die Spektren von Wildtyp und Mutante unterscheiden sich sowohl in ihrer Form als auch in ihrer Intensität voneinander. Das lässt sich vermutlich ebenfalls aus eben genannten Gründen auf das zusätzliche Tryptophan in der Mutante zurückführen. Neben diesen Unterschieden zeigen beide Spektren der nativ strukturierten Proteine als Gemeinsamkeit zwei Hauptminima bei ca. 282 nm und 287 nm. Da aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Tryptophanen keine deckungsgleichen Nah-UV-CD-Spektren

erhalten werden konnten, lassen sich anhand dieser Daten keine Aussagen zu Unterschieden in den Tertiärstrukturen beider Proteine ableiten. Die Signale der Spektren der nativ strukturierten Proteine sind in den Spektren der GdnHCl-denaturierten Proteine verschwunden, was darauf hinweist, dass die Umgebung der aromatischen Aminosäuren zerstört wurde.

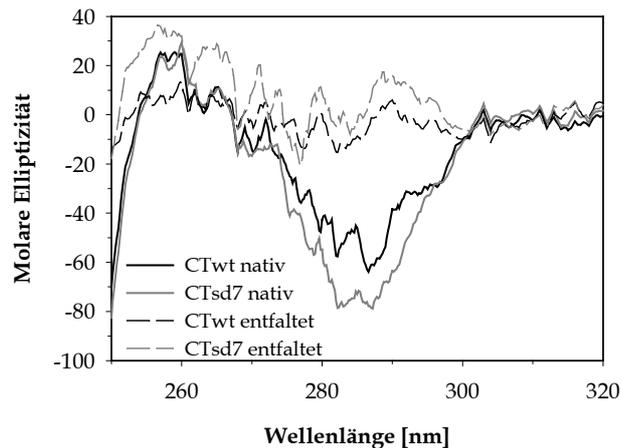


Abbildung 24 Nah-UV-CD-Spektren

Das native Protein lag in 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7) gelöst vor; das entfaltete Protein im gleichen Puffer mit 4,5 M GdnHCl. Die Proteinkonzentration betrug 0,6 mg/ml.

Die Tertiärstrukturen wurden außerdem mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Dazu wurden Fluoreszenz-Emissionsspektren von nativen und entfaltenen Proteinen bei der Anregungswellenlänge von 280 nm aufgenommen (Abbildung 25). Bei 280 nm werden Tryptophane und Tyrosine zum Fluoreszieren angeregt, wobei das Fluoreszenzsignal normalerweise von Tryptophanen dominiert wird (SCHMID, 1995). Das Emissions-Maximum der Nativspektren befindet sich bei 341 nm bzw. 339 nm für Wildtyp und Mutante. Die Exposition der aromatischen Aminosäuren zum Lösungsmittel nach der Entfaltung der Creatinasen bewirkte eine drastische Verminderung der Fluoreszenzintensität und eine Rotverschiebung der Emissionsmaxima zu 353 nm, welches ungefähr dem Emissionsmaximum von Tryptophanen in wässriger Lösung (350 nm) entspricht (SCHMID, 1995). Die Verschiebung der Wellenlänge und die Änderung der Intensität zeigen, dass die angeregten aromatischen Aminosäuren einen Umgebungswechsel erfahren hatten, welcher durch die GdnHCl-induzierte Entfaltung der Polypeptidkette ausgelöst wurde. Die Formen der Nativspektren sind identisch und auch die Formen der Entfaltungsspektren sind identisch. Die Intensitäten der Fluoreszenz-Spektren für Mutante CTsd7 sind aber im Vergleich zum Wildtyp etwas höher. Dies könnte vermutlich auf das zusätzliche Tryptophan

in der Mutante zurückzuführen sein, da bei der Anregungswellenlänge von 280 nm hauptsächlich Tryptophane detektiert werden (SCHMID, 1995). Aufgrund des zusätzlichen Tryptophans konnten keine identischen Fluoreszenzspektren erhalten werden und somit keine Aussage zu möglichen Unterschieden in der Tertiärstruktur der Proteine getroffen werden.

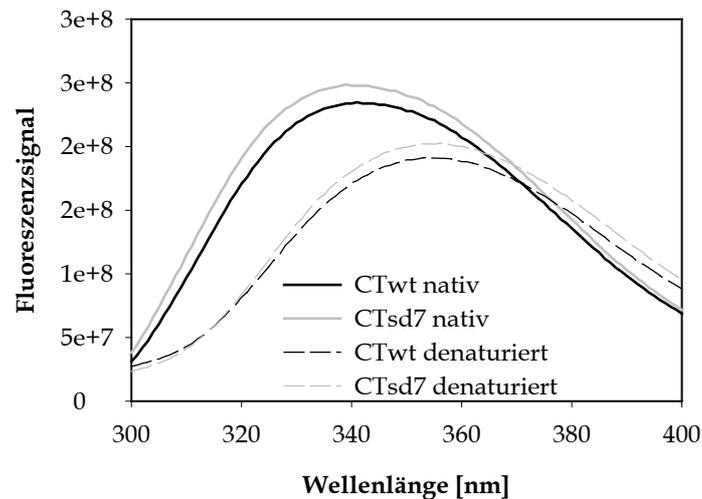


Abbildung 25 Fluoreszenzspektren

Das native Protein lag in 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7) gelöst vor; das entfaltete Protein im gleichen Puffer mit 4,5 M GdnHCl. Die Proteinkonzentration betrug 0,3 mg/ml.

Die Sekundär- und Tertiärstrukturen von Wildtyp und Mutante CTsd7 wurden mittels Fern-UV-CD-, Nah-UV-CD- und Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht. Auf Grundlage der Fern-UV-CD-Spektren kann man davon ausgehen, dass beide Creatinasen den gleichen Anteil an Sekundärstrukturen aufweisen. Wildtyp und Mutante unterscheiden sich in ihren nah-UV-CD-Spektren und Fluoreszenz-Spektren voneinander, was vermutlich auf den unterschiedlichen Gehalt aromatischer Aminosäuren zurückzuführen ist. Aussagen über mögliche Unterschiede in ihren Tertiärstrukturen sind aufgrund dieser Daten nicht möglich.

8.3.4. Guanidiniumchlorid-induzierte Entfaltung

Wie in Abschnitt 8.3.1 gezeigt wurde, besitzt Mutante CTsd7 im Vergleich zum Wildtyp einen 8 °C höheren apparenten Mittelpunkt $T_{M(\text{app})}$ für die thermische Entfaltung und einen 8 °C höheren apparenten Mittelpunkt $T_{M(\text{EA})}$ für die thermische Inaktivierung der Enzymaktivität. Um zu untersuchen, worauf die Stabilisierung der Mutante zurückzuführen ist, wurde die Stabilität in Gegenwart des Denaturierungsmittels Guanidiniumchlorid (GdnHCl) untersucht.

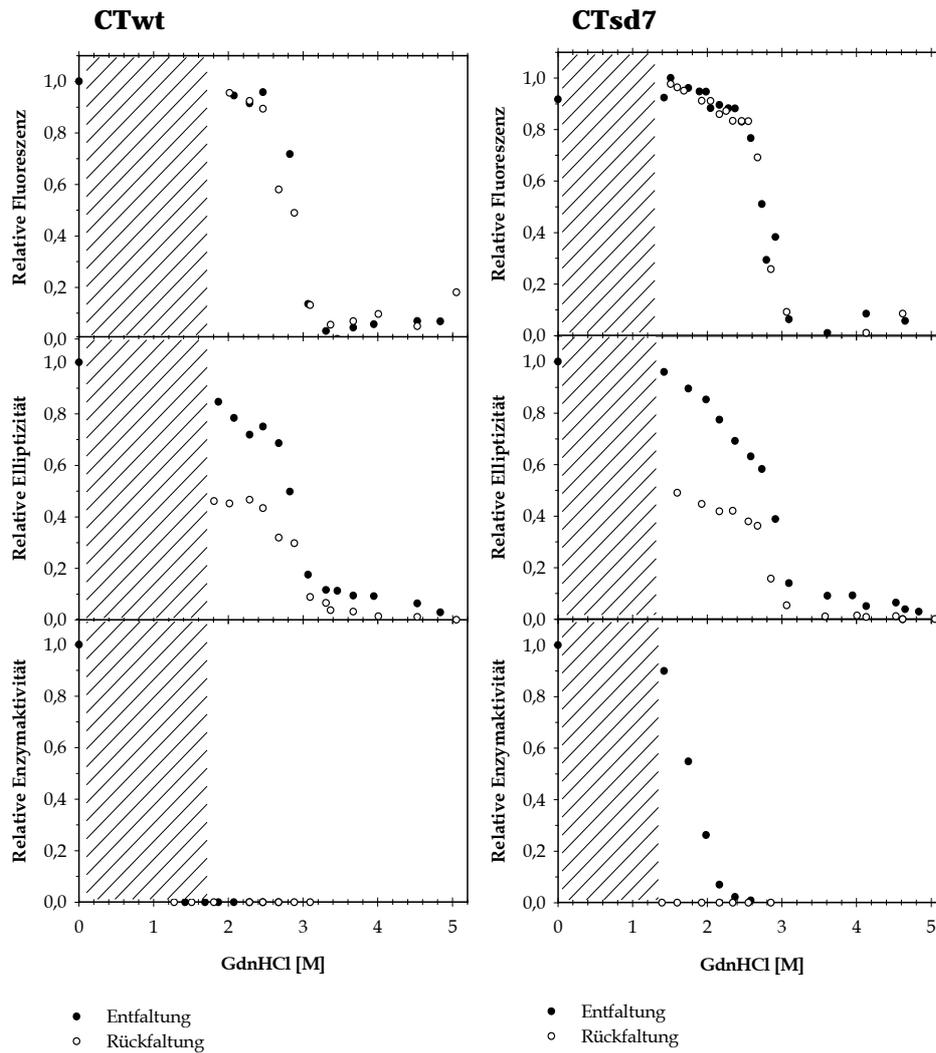


Abbildung 26 GdnHCl-induzierte Entfaltung und Rückfaltung

Die Proben wurden mit Proteinkonzentrationen von 0,3 mg/ml in 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7) mit verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen für 24 – 48 h bei 20 °C inkubiert. Für die Fluoreszenzmessungen wurden Emissionsspektren bei 280 nm Anregungswellenlänge aufgenommen und bei 340 nm analysiert. Für die CD-Messungen wurde die Elliptizität bei 225 nm aufgezeichnet. Zur Messung von Aggregation wurde die Lichtstreuung bei 360 nm bestimmt. Im schraffiert dargestellten Bereich wurde Aggregation detektiert.

Natives Protein (20 mM Na-Phosphat, pH7) und entfaltetes Protein (gleicher Puffer mit 8 M GdnHCl) wurde mit einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml mit verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen verdünnt und 24 – 48 h bei 20 °C inkubiert. Die Entfaltung des Proteins wurde über die Fluoreszenz, CD und die Creatinase-Aktivität analysiert. Das Fluoreszenzsignal soll Aussagen zu Änderungen der Tertiärstruktur gewähren. Die Elliptizität bei 225 nm (Fern-UV-CD-Spektroskopie) soll Aussagen zu Änderungen der Sekundärstruktur der Proteine ermöglichen. Über die Messung der Lichtstreuung bei 360 nm wurde die Aggregationsbildung verfolgt.

Die Daten wurden in Abbildung 26 zusammengefasst. Beide Creatinasen zeigen als Gemeinsamkeit, dass sie in Gegenwart niedriger GdnHCl-Konzentration (CTwt: 0,1 – 1,7 M; CTsd7: 0,1 – 1,3 M) aggregieren, wobei der Wildtyp in einem größeren Bereich als die Mutante Aggregation aufweist. Wegen der Aggregation konnten die Datenpunkte in diesem Bereich nicht ausgewertet werden. Anhand der Fluoreszenz- und CD-Daten lassen sich keine Unterschiede zwischen beiden Proteinen feststellen. Bei Analyse der Fluoreszenzdaten können reversible Übergänge mit monophasischer kooperativer Entfaltung beobachtet werden. Beide Proteine zeigen ihre 50 %-ige Entfaltung bei ca. 2,8 M GdnHCl. Wie aber die Analysen der Elliptizität zeigten, konnten die Creatinasen nach der GdnHCl-induzierten Entfaltung nicht in die native Konformation zurückgefalten werden. Die Änderungen der Sekundärstrukturen in Wildtyp und Mutante (relative Elliptizität) erfolgten unabhängig von und bei geringeren GdnHCl-Konzentrationen als die Änderungen der Tertiärstrukturen (relative Fluoreszenz) und nicht in monophasischer oder kooperativer Weise.

Der einzige Unterschied zwischen Wildtyp-Creatinase und Mutante zeigte sich in ihrer relativen Enzymaktivität. Während die Mutante ihre enzymatische Aktivität erst bei 2,4 M GdnHCl vollständig verlor, war beim Wildtyp schon bei 1,2 mM GdnHCl keine Aktivität mehr zu detektieren. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante ließen sich nach ihrer Entfaltung in GdnHCl nicht wieder reaktivieren.

Ausgewählte Proben der GdnHCl-induzierten Entfaltung wurden anschließend mittels Ultrazentrifugation (UZ) auf ihre Homogenität untersucht. Dazu wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe bei 40000 U/min mit den Proben der Entfaltung bei 0 M, 1,5 M und 4 M GdnHCl durchgeführt (Abbildung 27). Bei 4 M GdnHCl waren sowohl Wildtyp als auch Mutante bereits vollständig denaturiert (Daten nicht gezeigt). Bei 0 M GdnHCl lagen sowohl der Wildtyp als auch die Mutante, wie bereits in Abschnitt 8.2.2 erörtert wurde, einheitlich als native homodimere Spezies vor. Bei 1,5 M GdnHCl war der Wildtyp quantitativ aggregiert, so dass man keinen charakteristischen Sedimentationslauf mehr detektieren konnte. Im Unterschied zum Wildtyp war die Mutante bei dieser GdnHCl-Konzentration nur geringfügig aggregiert, der überwiegende Teil sedimentierte als homogene Spezies. Diese Daten bestätigen die Beobachtung aus Abbildung 26, wobei der Wildtyp deutlich stärker als die Mutante zur Aggregationsbildung neigte. Auch die Daten zur Enzymaktivität (Abbildung 26, unten) fügen sich in diese Beobachtung. Bei 1,5 M GdnHCl war der Wildtyp vollständig aggregiert und inaktiv, während die Mutante beinahe vollständig als homodimere und aktive Spezies vorlag. Der Aktivitätsverlust der Mutante ging mit Änderungen in der Sekundärstruktur einher, wie mittels Fern-UV-CD-

Spektroskopie (Abbildung 26, relative Elliptizität) beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu erfolgte die Inaktivierung des Wildtyps bei deutlich niedrigeren GdnHCl-Konzentrationen, noch bevor Änderungen der Sekundärstruktur beobachtet werden konnten. Möglicherweise ist diese Beobachtung auf die größere Aggregationsneigung des Wildtyps bei niedrigen GdnHCl-Konzentrationen zurückzuführen.

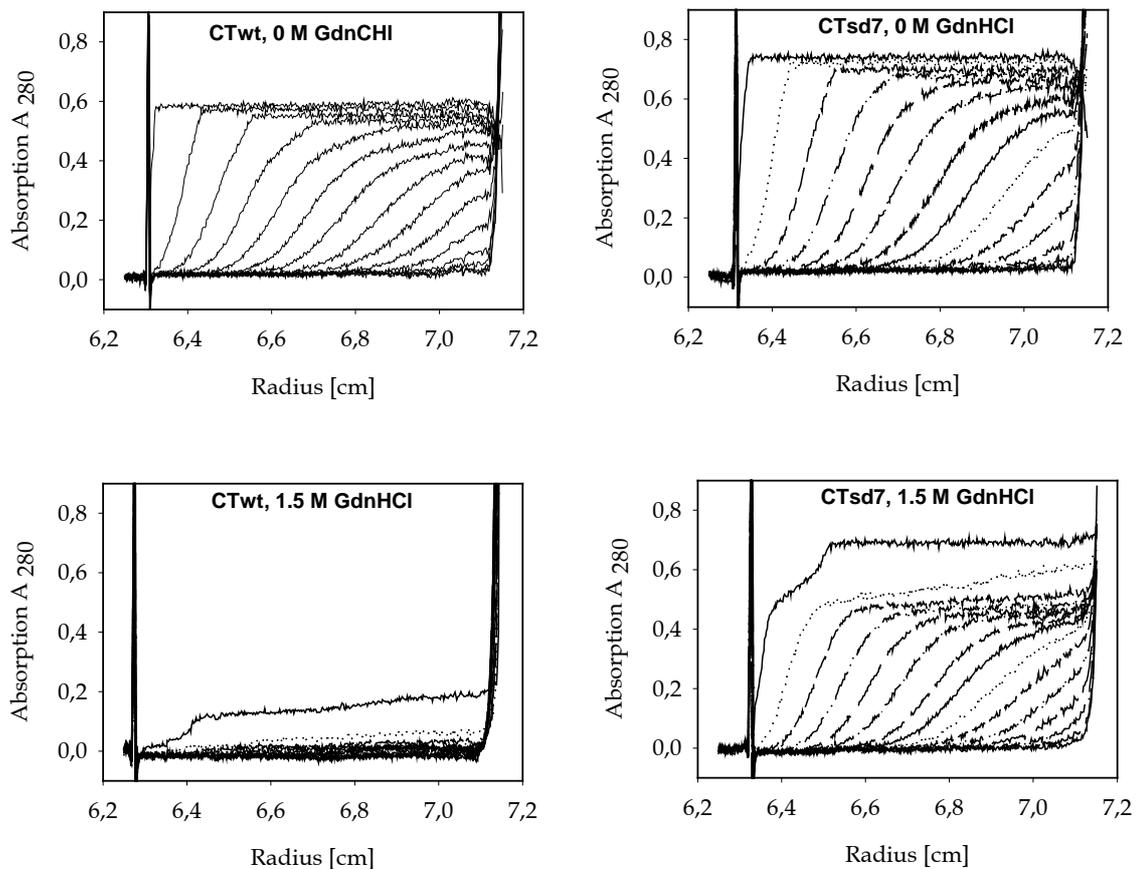


Abbildung 27 Aggregation während der GdnHCl-induzierten Entfaltung
 Natives Protein wurde in 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7) mit und ohne 1,5 M GdnHCl für 24 h bei 20 °C inkubiert. Die Molekülgröße wurde mittels Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe bei 40000 U/min analysiert. Abgebildet wurden die Sedimentationsprofile in 20-min-Abständen ab dem Start der Zentrifugation.

Die Daten zur GdnHCl-induzierten Entfaltung von Wildtyp-Creatinase und Mutante CTsd7 lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Aufgrund der Fluoreszenz- und CD-Daten lassen sich keine Unterschiede zwischen beiden Proteinen feststellen. Die Fluoreszenzdaten suggerierten zunächst einen reversiblen Übergang zwischen nativem und denaturiertem Zustand. Die CD-Daten allerdings zeigten, dass die Proteinstruktur nach ihrer Entfaltung in GdnHCl nicht wiederhergestellt werden konnte. Messungen der Lichtstreuung und UZ-

Daten belegen, dass beide Proteine bei niedrigen GdnHCl-Konzentrationen zur Aggregationsbildung neigten, wobei diese Neigung beim Wildtyp stärker als bei der Mutante ausgeprägt war. Ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp-Creatinase und Mutante zeigte sich in ihrer relativen Enzymaktivität. Während die Mutante ihre enzymatische Aktivität erst bei 2,4 M GdnHCl vollständig verlor, war beim Wildtyp schon bei 1,2 mM GdnHCl keine Aktivität mehr zu detektieren. Beide Enzyme ließen sich nach GdnHCl-induzierter Entfaltung nicht reaktivieren.

9. Diskussion zur *Walk Through* Rekombination

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur homologen *in vitro* Rekombination von homologen DNA-Sequenzen, die sich durch gutes Potential der Rekombinationsfrequenz, Rekombinationseffizienz und den Abständen zwischen den Rekombinationsereignissen auszeichnen sollte. Darüber hinaus war eine einfache und wenig störanfällige Durchführbarkeit erwünscht sowie eine gleichmäßige Verteilung der Rekombinationsereignisse ohne methodisch verursachte Präferenzen. Grundidee der zu entwickelnden *Walk Through* Rekombination war die Generierung von Fragmenten in sehr hoher Variabilität mit der Kettenabbruchsynthesereaktion nach SANGER (1977) sowie die enzymatische Entfernung der terminierenden Didesoxynukleotide am 3'-Ende der Fragmente mit anschließender Reassemblierung. Um die Entwicklung der einzelnen Arbeitsschritte verfolgen zu können, wurde ein sehr sensitives Detektionssystem verwendet, welches auf dem immunologischen Nachweis DIG-markierter DNA beruhte.

9.1. Fragmentsynthese

Die Herstellung der Fragmente nach dem Prinzip der Kettenabbruchsynthese nach SANGER (1977) beruht auf einer Polymerase-vermittelten DNA-Synthese unter Verwendung eines dNTP/ddNTP-Gemisches. Die Inkorporation eines ddNTPs in die wachsende DNA-Kette führt an dieser Position zum Abbruch der Synthesereaktion. Die Kettenabbruchsynthesereaktion stellt bis heute das Grundprinzip verschiedener Methoden zur DNA-Sequenzierung („Dideoxy-Sequenzierung“) dar. Zur Herstellung der Fragmente für die Rekombination wurde ein Protokoll verwendet, welches auf aufeinander folgenden Zyklen von *Annealing*, *Extension* und *Denaturierung* („*Cycle Sequencing*“) unter Verwendung der thermostabilen *Taq*-Polymerase beruht. Da das *Template* hierbei wiederholt verwendet wird, erfolgt eine lineare Amplifizierung der „Sequenzierungsprodukte“ und somit werden nur geringen Mengen an *Template*-DNA benötigt.

Üblicherweise werden für jede zu sequenzierende DNA vier Sequenzreaktionen mit je einem Dideoxynukleotid durchgeführt, wobei die wachsenden Stränge nach elektrophoretischer Auftrennung im Polyacrylamid-Gel oder in Kapillaren radioaktiv, immunologisch oder über Fluoreszenz detektiert werden können. Da neu entwickelte Sequenzierautomaten simultan mehrere Fluoreszenzfarbstoffe detektieren können, wurden entsprechende Protokolle entwickelt, die mehrere (fluoreszenzmarkierte) Dideoxynukleotide in einem Reaktionsansatz („Einzeltopf-Reaktion“) enthielten. Die Protokolle für die sogenannten „Einzeltopf-Reaktionen“ waren jedoch nicht frei erhältlich und zudem auf den Einbau von

(fluoreszenzmarkierten) Nukleotid-Analoga sowie auf lange Leseweiten der Sequenzierung optimiert, welche für die Rekombination nicht erwünscht waren. Zur Arbeitserleichterung der Methodenentwicklung wurde jedoch das Prinzip der „Einzeltopf-Reaktion“ übernommen.

Für die Entwicklung der *Walk Through* Rekombination wurde der DIG TAQ DNA SEQUENCING KIT FOR STANDARD AND CYCLE SEQUENCING der Firma ROCHE DIAGNOSTICS GMBH BUSINESS AREA ROCHE APPLIED SCIENCE (Mannheim) mit verändertem Protokoll verwendet. Das Reaktionsvolumen wurde erhöht und die nach ddNTP getrennten Nukleotidgemische wurden zu einem Reaktionsansatz vereinigt. Die Eigenschaft der Polymerase, ddNTPs gegenüber dNTPs zu diskriminieren, bestimmt das ddNTP:dNTP-Verhältnis, welches benötigt wird, um „Fragmentleitern“ zu erhalten. Nach dem Vereinigen der Nukleotide für die Fragmentsynthese wurde das ddNTP:dNTP-Verhältnis etwas verändert, was zu einer Änderung der Fragmentlängen führen kann, aber im Rahmen der Methodenentwicklung nicht näher untersucht wurde.

Mit dieser abgeänderten Sequenzierungs-Reaktion wurden „Fragmentleitern“ mit einer durchschnittlichen Länge von 100 bis 300 Nukleotiden synthetisiert (Abbildung 7). Je nach *Template*-Länge müssen demnach Fragmentsynthese-Ansätze von entsprechend vielen Primern durchgeführt werden. Für das Beispiel der ca. 1650 bp langen *Template*-DNA der Alkalischen Phosphatasen wurden je Gen sechs Primer verwendet. Die Länge der Fragmente von 100 bis 300 Nukleotiden ist für die Reassemblierungsreaktion prinzipiell gut geeignet und musste deshalb nicht angepasst werden bzw. erforderte keine anschließende Größenfraktionierung der Fragmente. Wären nämlich die Fragmente zu lang, bestände Gefahr, dass einzelne Fragmente die gesamte Gensequenz umfassen und amplifiziert werden, ohne zu reassemblieren. Die Anwesenheit solcher Fragmente kann mittels einer Kontroll-PCR mit endständigen Primern ausgeschlossen werden. Wäre der größte Anteil der Fragmente von sehr kurzer Länge, würde die Reassemblierungsreaktion schwieriger, da mehr Fragmente reassembliert werden müssen. Dennoch kann die Anwesenheit besonders kurzer oder besonders langer Fragmente wünschenswert sein, zum Beispiel wenn sehr kurze bzw. sehr lange DNA-Sequenzen reassembliert werden sollen. Außerdem wird angenommen, dass die Anzahl der Rekombinationsereignisse durch die Verwendung möglichst kurzer DNA-Fragmente positiv beeinflusst wird. Im Bedarfsfall kann die Länge der Fragmente durch Änderung des ddNTP:dNTP-Verhältnisses angepasst werden.

Die Menge der als *Template* in die Fragmentsynthese-Reaktion eingesetzten U-DNA wurde für die verwendeten Reaktionsbedingungen optimiert und konnte von 250 ng je 30 µl Reaktionsansatz (entspricht proportional der Menge im Original-Protokoll) auf 100 ng gesenkt werden (Abbildung 7). Das spart Zeit und Kosten für die Herstellung der U-DNA, die trotz Optimierung in relativ großen Mengen benötigt wird. Immerhin wird für die Reassemblierung zweier Gene mit je sechs Primern die DNA aus 12 Fragmentsyntheseansätzen verwendet, also werden 12 x 100 ng anstelle 12 x 250 ng U-DNA benötigt. Darüber hinaus wurde auch die Ausbeute der Fragmente durch Verwendung von 100 ng anstelle von 250 ng U-DNA deutlich gesteigert.

Die Detektion der Fragmente wurde durch Verwendung eines DIG-markierten Primers ermöglicht. Die entstandenen ssDNA-Fragmente wurden in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, mittels *Elektroblotting* auf Nylonmembran transferiert und immunodetektiert. Unabhängig von der verwendeten *Template*-Menge waren in den „Fragmentleitern“ aller Reaktionsansätze typische Bandenmuster oder Bandenkompensationen zu beobachten. Kompensationen sind elektrophoretische Artefakte, die auftreten, wenn Einzelstrangprodukte von Sequenzreaktionen Sekundärstrukturen (z.B. Haarnadelstrukturen) bilden, welche selbst in Gegenwart von 7 M Harnstoff stabil sind. Unnatürlicher Bandenabstand, extra Banden und fehlende Banden liefern Hinweise, dass Kompensationen vorliegen. Kompensation des Bandenmusters sind das größte Problem von Dideoxysequenzierungs-Methoden (CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 7.4 A.35) und liefern eventuell eine Erklärung für die Bandenmuster in den „Fragmentleitern“ der *Walk Through* Rekombination.

Zusammenfassend stellt das verwendete Protokoll nachweislich eine geeignete Methode dar, Fragmente in großer Variabilität und im erwünschten Größenbereich von durchschnittlich 100 bis 300 Nukleotiden zu generieren. Die Fragmente können ohne hohen technischen Aufwand in reproduzierbarer Qualität und Quantität erhalten werden, was eine wichtige Voraussetzung sowohl für die Entwicklung als auch für die spätere Anwendung dieser Rekombinationsmethode darstellt.

9.2. Entfernen der *Template*-DNA

Die quantitative Abtrennung der *Template*-DNA der Fragmentsynthese-Reaktion vor dem Reassemblierungsschritt ist essentiell, damit nur Fragmente miteinander reassemblieren. Andernfalls kann es zur Amplifizierung der Elterngene führen, womit der Anteil chimärer

Sequenzen im Reassemblierungsprodukt reduziert werden würde. Für die Entfernung der *Template*-DNA wurden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen:

(1) Der enzymatische Abbau der DNA mit Restriktionsenzym *DpnI*, welches eine methylierte 4bp-Erkennungssequenz besitzt, hinterlässt je nach Anzahl an Restriktionsschnittstellen Abbauprodukte von mehreren Hundert Basenpaaren, die nicht von den „Fragmentleitern“ abgetrennt werden und deshalb in der anschließenden Reassemblierung interferieren können. Vermutlich würde die Reassemblierungsreaktion selbst nicht gestört werden, aber jedoch das Ergebnis. Ziel der Rekombinationsmethode war es, eine hohe Anzahl und einen geringen Abstand an Rekombinationsereignissen durch die Reassemblierung der „Fragmentleitern“ zu erreichen. Die Reassemblierung enzymatisch gespaltener DNA (mit *DpnI*) würde erstens keine hohe Vielfalt an Reassemblierungsprodukten ermöglichen und zweitens keine neue Methode darstellen.

(2) Die Bindung biotinylierter DNA an Streptavidin-überzogene Oberflächen ist technisch etwas aufwendiger als ein enzymatischer Verdau und darüber hinaus wäre kein vollständiges Entfernen der *Template*-DNA zu erwarten. Deshalb müsste die Streptavidin-Biotin-Bindung auf jeden Fall mit einer zweiten Methode, wie z.B. einem enzymatischen Verdau, kombiniert werden.

(3) Eine technisch ebenfalls aufwendige Methode (siehe auch Abschnitt 7.4) ist die Abtrennung der DNA-Fragmente von der *Template*-DNA im denaturierenden (wegen den Sekundärstrukturen der ssDNA-Fragmente) Polyacrylamid- oder Agarose-Gel mit Extraktion der gewünschten DNA.

(4) Die Methode der Wahl war der enzymatische Abbau der *Template*-DNA mit Uracil-DNA-Glycosylase (UNG). UNG hydrolysiert Uracil-glycosidische Bindungen in Einzel- und Doppelstrang-DNA, wobei sie Uracil abspaltet. Die daraus resultierenden abasischen Stellen werden dann durch hohe Temperaturen gespalten. UNG arbeitet unter vielen Pufferbedingungen und kann dem Reaktionsansatz nach der Fragmentsynthese direkt zugesetzt werden. Die als *Template* verwendete Uracil-haltige DNA (U-DNA) wurde zuvor in einer PCR mit dUTPs anstelle von dTTPs synthetisiert und über Gelextraktion von kontaminierender nicht Uracil-haltiger DNA abgetrennt. Da jede Thymin-Position in der DNA-Sequenz mit einem Uracil ersetzt war, wurde der Abbau der DNA in kleinste DNA-Stücke möglich. Ziel war es, möglichst kurze Abbauprodukte zu erhalten, die entweder leicht von den „Fragmentleitern“ abzutrennen sind oder aber aufgrund ihrer niedrigen *Annealing*-Temperatur nicht in der Reassemblierungsreaktion interferieren können. Deshalb wurde der

UNG-Verdau optimiert. Dafür wurde DIG-markierte U-DNA hergestellt und nach Behandlung mit UNG und Hitze in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (6 %) aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und immunodetektiert. Unter den optimierten Bedingungen (4 h, 37 °C und 2 min, 95 °C Inkubation mit hitzelabiler UNG) konnten nur noch wenige Reste sehr kurzer Abbauprodukte (kürzer als 67 nt) detektiert werden (Abbildung 8). Der quantitative Abbau der U-DNA konnte zusätzlich mit Kontroll-PCRs mit endständigen Primern (Daten nicht gezeigt) bzw. mit einer Negativ-Kontrolle für die Reassemblierungsreaktion (Abschnitt 7.6) bestätigt werden.

9.3. Reinigung der DNA-Fragmente

Die Reassemblierung von Fragmenten stellt einen sehr empfindlichen Prozess dar. Deshalb ist von entscheidender Bedeutung, dass für diese Reaktion Fragmente in ausreichender Menge und hoher Reinheit vorliegen. Die Fragmente müssen von (Dideoxy-) Nukleotiden, Primern, UNG-Abbauprodukten und Salzen abgetrennt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Methoden getestet. Wie in Abschnitt 7.4 angeführt, hatten alle Techniken, die auf Bindung der DNA an Silica-Materialien beruhen, hohe Ausbeuteverluste zur Folge. Ebenso konnte nach Anwendung von *Spin Column*-Chromatographie mit Sephadex 200-Säulenmaterial keine DNA wiedergefunden werden. Vermutlich binden die ssDNA-Fragmente sehr fest an die verwendeten Materialien. Hinzu kommt, dass die zu reinigenden DNA-Mengen auch nach dem Vereinigen der Reaktionsansätze weit unterhalb der Bindungskapazitäten der Säulen lagen und somit Ausbeuteverluste aufgrund von Adsorption der DNA an die Materialien erfolgen können. Weitere Methoden wie DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen oder Elektrophorese auf DEAE-Cellulose mussten ebenfalls aus oben genannten Gründen verworfen werden: Die DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel erfolgt auch über Bindung an Silica-Materialien und konnte somit nicht angewendet werden. Eine Alternative zur DNA-Extraktion wäre die Elektrophorese auf DEAE-Cellulose (Molecular Cloning 2nd Edition: 6.24). Einzelstrang-DNA lässt sich jedoch von DEAE-Cellulose nur schwierig wieder eluieren.

Ein völlig anderes Prinzip der DNA-Reinigung, die Zentrifugation durch Cellulose-Membranen, führte zum angestrebten Erfolg. Die Reaktionsansätze wurden durch Membranen mit Ausschlussgrenzen bis zu 100 kDa zentrifugiert, welche ssDNA von 300 Nukleotiden Länge entspricht. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, konnten die ssDNA-Fragmente mit dieser Technik ohne bemerkenswerte Ausbeuteverluste im Retentat wiedergefunden werden. Die abzutrennenden Nukleotide, Primer, UNG-Abbauprodukte

und Salze sollten aufgrund der vom Hersteller angegebenen Ausschlussgrenzen abgetrennt werden. Es war eine deutliche, jedoch unvollständige Abreicherung von kurzer Einzelstrang-DNA mit Längen bis zu 67 Nukleotiden zu beobachten. Das bedeutet, dass eventuell ein (geringer) Teil der Primer bzw. UNG-Abbauprodukte im Retentat verblieben sein können. Wie die Reassemblierungsergebnisse zeigten, störten diese eventuell zu geringen Anteilen enthaltenen Verunreinigungen nicht die Reassemblierungsreaktion. Darüber hinaus zeigte die Negativkontrolle der Reassemblierung mit der *Pfu*-Polymerase, dass trotz eventueller Anwesenheit von Primern unter den gegebenen Bedingungen keine Reassemblierungsreaktion erfolgen konnte, die ohne Abbau der terminierenden Didesoxynukleotide von den DNA-Fragmenten passieren konnte. Trotzdem bleibt zu versuchen, mit größeren Ausschlussgrenzen eine bessere Abtrennung kurzer DNA-Einzelstränge zu erzielen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die kommerziell erhältlichen Zentrifugationsvorrichtungen mit Membranen von 30, 50 oder 100 kDa Ausschlussgrenze verglichen, welche geringe Unterschiede in der Abreicherung von kurzen DNA-Einzelsträngen bewirkten. Die im Reaktionsansatz enthaltene *Taq*-Polymerase sowie die Hitze-inaktivierte UNG dürften, sofern sie im Retentat zurückbehalten wurden, in der Reassemblierungsreaktion nicht stören.

9.4. Abbau der terminierenden Didesoxynukleotide

Für den Abbau der terminierenden Didesoxynukleotide wurden verschiedene Möglichkeiten in Erwägung gezogen, die alle auf enzymatischen Abbau mittels einer 3'→5'-Exonuklease-Aktivität beruhen und im folgenden diskutiert werden.

Wie in Abschnitt 7.5 bereits angeführt, wurde eine Technik angestrebt, die einen kontrollierten Abbau der Nukleotide am 3'-Ende der Fragmente (im Idealfall den Abbau nur des einzelnen terminierenden Didesoxynukleotids) ermöglichen sollte, um die große Vielfalt der Fragmente zu erhalten. Deshalb wurde zunächst die *Pfu*-Polymerase getestet. Die *Pfu*-Polymerase verfügt neben ihrer 5'→3'-Polymerase-Aktivität auch über 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, die der Polymerase zur Fähigkeit der Fehlerkorrektur verhilft. Der pragmatische Grundgedanke war, den Abbau der terminierenden Didesoxynukleotide mit der Reassemblierung in einem Arbeitsschritt zu kombinieren, wobei die Polymerase die Didesoxynukleotide, nachdem sie sie nicht verlängern konnte, zunächst exonukleolytisch abbaut, um anschließend die Strangsynthese durchführen zu können. Wie sich in wiederholten Versuchen herausstellte, konnte auf diese Weise kein Reassemblierungsprodukt erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich kann die *Pfu*-

Polymerase Didesoxynukleotide nicht als fehlerhaft identifizieren, da kein *Mismatch* vorliegt. Möglicherweise funktioniert die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität dieser Polymerase nur in Abwesenheit von dNTPs.

Die alternative Strategie der Verwendung einer thermostabilen 3'→5'-Exonuklease im Reassemblierungsansatz folgte demselben Grundgedanken. Allerdings sollte die Exonuklease nicht in der Lage sein, zwischen korrekten und falschen Basenpaarungen zu unterscheiden und somit die Didesoxynukleotide abbauen können. Hierfür wurde ein kürzlich für PCR-Anwendungen entwickeltes Enzymgemisch aus thermostabiler Exonuklease III und *Taq*-Polymerase verwendet. Wie in den Abschnitten 7.5 ff dargelegt, konnte unter Verwendung dieses Enzymgemisches erfolgreich reassembliert werden. Die Exonuklease III ist eine Doppelstrang-3'→5'-Exonuklease. Das bedeutet, dass sie erst nach dem *Annealing* der DNA-Fragmente aktiv wird und somit kein unkontrollierter Abbau von DNA erfolgen kann. Die nukleolytische Aktivität der Exonuklease III und die synthetisierende Aktivität der *Taq*-Polymerase stehen miteinander im Gleichgewicht, welches durch das Mischungsverhältnis der Enzyme bestimmt wird und vom Hersteller optimiert wurde.

Wie für die *E. coli* Exonuklease III bekannt ist, hängt die Abbaurate von der DNA-Zusammensetzung ab: C>>A≈T>>G (CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 3.11.3; ROGERS & WEISS, 1980). Folglich werden verschiedene DNA-Enden mit verschiedenen Geschwindigkeiten abgebaut. Dies könnte für die Erhaltung der Fragmentvielfalt bedeuten, dass nach dem Abbau proportional mehr Fragmente mit ‚G‘ enden. Daten zur tatsächlichen Abbaugeschwindigkeit der thermostabilen Exonuklease III sowie zur Gleichgewichtsrate zwischen Abbau und Synthese des Enzymgemisches lagen im Rahmen dieser Arbeit nicht vor, so dass über die Verteilung der Fragmentenden keine Aussage gemacht werden kann. Wie die Sequenzdatenanalyse der Reassemblierungsprodukte (Abschnitt 7.7) zeigte, konnten sehr gute Ergebnisse hinsichtlich der Rekombinationseffizienz (Abstand zwischen zwei Rekombinationsereignissen) erhalten werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Vielfalt der Fragmente nach dem Abbau der Didesoxynukleotide sehr hoch geblieben ist. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die Fragmente nur hybridisieren, wenn sie an ihren 3'-Enden komplementäre Sequenzen aufweisen. Wird die DNA in diesen Bereichen exonukleolytisch abgebaut, wird sie anhand des komplementären Gegenstranges identisch wieder synthetisiert. An der Fragmentsequenz änderte sich somit effektiv nichts.

Für den Abbau der Didesoxynukleotide wurden zwei weitere Methoden in Betracht gezogen, die beide in einem extra Arbeitsschritt vor der Reassemblierungsreaktion zu erfolgen hätten. Mit einer Variante der sogenannten *Exchange*-Reaktion besteht alternativ zur Verwendung des *Taq/Exo*-Gemisches die Möglichkeit für einen kontrollierten Abbau. Die *Exchange*-Reaktion wird laut Literatur (SAMBROOK ET AL. 1989, 5.40 UND 5.44) zur endständigen Markierung von DNA-Molekülen unter Verwendung des Klenow-Fragments der *E. coli* DNA-Polymerase I oder der Bakteriophage T4 DNA-Polymerase benutzt. Beide Enzyme verfügen über 3'→5'-Exonuklease-Aktivität an ssDNA und dsDNA und in Anwesenheit hoher dNTP-Konzentrationen über 5'→3'-Polymerase-Aktivität. Die beschriebene *Exchange*-Reaktion erfolgt in Gegenwart hoher Konzentrationen eines radioaktiv markierten Nukleotides und besteht aus Zyklen von Abbau des 3'-terminalen DNA-Ende bis einschließlich zur Base, die dem radioaktiven Nukleotid entspricht und dem Ersetzen dieser Base. Erfolgt diese Reaktion in Gegenwart ausgewählter Nukleotide, ist die Herstellung definiert beschnittener 3'-terminaler DNA-Enden möglich (DIETMAIER ET AL., 1993).

Die Anwendung für den Abbau der terminierenden Didesoxynukleotide der *Walk Through* Rekombination könnte folgendermaßen aussehen: In Gegenwart von nur drei der vier Desoxynukleotide kann das Ende mit der T4-Polymerase abgebaut werden und gleichzeitig der Strang durch Einbau der angebotenen Nukleotide wieder aufgebaut werden – bis zum fehlenden Nukleotid. Wird diese Reaktion parallel viermal mit jeweils anderen Nukleotiden durchgeführt, könnte auf diese Weise eine große Variabilität der DNA-Fragmente erhalten werden. Voraussetzung ist, dass die einzelsträngig vorliegenden DNA-Fragmente miteinander oder mit ihrer *Template*-DNA hybridisieren. Da diese Methode nur an stumpfen oder 5'-überhängenden DNA-Enden funktioniert, würde allerdings einzelsträngig vorliegende DNA vollständig abgebaut und von 3'-Überhängen der Überhang abgebaut werden.

Eine sehr einfache Möglichkeit sollte der exonukleolytische Abbau der einzelsträngig vorliegenden DNA-Fragmente durch das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I bieten. Die Abbaugeschwindigkeit müsste über die Konzentration der DNA und des Klenow-Fragments sowie die Inkubationsbedingungen gesteuert werden. Das Klenow-Fragment zeigt im Vergleich zu anderen Polymerasen die niedrigste Abbaugeschwindigkeit und wäre deshalb besonders geeignet. Trotzdem wäre ein kontrollierter Abbau auf diese Weise nur schlecht möglich.

9.5. Reassemblierung

Die Reassemblierung ist eine PCR-ähnliche Reaktion ohne Primer, in der die Fragmente aufgrund ihrer Sequenzhomologie miteinander hybridisieren und verlängert werden. Sie ist eine sehr empfindliche Reaktion. Um diese zu erleichtern, wurde im Unterschied zur PCR die *Annealing*-Temperatur gesenkt, die Nukleotide-Konzentration und Zyklenzahl erhöht. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Parameter wie die Mg^{2+} -Konzentration (Abschnitt 7.5), *Annealing*-Temperatur, Extensionszeit und Fragmentmenge (Abschnitt 7.6) variiert.

Eine Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration über standardmäßig 1,5 mM führte nicht zur Erhöhung der Produktausbeute bei der Rekombination von *hpap* alleine (Abbildung 10). Eine erhöhte Mg^{2+} -Konzentration erhöht die Fehlerrate der verwendeten *Taq*-Polymerase (CADWELL ET AL., 1994). Deshalb wurde im darauffolgenden Reassemblierungsexperiment (Abbildung 13) die Standard-Konzentration von 1,5 mM verwendet. Da der Einsatz höherer $MgCl_2$ -Konzentrationen die Hybridisierung der DNA-Stränge erleichtert und somit zur Stabilisierung nichtkomplementärer Basenpaare führt, sollte sie bei Bedarf jedoch erhöht werden.

Durch Variation der *Annealing*-Temperatur zwischen 45 °C und 55 °C oder die Verlängerung der Extensionszeit von 30 sec auf 2 min wurde keine deutliche Erhöhung der Produktausbeute erreicht. Ausgehend von diesen Ergebnissen wäre für künftige Reassemblierungsexperimente ebenfalls eine kurze Extensionszeit von z.B. 30 sec zu empfehlen. Die Verwendung einer kurzen Extensionszeit kann im Grenzfall dazu führen, das beide hybridisierten Fragmente nicht zum vollständigen Doppelstrang synthetisiert werden. Dies wiederum kann einerseits die Reassemblierungsreaktion erschweren, andererseits die Vermischung der Elterngene fördern. Da jedoch trotz kurzer Extensionszeit von 30 sec Reassemblierungsprodukt erhalten werden konnte (Abbildung 13), wäre die kurze Extensionszeit einer längeren vorzuziehen.

Schwieriger lässt sich eine geeignete *Annealing*-Temperatur vorschlagen, da mit steigender Temperatur sowohl ein günstiger als auch ein ungünstiger Prozess unterstützt werden. Generell besitzen große Überlappungsbereiche hohe Schmelztemperaturen, während kurze Überlappungsbereiche, *Mismatch*-Positionen oder ein niedriger GC-Anteil den Schmelzpunkt senken. Die Existenz verschiedener Fragmente und verschiedener Überlappungsbereiche bewirkt, das *Annealing*-Ereignisse in einem großen Temperaturbereich (typischerweise 94 °C bis 55 °C) auftreten (MOORE ET AL., 2001). Die Differenzen der Freien Energie zwischen

verschiedenen *Annealing*-Möglichkeiten und die relativen Fragmentkonzentrationen bestimmen die bevorzugte *Annealing*-Möglichkeit bei einer bestimmten Temperatur. Das bedeutet, bei hohen Temperaturen werden hauptsächlich Fragmente mit langen Überlappungsbereichen hybridisieren, die exakt zueinander passen. Wird die Temperatur gesenkt, wird die Schmelztemperatur für Fragmente mit sukzessive kürzeren Überlappungsbereichen oder für Fragmente mit ein bis zwei *Mismatch*-Positionen erreicht und die Selektivität der *Annealing*-Möglichkeiten wird ausgeglichener. Zum einen folgt daraus: Eine niedrige *Annealing*-Temperatur erleichtert die Hybridisierung von Fragmenten verschiedener Eltern Gene. Zum anderen erleichtert eine niedrige *Annealing*-Temperatur auch unspezifische Hybridisierungen nicht homologer DNA-Fragmente und somit die Bildung unspezifischer Nebenprodukte. Es empfiehlt sich daher, die *Annealing*-Temperatur oberhalb von 55 °C zu variieren, um die Bildung unspezifischer Produkte zu untersuchen.

Die Verwendung von vergleichsweise weniger Fragment-DNA führte zur vermehrten Bildung des spezifischen Reassemblierungsproduktes. Deshalb sollte die DNA-Menge in jedem Reassemblierungsexperiment variiert werden. Besonders wichtig war auch die Zyklenzahl. Nach nur 30 Zyklen konnte mit einer Kontroll-PCR außer in zwei Proben kein Reassemblierungsprodukt amplifiziert werden. Das Zielfragment konnte jedoch in allen Proben, die 50 Zyklen mit dem *Taq/Exo*-Gemisch reassembliert wurden, amplifiziert werden. Für künftige Reassemblierungsexperimente sollten deshalb ebenfalls mindesten 50 Zyklen verwendet werden. Außerdem zeigte sich in beiden Reassemblierungsexperimenten, dass die in der PCR zur Amplifizierung der Reassemblierungsprodukte eingesetzte *Template*-Menge die Produktausbeute der erwarteten Größe nicht proportional beeinflusste. Demnach sollte auch die *Template*-Menge stets optimiert werden.

Der Erfolg der Reassemblierungsreaktion und die Qualität der Reassemblierungsprodukte hängen maßgeblich von der Länge der Fragmente sowie der Anzahl der zur Fragmentsynthese verwendeten Primer und ihren Bindungsstellen ab. Diese Faktoren können zu Optimierungszwecken variiert werden (siehe Abschnitt 9.1).

9.6. Rekombination von *ciap* und *hpap*

Als Modell für die *Walk Through* Rekombination homologer DNA-Sequenzen wurden die Gene von zwei alkalischen Phosphatasen aus dem Kälberdarm (*ciap*) und aus humaner Plazenta (*hpap*) gewählt. Die Sequenzidentität beider Gene beträgt 81 %. Die minimal für Reassemblierungsexperimente erforderliche Sequenzidentität beträgt 70 % (SIEBER ET AL., 2001). Für die Reassemblierung der 1650 bp langen DNA-Sequenzen wurden Fragmente von

durchschnittlich 100 bis 300 Nukleotide Länge verwendet, die je Gen mit Hilfe von sechs Primern hergestellt worden sind. Die Bindungsstellen der Primer für die Fragmentsynthese wurden anhand der zu erwartenden Fragmentlänge und hinsichtlich guter Primerbindungseigenschaften gewählt. Um die spätere Amplifizierung und Klonierung der Reassemblierungsprodukte zu erleichtern, wurde ein gemeinsames Primerpaar für beide Gene gewählt, das innerhalb der Plasmidsequenz bindet und geeignete Restriktionsschnittstellen einschließt. Die innerhalb der Gensequenzen bindenden Primer besitzen relativ zueinander versetzte Bindungsstellen in *ciap* und *hpap*. Dadurch wird der Überlappungsbereich für hybridisierende Fragmente verschiedener Elterngene erweitert und somit die Durchmischung der Elterngensequenzen gefördert.

9.7. Sequenzdatenanalyse

Insgesamt 13 Klone, die mittels *Walk Through* Rekombination der zwei Elterngene *ciap* und *hpap* entstanden sind, wurden sequenziert und analysiert. Alle analysierten DNA-Moleküle besaßen chimäre Sequenzen, das heißt, es gab keinen Hintergrund mit nicht rekombinierten Elterngenen. Die Rekombinationsereignisse waren über die gesamte Gensequenz verteilt. Es gab keine auffällige Häufung von Rekombinationen in Primernähe, wie die Art der Fragmentsynthese mit der Wahl der Primerbindungsstellen hätten vermuten lassen.

Der Abstand zwischen den Rekombinationsereignissen war sehr klein, wobei sich der kleinste Abstand nicht genau feststellen lässt, da einerseits der genaue Ort der Rekombination in einem Bereich vollständiger Sequenzidentität nicht zu ermitteln ist und andererseits in einigen Fällen nicht klar ist, ob Rekombination oder Punktmutation stattgefunden haben (Abschnitt 7.7). Im besten Beispiel für zwei dicht beieinander liegende Rekombinationsereignisse, die nicht auch auf Punktmutationen zurückzuführen wären, beträgt der Abstand eine nicht zu ermittelnde Anzahl an Basenpaaren zwischen vier und 18. Dieses Ergebnis zeigt, dass mit der *Walk Through* Rekombination aufgrund der kürzeren Rekombinationsabstände eine hohe Variabilität der entstehenden chimären Moleküle erzeugt werden kann oder mit anderen Worten, ein größerer Bereich des „Sequenzraumes“ erreicht werden kann. Diese Vielfalt der Chimären wiederum ermöglicht eine große Vielfalt der Eigenschaften der codierten Proteine. Diese minimalen Rekombinationsabstände in der *Walk Through* Rekombination werden durch die Art bzw. hohe Vielfalt der verwendeten Fragmente (siehe auch Abschnitt 7.2) ermöglicht.

Da in einigen Fällen nicht klar ist, ob Rekombinationen oder Punktmutationen vorliegen, wurde für die Bewertung der *Walk Through* Rekombination einmal unter Annahme der

Punktmutationen und ein zweites Mal unter Annahme von Rekombinationsereignissen gezählt. Die tatsächliche Anzahl an Rekombinationsereignissen oder Punktmutationen wird vermutlich zwischen beiden ermittelten Werten liegen. Gerade vor dem Hintergrund, dass die Rate an Spontanmutationen in den Reassemblierungsprodukten mit durchschnittlich 2,8 bis 3,2 je kbp recht hoch ist, erscheint das Auftreten von Punktmutationen anstelle von Rekombinationen in den betrachteten Fällen als sehr wahrscheinlich. Andererseits lässt die Art der Basenaustausche nicht immer auf Spontanmutationen schließen. Denn unter Standardbedingungen werden von der *Taq*-Polymerase bevorzugt Transitionen, das heißt A-T ↔ G-C-Austausche eingeführt. In vier der acht ungeklärten Fälle wurden jedoch Transversionen (A-T ↔ C-G- Austausch oder C-G ↔ G-C- Austausch) beobachtet, die nur sehr selten durch die *Taq*-Polymerase eingeführt werden (SHAFIKHANI ET AL., 1997). Die einzige Möglichkeit zur Aufklärung dieser Fragestellung wäre, die gesamte Rekombination unter weniger mutagenen Bedingungen durchzuführen und somit den Hintergrund an Spontanmutationen zu reduzieren. Die Reduzierung der Mutationsrate ist auch unter einem zweiten Aspekt erstrebenswert: Die meisten Aminosäureaustausche sind, statistisch betrachtet, schädlich für die Struktur oder Funktion des Proteins (STEIPE, 1999). Das heißt, mit zunehmender Mutationsanzahl wird die Anzahl aktiver Klone reduziert. Es wäre deshalb vorteilhaft, die Mutationsrate soweit wie möglich zu reduzieren und nur bei Bedarf kontrolliert zu erhöhen.

Die hohe Mutationsrate von 2,8 - 3,2 je kbp lässt sich folgendermaßen erklären. Für die Durchführung der *Walk Through* Rekombination wurden drei PCR-Reaktionen mit der *Taq*-Polymerase durchgeführt. Die Präparation der U-DNA geschah in zwei aufeinander folgenden PCRs. Abschließend erfolgte die Amplifizierung der Reassemblierungsprodukte mit Hilfe der *Taq*-Polymerase. Da die *Taq*-Polymerase eine hohe Fehlerrate von 1/9000 je polymerisiertes Nukleotid besitzt (TINDALL & Kunkel, 1988), akkumuliert sich im Verlauf der vielen Zyklen (hier insgesamt ca. 90 Zyklen) die Fehlerrate auf theoretisch zehn Fehler je kbp. Durch Verwendung alternativer Polymerasen mit niedrigeren Fehlerraten lässt sich vermutlich die Anzahl der Mutationen senken. So kann für die abschließende Amplifizierung die *Pfu*-Polymerase verwendet werden, welche im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase über die Fähigkeit zur Fehlerkorrektur verfügt und deshalb sechs bis 100-fach weniger Fehler einbaut (HOGREFE ET AL., 2002). Zur Präparation der U-DNA ist die *Pfu*-Polymerase jedoch nicht geeignet, da diese Uracil-haltige DNA nicht amplifizieren kann (SLUPPHAUG ET AL., 1993). Für die U-DNA-Präparation könnte man alternativ das *Taq*/Exo-Gemisch verwenden. Hierbei ist die Fehlerrate geringer als bei Verwendung reiner *Taq*-Polymerase (genaue Angaben lagen im Rahmen der Arbeit nicht vor). Zudem kann der zweite PCR-Schritt zur U-DNA-Synthese

ausgelassen werden und somit die gesamte Zyklenanzahl um 30 Zyklen reduziert werden. Dieser zweite PCR-Schritt wurde zur Sicherheit durchgeführt, um Uracil-freie Eltern-DNA restlos zu entfernen. Da die Reinheit der U-DNA-Präparation mittels UNG-Verdau und einer Test-PCR (siehe Abschnitt 7.3) bestätigt werden kann, ist diese zusätzliche PCR-Reaktion nicht nötig.

Die Rekombinationsfrequenz (2,5 – 3,5 Rekombinationen je kbp) kann ebenfalls optimiert werden. Einige Ansätze zur Optimierung der Rekombinationsfrequenz wurden in den vorangegangenen Abschnitten (siehe Fragmentsynthese im Abschnitt 9.1 und Reassemblierung im Abschnitt 9.5) bereits diskutiert. Sie umfassen im wesentlichen die Fragmentlänge, die Primerwahl, die Primeranzahl und die Reassemblierungsbedingungen. Möglicherweise kann die Variabilität der Fragmente auch durch Verwendung von zufälligen Primersequenzen (Hexameren) erhöht werden. Sofern nur zwei Elterngene rekombiniert werden sollen, kann die Rekombinationsfrequenz erhöht werden, indem von einem Elterngen nur Fragmente in *Sense*-Orientierung und von dem anderen Elterngen nur Fragmente in *Antisense*-Orientierung synthetisiert werden. Die Reassemblierung dieser Fragmente kann nur erfolgen, wenn zumindest im ersten Zyklus der Reassemblierungsreaktion zwei Fragmente unterschiedlicher „Herkunft“ miteinander hybridisieren.

Werden mehrere Elterngene miteinander rekombiniert, ist zu erwarten, dass sich die Rekombinationsfrequenz in Folge einer synergistischen Reassemblierung weiter erhöht (MOORE ET AL., 2001). Dies wurde in *Family-Shuffling*-Experimenten beobachtet und mit *in silico*-Fallstudien mit 12 Subtilasen berechnet.

Bei der Analyse der Sequenzdaten wurde ein hoher Anteil an Deletionen gezählt, so dass sieben der 13 Klone nicht für ein funktionsfähiges Protein codieren könnten. Ob das häufige Auftreten von Deletionen auf die Rekombinationsmethode zurückzuführen ist, kann bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Möglicherweise lassen sie sich zum Teil mit der wiederholten Verwendung der *Taq*-Polymerase erklären. Es ist bekannt, dass diese Polymerase Rasterschubmutationen (mit einer Rate von 1/41000, TINDALL & Kunkel, 1988) einführt. Zur Aufklärung dieses Problems müsste die *Walk Through* Rekombination, wie bereits oben beschrieben, unter weitgehendem Ausschluss der *Taq*-Polymerase wiederholt werden.

Am 3'-Ende der klonierten DNA-Sequenzen wurden Primerkonkatemere bemerkt. Da diese wiederholten Primersequenzen nicht am 5'-Ende beobachtet werden konnten, wird davon ausgegangen, dass es sich um ein Sequenz-spezifisches Problem handelt. Klarheit zu dieser

Fragestellung sollte die Wiederholung der *Walk Through* Rekombination mit einem alternativen DNA-*Template* schaffen. Somit ließe sich ebenfalls feststellen, ob die beschriebenen Schwierigkeiten bei der Klonierung (Abschnitt 7.7) auf die Existenz der Primerkonkatemere zurückzuführen sind.

9.8. Vergleich der Rekombinationsmethoden

Die Ergebnisse der *Walk Through* Rekombination wurden bezüglich der drei charakteristischen Eigenschaften (1) durchschnittliche Mutationsrate, (2) Rekombinationseffizienz (Anteil chimärer Sequenzen am Rekombinationsprodukt) und (3) Rekombinationsfrequenz (Anzahl der Rekombinationsereignisse) mit den bisher verfügbaren Methoden zur homologen *in vitro* Rekombination verglichen (Tabelle 9). Die zu den Methoden publizierten Zahlen wurden jeweils auf die Anzahl der betrachteten Ereignisse je Kilobasenpaar (kbp) umgerechnet. Wenn die Anzahl der Ereignisse von den Autoren nicht erwähnt wurde, aber anhand der abgebildeten Sequenzen ersichtlich waren, wurden sie gezählt.

Ein direkter Vergleich der verschiedenen Methoden ist auf Grundlage der zusammengetragenen Daten nicht möglich, da die Methoden an verschiedenen Beispielen mit jeweils unterschiedlichen Homologien durchgeführt wurden. Werden homologe Sequenzen mit niedrigerer Sequenzidentität rekombiniert, sind weniger Rekombinationsereignisse zu erwarten, da die *Annealing*-Reaktion dieser Fragmente erschwert wird. Bei der Rekombination homologer Sequenzen mit sehr hoher Sequenzidentität lassen sich andererseits einige Rekombinationsereignisse nicht detektieren (stille Rekombinationen), da keine Sequenzunterschiede als Marker vorhanden sind. Bei dem Vergleich spielt außerdem eine Rolle, ob die analysierten Klone zufällig oder aber im Anschluss an eine Selektion auf ihre biologische Aktivität ausgewählt wurden. Wurde auf biologische Aktivität selektioniert, konnten unter Umständen die aktiven Elterngene im Vergleich zu den rekombinierten Klonen angereichert werden. Aus diesen Gründen lassen die Daten der Tabelle 9 nur einen groben Vergleich der Methoden zu. Für einen direkten Vergleich müssten die verschiedenen Methoden mit der gleichen Modell-DNA durchgeführt werden. In Tabelle 9 wurden daher zusätzlich zu den Ergebnissen der Rekombination sowohl die Größe der Elterngene, die prozentuale Sequenzidentität und die Anzahl der analysierten chimären Klone aufgelistet. Sofern sich die Elterngene nur an einigen Positionen unterschieden, wurde die Anzahl dieser „Marker“ anstelle von prozentualen Sequenzidentitäten verwendet.

Tabelle 9 enthält die Ergebnisse für DNA-Shuffling, *Random Priming* Rekombination, *Staggered Extension* Prozess, Heteroduplex Formation, und RACHITT. Diese Methoden wurden bereits in der Einleitung (Abschnitt 5.12) ausführlich vorgestellt. Darüber hinaus enthält die Tabelle die Ergebnisse von drei Varianten des DNA-Shufflings, die der Optimierung der Mutationsrate und der Rekombinationseffizienz dienen. Diese Varianten sollen zunächst erläutert werden. Mit dem sogenannten *High Fidelity Shuffling* (ZHAO & ARNOLD, 1997) wurde die Rate an Spontanmutationen von vorher sieben Mutationen je kbp (STEMMER, 1994) auf 0,5 Mutationen je kbp reduziert. Dies erfolgte unter Verwendung von Plasmid-DNA anstelle von PCR-Produkt als Ausgangs-DNA und durch Benutzung von *Pfu*-Polymerase für die Reassemblierung und Amplifizierung. Die beiden anderen Weiterentwicklungen des *DNA-Shufflings* dienen dazu, den Anteil chimärer Reassemblierungsprodukte zu erhöhen (KIKUCHI ET AL., 1999 UND 2000). Diese Arbeitsgruppe beschreibt, mit dem klassischen *DNA-Shuffling* von W. Stemmer weniger als 1 % chimäre Gene erhalten zu haben. Die Gruppe optimierte diese Rate auf 100 % durch die Verwendung von Restriktionsenzymen anstelle der DNase bzw. auf 14 % durch die Verwendung von einzelsträngiger *Template*-DNA. Durch die Verwendung der Restriktionsenzyme konnte die Zahl chimärer Reassemblierungsprodukte stark erhöht werden. Allerdings erfolgt auf diese Weise keine zufällige Fragmentierung der Eltern-DNA. Die Erhöhung des Anteils chimärer Gene durch Verwendung einzelsträngiger DNA beruht auf dem Gebrauch von einzelsträngiger DNA des einen Elterngens und einzelsträngiger DNA des komplementären Strangs des anderen Elterngens (asymmetrische Fragmentleiten).

Ein Vergleich aller Methoden zeigt, dass sie sich mit 2,1 – 4,7 Rekombinationsereignissen je kbp (mit Ausnahme der RACHITT-Methode) hinsichtlich der Rekombinationsfrequenz nicht beträchtlich unterscheiden. Die RACHITT-Methode ermöglicht sehr hohe Rekombinationsfrequenzen von 11,2 je kbp (Coco et al., 2001; WO 01/29211; WO 01/29212).

Die meisten Methoden weisen im Vergleich zur *Walk Through* Rekombination niedrigere Raten an Spontanmutationen auf. Wie schon in Abschnitt 9.7 erläutert, ist das mit der wiederholten Verwendung der *Taq*-Polymerase zu erklären und kann optimiert werden. Mit den meisten der aufgeführten Methoden ist es möglich, 100 % Rekombinationseffizienz zu erreichen.

Obwohl aus oben genannten Gründen ein Vergleich der Rekombinationsmethoden auf Grundlage der zusammengetragenen Daten nur unter Vorbehalten möglich ist, zeigt sich, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *Walk Through* Rekombination eine vergleichbar

leistungsstarke Methode hinsichtlich der Anzahl der chimären Rekombinationsprodukte (Rekombinationseffizienz) und der Anzahl der Rekombinationsereignisse (Rekombinationsfrequenz) darstellt. Darüber hinaus besitzt die *Walk Through* Rekombination zwei besondere Stärken: ein geringer Abstand zwischen zwei Rekombinationsereignissen und eine einfache technische Durchführbarkeit. Es ist auch zu erwarten, dass durch die Vielfalt der DNA-Fragmente unabhängig vom Nukleotid am 3'-Ende des Fragmentes eine sehr gleichmäßige Verteilung der Rekombinationsereignisse ermöglicht wird. Dies kann anhand der Sequenzen nur bedingt überprüft werden, da der genaue Ort des Rekombinationsereignisses nicht bestimmt werden kann (siehe Abschnitt 7.7). Derzeitiger Schwachpunkte ist die hohe Mutationsrate, die vermutlich durch weitgehende Vermeidung der *Taq*-Polymerase in der *Walk Through* Rekombination gesenkt werden kann.

9. Diskussion zur *Walk Through* Rekombination

Tabelle 9 Vergleich von Methoden der homologen Rekombination mit der *Walk Through* Rekombination

In Spalte 1 wurden jeweils die Methode mit ihrer Referenz und das Beispiel-Gen aufgeführt. In Spalte 2 wurden zur Evaluierung der Ergebnisse die Größe der Elterngene, ihre prozentuale Sequenzidentität und die Anzahl der analysierten chimären Klone aufgelistet. Die Spalten 3-5 zeigen die Ergebnisse der Rekombination hinsichtlich der Mutationsrate, Rekombinationseffizienz (Anteil chimärer Gene im Rekombinationsprodukt) und die Rekombinationsfrequenz (Anzahl der Rekombinationsereignisse).

Methode Referenz Gen	Größe Sequenz-Identität Anzahl chimärer Klone	Punktmutationen (je kbp)	Rek.-Effizienz (% chimäre Gene)	Rek.-Frequenz (durchschnittl./höchste Rek.-Anzahl je kbp)
DNA-Shuffling Stemmer, 1994 ^{b)} LacZ α	1 kb 2 Marker n=386 (aktiv)	7	24% (von möglichen 25 %)	n.b. / n.b.
Interleukin 1 β (<i>Annealing</i> bei niedriger Temperatur)	0,5 kb 76 % n=9 (ohne Selektion)	n.b.	n.b.	4 / n.b.
High Fidelity - Shuffling Zhao & Arnold, 1997 Subtilisin E	1 kb 10 Marker n=9 (ohne Selektion)	0.5	90 %	2,4 / 6
DNA-Shuffling , (Restriktionsenzyme) Kikuchi et al., 1999 Catechol-Dioxygenase	0,9 kb 84 % n=10 (aktiv)	0.3	100 %	4,7 / 6.5
DNA-Shuffling (ssDNA) Kikuchi et al., 2000 Catechol-Dioxygenase	0,9 kb 84 % n=7 (aktiv)	0.5	14 %	3,4 / 6.5
Random Priming Rekombination Shao et al., 1998 Subtilisin E	1 kb 10 Marker n=10 (ohne Selektion)	1.8	100 %	4.0 / 6.0
Staggered Extension Prozess (StEP) Zhao et al., 1998 Subtilisin E	1 kb 10 Marker n=10 (ohne Selektion)	0.6	100 %	2,1 / 4.0
Heteroduplex Formation Volkov et al., 1999 GFP	- 2 Marker -	n.b.	60 %	n.b. / n.b.
RACHITT Coco et al., 2001 Monoxygenase	1,3 kb 90 % n=22 (ohne Selektion)	0.9	100 %	11,2 / n.b.
Walk Through Rekombination diese Arbeit Alkalische Phosphatase	1,5 81 % n=13 (ohne Selektion)	2.8 – 3.2	100 %	2.7 - 3,5 / 4.8 – 7.3

Vergl

10. Diskussion zur Creatinase

Die Creatinase aus *Erwinia sp.* wurde hinsichtlich ihrer thermischen Stabilität optimiert. Der apparente Schmelzpunkt $T_{M(\text{App})}$ konnte von 58 °C auf 66 °C erhöht werden. Die enzymatische Effizienz der finalen Mutante CTsd7, ausgedrückt als k_{cat}/K_M -Wert, wurde trotz Stabilisierung beibehalten.

10.1. Optimierung der Creatinase mittels Mutagenese

Die Optimierung erfolgte durch eine Kombination aus zwei Runden fehlerhafter PCR mit anschließendem *Screening* sowie Sättigungsmutagenesen (Permutation der Aminosäuren an einer Position) an den identifizierten Positionen:

(1) Mutanten CT1m7 und CT1m24:

In der ersten Mutantengeneration wurden zwei Mutanten mit je einem Aminosäureaustausch (CT1m7: F59Y; CT1m24: N130D) identifiziert, die zu einer Erhöhung der thermischen Stabilität um je 1 °C führten. Eine der beiden Mutanten, CT1m24, wurde aufgrund ihrer erhöhten enzymatischen Effizienz und ihrer verminderten Aggregationsneigung für eine weitere Runde fehlerhafter PCR mit anschließendem *Screening* ausgewählt.

(2) Mutanten CT2m9 und CT2m10:

In der zweiten Mutantengeneration wurden wiederum zwei Mutanten mit je einem Aminosäureaustausch (CT2m9: M203V; CT2m10: F395L) identifiziert, die zum einen eine weitere thermische Stabilisierung (CT2m9: $\Delta T_{M(\text{App})} = 4$ °C) und zum anderen eine Erhöhung der enzymatischen Effizienz bewirkten.

(3) Mutante CTsd2:

Die Kombination der Aminosäureaustausche der zweiten Mutantengeneration (M203V und F395L) mit Mutation N130D aus CT1m24 führte zur Kombination der Eigenschaften der Eltern in der resultierenden Creatinase CTsd2.

(4) Mutante Ctsd7:

Die Permutation der Aminosäure-Position 59 an Mutante CT1m24 führte zur deutlichen Erhöhung des apparenten Schmelzpunktes $T_{M(\text{App})}$ um 4 °C. Die Kombination aller vier Aminosäurepositionen, einschließlich der „permutierten“ Aminosäure, führte zu Mutante CTsd7. Die Mutante vereinte alle Eigenschaften ihrer Eltern in sich. Im Vergleich zum

Wildtyp besitzt sie einen um 8 °C höheren apparenten Schmelzpunkt $T_{M(App)}$ und die enzymatische Effizienz konnte „wiederhergestellt“ werden.

Die Zufallsmutagenese mittels fehlerhafter PCR hat sich im Falle der Creatinase aus *Erwinia sp.* als geeignete Methode zur Stabilisierung erwiesen. Das war aufgrund von bereits vorliegender wissenschaftlicher Untersuchungen zu erwarten gewesen. Die Zufallsmutagenese ist nämlich zur Lösung (ausschließlich) solcher Probleme geeignet, bei denen Mutationen in mehreren iterativen Runden identifiziert und additiv miteinander kombiniert werden können, z.B. wenn Stabilitäten oder Aktivitäten von Enzymen erhöht werden sollen (DANNERT, 2001). Würde allerdings zur Etablierung neuer Proteinfunktionen die gleichzeitige Einführung mehrerer Mutationen benötigt werden, ist diese Art der Zufallsmutagenese nicht mehr ausreichend und müsste durch effizientere Methoden wie die homologe *in vitro* Rekombination ersetzt werden (DANNERT, 2001, siehe Abschnitt 5.5 ff).

Die thermostabilisierenden Effekte bei der Creatinase aus *Erwinia sp.* wurden durch voneinander unabhängige und beinahe additiv wirkende Mutationen (F59W, N130D, und M293V) hervorgerufen. Auch anhand anderer Beispiele in der Literatur wurde beschrieben, dass die Erhöhung der thermischen Stabilität auf additive Effekte zurückgeführt werden kann (PANTOLIANO ET AL., 1989; WELLS, 1990; SERRANO ET AL., 1993; SCHUMANN ET AL., 1993 B; AKASAKO ET AL., 1995, LEHMANN ET AL., 2002). Da mit dem Einführen von Zufallsmutationen über Einzelbasenaustausche meist nur einander ähnliche Aminosäuren ausgetauscht werden können, wird von MIYAZAKI & ARNOLD (1999, siehe auch Abschnitt 5.9) empfohlen, diese mit einer Sättigungsmutagenese an den betreffenden Positionen zu kombinieren. Tatsächlich konnte im Fall der Creatinase aus *Erwinia sp.* die thermische Stabilität um weitere 4 °C erhöht werden, indem an Aminosäureposition 59 ein Tryptophan eingebaut wurde. Ein Umbau des ursprünglichen Phenylalanin-Codons (TTC) zum Tryptophan-Codon (TGG) wäre mit einem Einzelbasenaustausch nicht möglich gewesen.

Bei der Optimierung der Creatinase aus *Erwinia sp.* wurde ein weiteres in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenes Prinzip angewendet: Da selten durch einen einzelnen Aminosäureaustausch mehrere Eigenschaften gleichzeitig verändert werden können, ist es effektiver, diese Eigenschaften separat zu optimieren und in einem zweiten, Schritt zu kombinieren (KUCHNER & ARNOLD, 1997). Auf diese Weise wurden z.B. aus der zweiten Mutantengeneration zwei Mutanten CT2m9 und CT2m10 isoliert, die jeweils eine veränderte Eigenschaft (thermische Stabilität oder enzymatische Effizienz) besaßen. Diese Eigenschaften wurden anschließend in Mutante CTsd2 erfolgreich miteinander kombiniert.

Die Stabilisierung der Creatinase aus *Erwinia sp.* ist ein weiteres Beispiel dafür, dass die Thermostabilisierung eines Enzyms ohne Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität bei niedrigen Temperaturen erfolgen konnte. Das ist insofern bemerkenswert, da bis vor kurzem noch diskutiert wurde, ob erhöhte Stabilität immer auf Kosten der Flexibilität eines Enzyms, und somit auch auf Kosten der enzymatischen Aktivität erfolgen würde. Da die Aktivitäten thermophiler Enzyme bei niedrigen Temperaturen im Vergleich zu ihren mesophilen oder psychrophilen Homologen beeinträchtigt sind (WRBA ET AL., 1990; MEIERING ET AL., 1992; SHOICHET ET AL., 1995), wurde zunächst angenommen, dass Enzyme nicht gleichzeitig thermostabil und bei niedrigen Temperaturen hoch aktiv sein können. Dies wurde erwartet unter der Annahme, dass thermische Stabilität und Katalyse einander ausschließende Ansprüche an die Flexibilität eines Enzyms stellen. GIVER und Kollegen (1998) bzw. MIYAZAKI und Kollegen (2000) entwickelten jedoch Enzyme (p-Nitrobenzyl-Esterase bzw. Subtilisin) unter Verwendung evolutionärer Methoden, die höhere thermische Stabilitäten ($\Delta T_{M(\text{App})} = 20\text{ °C}$ bzw. 14 °C) und vergleichbar oder sogar erhöhte katalytische Aktivitäten bei niedrigen Temperaturen aufwiesen. Beide Arbeitsgruppen folgerten daraus: Die Tatsache, dass Enzyme mit beiden Eigenschaften in der Natur nicht gefunden wurden, hat seine Ursache nicht in der physikalischen Chemie räumlicher Proteinstrukturen, sondern liegt darin begründet, dass von der Natur einfach nie Selektionsdruck auf beide Eigenschaften gleichzeitig ausgeübt wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Erkenntnisse.

Im Labor können beide Eigenschaften im selben Enzym optimiert werden, sofern entsprechender Selektionsdruck angewendet wird. Dies geschieht gemäß dem ersten Gesetz der Zufallsmutagenese: „*You get what you screen for*“ (YOU & ARNOLD, 1996). Die Strenge dieses Gesetzes war auch am Beispiel der Creatinase aus *Erwinia sp.* zu beobachten. In der ersten *Screening*-Runde mit der Creatinase aus *Erwinia sp.* wurde zunächst nur auf thermische Stabilität selektioniert. Die identifizierten Mutanten verfügten über erhöhte thermische Stabilität. Dies bewirkte allerdings eine Verminderung der enzymatischen Effizienz (siehe Abschnitt 8.1.1). Durch das Anlegen beider Selektionskriterien (thermische Stabilität und Aktivität, bzw. K_M) in der zweiten *Screening*-Runde konnten beide Eigenschaften gleichzeitig optimiert werden (siehe Abschnitt 8.1.2).

Mit nur vier Aminosäureaustauschen konnte die Creatinase aus *Erwinia sp.* um 8 °C ($T_{M(\text{App})}$) stabilisiert werden, womit die Aussage von MIYAZAKI ET AL (2000) unterstützt werden kann: Enzyme können unter starkem Selektionsdruck sehr schnell an veränderte Umweltbedingungen adaptieren. Von dieser Arbeitsgruppe wurde am Beispiel des

psychrophilen Subtilisin S41 der Schmelzpunkt mit nur sieben Aminosäureaustauschen, die in drei Runden fehlerhafter PCR oder homologer *in vitro* Rekombination und nachfolgendem *Screening*, identifiziert wurden, um 20 °C erhöht. Der erhöhte Schmelzpunkt des Enzyms entspricht der thermischen Stabilität seines thermophilen Homologs. Das war möglich, obwohl sich die Aminosäure-Sequenzen des thermophilen Subtilisin im Gegensatz zum optimierten Subtilisin in immerhin 85 Positionen vom psychrophilen Subtilisin unterscheiden. Die im Labor eingeführten Mutationen entsprechen hauptsächlich nicht denen, die das psychrophile Enzym von seinem thermophilen Homolog unterscheidet. Diese wissenschaftliche Arbeitsgruppe vermutet als Ursache, dass einerseits viele verschiedene Sequenzlösungen für das Stabilisierungsproblem existieren. Andererseits entspricht der von der Natur auferlegte Selektionsdruck nicht dem in den Evolutionsexperimenten im Labor.

Zur Stabilisierung der Creatinase aus *Erwinia sp.* konnte die Methode der fehlerhaften PCR erfolgreich angewendet werden. Sofern verfügbar, können zur Lösung dieses Problems auch andere Mutagenese-Methoden verwendet werden. Zum einen empfiehlt sich eine der Methoden zur homologen *in vitro* Rekombination (siehe Einleitung) bzw. die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *Walk Through* Rekombination. Zum anderen wäre eine Methode geeignet, die auf dem Ansatz des Konsensus-Konzepts (LEHMANN ET AL., 2000; LEHMANN ET AL., 2002) beruht. Dieser semirationale Ansatz beruht auf der Hypothese, dass Konsensus-Aminosäuren in einem *Alignment* homologer Proteine mehr zur Stabilität eines Proteins beitragen als Nichtkonsensus-Aminosäuren. Konsequenterweise kann die Stabilisierung eines Proteins dadurch erfolgen, dass Nichtkonsensus-Aminosäuren durch Konsensus-Aminosäuren ausgetauscht werden. Auf diese Weise wurde ein Konsensus-Enzym entwickelt, welches auf 13 Aminosäure-Sequenzen von Wildtyp-Phytasen mesophiler Pilze basiert und eine um 15 – 22 °C höhere Schmelztemperatur als seine Eltern aufwies (LEHMANN ET AL., 2000).

10.2. Isolierung der Creatinase aus *E.coli*

Die Wildtyp-Creatinase und ihre beste Mutante CTsd7 wurden vergleichend charakterisiert, um Hinweise auf die Art der Stabilisierung zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden beide rekombinant exprimierten Proteine isoliert und ihre Identitäten und Homogenitäten bestätigt:

Die Isolierung der rekombinanten *Erwinia sp.*-Creatinase und ihrer Mutanten aus *E. coli*-Kulturen erfolgte in fünf Schritten mit guter Ausbeute von ca. 35 %. Mittels Zellaufschluss, Polyminabtrennung, DEAE-Sepharose, Phenyl-Sepharose und Superdex-200-

Gelfiltrationschromatographie konnten aus 1 l Schüttelkultur z.B. 64 mg Wildtyp-Creatinase isoliert werden. Die Identität und die Homogenität von Wildtyp-Creatinase und Mutante wurden mittels ESI-Massenspektrometrie und N-terminaler Sequenzierung bestätigt (siehe Abschnitt 8.2.2). Mittels analytischer Ultrazentrifugation wurde gezeigt, dass beide Proteine als Homodimer vorliegen (siehe Abschnitt 8.2.2), wie es auch für die Creatinasen aus *Pseudomonas putida* (HÖFFKEN ET AL., 1988; 64 % Sequenzidentität) und aus *Actinobacillus* (PADMANABHAN ET AL., 2002; Sequenzidentität nicht verfügbar) anhand der Daten ihrer Röntgenkristall-Strukturen bekannt ist.

10.3. Vergleich der Wildtyp-Creatinase mit Mutante CTsd7

10.3.1. Aussagen zur Sekundär- und Tertiärstruktur sind sehr begrenzt möglich

Mit spektroskopischen Methoden wurde Wildtyp und Mutante auf eventuelle strukturelle Unterschiede untersucht. Da die Mutante im Vergleich zum Wildtyp über ein zusätzliches stark chromophor und fluorophor wirkendes Tryptophan verfügt, wurden die spektroskopischen Vergleiche eingeschränkt. Sowohl für Nah-UV-CD-Spektroskopie als auch für Fluoreszenzemissions-Spektroskopie galt, dass sich die Spektren der beiden nativ strukturierten Creatinasen voneinander unterschieden. Aussagen zur räumlichen Umgebung der aromatischen Aminosäuren bzw. zu den Tertiärstrukturen sind aufgrund dieser Daten nicht möglich. Um Gewissheit zu erlangen, wären andere nicht auf Spektroskopie beruhende Methoden der Strukturaufklärung nötig. Die Fern-UV-CD-Spektren der nativen Creatinasen konnten innerhalb des experimentellen Fehlers als identisch bewertet werden und lassen somit eine Aussage zu den Sekundärstrukturen zu: Beide Creatinasen besitzen den gleichen Gehalt an Sekundärstruktur-Elementen (siehe Abbildung 23). Der Gehalt an Sekundärstruktur-Elementen kann aufgrund der hohen Sequenzidentität (64 %) zur Creatinase aus *Pseudomonas putida* (HÖFFKEN ET AL., 1988) mit sehr hoher Sicherheit aus der Röntgenkristall-Struktur letzterer übernommen werden. Diese besitzt 37 % α -Helix-Strukturen und 25 % β -Faltblatt-Strukturen. Der hohe α -helikale Gehalt korrespondiert zu der Form der Fern-UV-CD-Spektren der Creatinase aus *Erwinia sp.* mit den zwei charakteristischen Minima bei 222 nm und 209 nm (SCHMID, 1995).

10.3.2. Die Mutante entfaltet unter verzögerter Aggregation

Die Stabilitäten von Wildtyp und Mutante CTsd7 wurden mittels *Differential Scanning-Kalorimetrie* verfolgt (siehe Abbildung 20). Die hierbei untersuchte thermische Entfaltung war ein irreversibler Prozess. Zusätzlich zu den Entfaltungs-Signalen bei 58 °C (CTwt) und 66 °C (CTsd7) wurden schwächere endotherme Signale bei 30 °C bzw. 39 °C detektiert, die

mit dem Auftreten von Aggregationsprozessen zusammenfielen (Messung der Lichtstreuung). Da Aggregationsprozesse wegen ihrer exothermen Natur (WANG, 1999) ein negatives DSC-Signal geben, können die endothermen Signale bei 30 °C bzw. 39 °C nicht auf Aggregation zurückgeführt werden. Wohl aber kann die Aggregation der Grund sein, dass die bei dieser Temperatur ablaufenden Prozesse irreversibel erfolgen. Möglicherweise finden Veränderungen in der Sekundär- oder Tertiär-Struktur statt, wie die Entfaltung von Domänen oder die Dissoziation der Untereinheiten, was vermutlich dazu führt, dass Aminosäuren aus dem hydrophoben Kern zum Lösungsmittel exponiert werden und Aggregation verursacht wird. Aufgrund der Aggregation kann die thermische Entfaltung nicht mit spektroskopischen Methoden untersucht werden, um Hinweise auf konformationelle Änderungen der Proteine in diesem Temperaturbereich zu erhalten.

Da die thermische Denaturierung der Creatinasen irreversibel erfolgt, können keine Rückschlüsse auf ihre thermodynamische Stabilität, sondern nur auf ihre apparente Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung gezogen werden. Aus diesem Grund wurden diese Experimente mit Daten zur thermischen Inaktivierung der Creatinase-Aktivität ergänzt (siehe Abbildung 21). Auch hier zeigte sich, dass die Mutante gegenüber dem Wildtyp um 8 °C stabiler war, wobei die apparenten Mittelpunkte der thermischen Inaktivierung jeweils 1 °C unterhalb der thermischen Entfaltung lagen. Das zeigt, dass der Verlust der Aktivität mit der Entfaltung der Proteinstruktur bei thermischer Denaturierung einhergeht.

Die GdnHCl-induzierte Denaturierung wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie, CD-Spektroskopie und enzymatischer Aktivität verfolgt (siehe Abbildung 26). Hinsichtlich der Abhängigkeit der Fluoreszenz- oder CD-Signale von der GdnHCl-Konzentration konnten für Wildtyp und Mutante keine Unterschiede gefunden werden. Wie anhand der Aktivitäten und der Elliptizitäten bei 225 nm erschlossen werden kann, verlief die GdnHCl-induzierte Entfaltung irreversibel. Der apparente Mittelpunkt der GdnHCl-induzierten Entfaltung beträgt 2,8 M. Im Gegensatz zur thermischen Entfaltung, wo die Inaktivierung und die konformationelle Entfaltung etwa parallel verlaufen, erfolgt in Gegenwart des Denaturierungsmittels GdnHCl die Inaktivierung bei deutlich niedrigeren Konzentration an GdnHCl als die Entfaltung der Proteinstrukturen.

Messungen der Lichtstreuung und UZ-Daten zeigten, dass beide Proteine bei niedrigen GdnHCl-Konzentrationen zur Aggregationsbildung neigten, wobei diese Neigung beim Wildtyp stärker als bei der Mutante ausgeprägt war. Dieser Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante kann möglicherweise zu den bereits betrachteten DSC-Daten korrespondieren,

wobei der Wildtyp schon bei 30 °C, die Mutante erst bei 39 °C DSC-Signale liefert, die der Proteinentfaltung (apparente Schmelztemperatur) vorangehen und mit Aggregationsbildung verbunden sind.

Werden alle Daten zusammen genommen, deutet sich an, dass die Creatinase aus *Erwinia sp.* wie auch ihre Mutante CTsd7 bei thermischer oder GdnHCl-induzierter Denaturierung irreversibel über Bildung von Intermediaten entfaltet, wobei die Bildung der Intermediate bei der Mutante verzögert scheint. Somit sind die Voraussetzungen zur Berechnung von thermodynamischen Größen, nämlich eine vollständig reversibel verlaufende Proteinentfaltung nach dem Zwei-Zustands-Model (STEIPE, 1999), nicht erfüllt. Die Bildung der Intermediate zeigt sich in den DSC-Kurven in den ersten Signalen bei 30 °C bzw. 39 °C, verbunden mit dem Beginn der Aggregation. In den Übergangskurven der GdnHCl-induzierten Entfaltung zeigt die nichtkooperative Änderung des CD-Signals noch vor Änderung des Fluoreszenzsignals, dass die Entfaltung über Intermediate verlief. Detaillierte Aussagen zu diesem Bereich sind aufgrund der Aggregation nicht mittels spektroskopischer Methoden möglich.

Wie die thermische Entfaltung ist die GdnHCl-induzierte Entfaltung mit Aggregation verbunden. Da Aggregation normalerweise durch die Exposition hydrophober Aminosäuren zum wässrigen Lösungsmittel induziert wird, muss den Aggregationsprozessen der Creatinase eine zumindest partielle Entfaltung vorausgegangen sein. Die Aggregationsneigung bei GdnHCl-induzierter Entfaltung ist beim Wildtyp deutlich stärker als bei der Mutante ausgeprägt.

Die Schlussfolgerung wäre, dass die beobachtete Stabilisierung der Mutante im Vergleich zum Wildtyp sich hauptsächlich in ihrer verringerten Aggregationsneigung ausdrückt und diese eventuell die Folge einer verzögerten Intermediatbildung ist. Proteinaggregation resultiert in vielen Fällen aus der intermolekularen Assoziation partiell entfalteter Proteinketten (FIELDS ET AL., 1992) und wird vermutlich durch spezifische Interaktionen bestimmter Konformationen von Proteinintermediaten anstatt durch unspezifische Koaggregation ausgelöst (SPEED ET AL., 1996).

Diese Beobachtungen zeigen Parallelen zur Creatinase aus *Pseudomonas putida*. Die Creatinase aus *Pseudomonas putida* kann wie die Creatinase aus *Erwinia sp.* nach ihrer GdnHCl-induzierten Entfaltung weder hinsichtlich der Aktivität noch hinsichtlich der Proteinstruktur renaturiert werden, besitzt eine ähnlich niedrige intrinsische Stabilität und aggregiert bei niedrigen GdnHCl-Konzentrationen (SCHUMANN ET AL., 1993 A). Im Unterschied zur

Erwinia sp.-Creatinase kann die native Sekundärstruktur der *Pseudomonas putida*-Creatinase vollständig zurück erhalten werden, die Tertiärstruktur jedoch nicht (SCHUMANN ET AL., 1993 A). Die Denaturierungsreaktion der Creatinase aus *Pseudomonas putida* verläuft mindestens zweiphasig mit einer irreversiblen Ausbildung eines Intermediats, welches im zweiten Schritt einen reversiblen Übergang zum entfalteten Protein unterliegt (SCHUMANN & JAENICKE, 1993; SCHUMANN ET AL., 1993). Diese Creatinase wurde hinsichtlich des Effekts ihrer Einzel-, Doppel- und Dreifach-Mutationen auf ihre intrinsische Stabilität untersucht. In allen biphasischen Profilen war die zweite Transitionsschritt der Mutanten identisch zum Wildtyp (SCHUMANN ET AL., 1993 B). Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Stabilisierung sich nur auf den ersten Schritt bezieht, bei welchem die katalytische Aktivität erlischt.

10.3.3. Untersuchung der Modellstruktur von Mutante CTsd7

Die Modellstruktur der Mutante CTsd7 wurde auf Basis der Röntgenkristallstruktur der Creatinase aus *Pseudomonas putida* modelliert. Da zwischen beiden Proteinen eine sehr hohe Sequenzidentität von 64 % herrscht, kann mit sehr hoher Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die Modellstruktur mit guter Genauigkeit der allgemeinen Faltung der realen Struktur von Mutante CTsd7 entspricht. Mittels analytischer Ultrazentrifugation wurde bestätigt (siehe Abschnitt 8.3.4), dass die Darstellung der Modellstruktur von Mutante CTsd7 als Homodimer (siehe Abbildung 27), basierend auf der Röntgenkristall-Struktur der Creatinase aus *Pseudomonas putida*, berechtigt ist.

Die Creatinase aus *Pseudomonas putida* ist ein dimeres Enzym mit einem Molekulargewicht von 97 kDa. Die beiden chemisch identischen Untereinheiten bestehen jeweils aus 404 Aminosäuren. Eine Untereinheit besteht aus zwei Domänen, einer kleinen N-terminalen und einer großen C-terminalen Domäne. Beide Domänen werden aus zentral angeordneten antiparallelen β -Faltblättern gebildet, welche von α -Helices umgeben werden. Die Substratbindungsstelle befindet sich im Zentrum der großen Domäne und wird teilweise durch die kleine Domäne der anderen Untereinheit bedeckt. Das Protein enthält weder intra- noch intermolekulare Disulfidbrückenbindungen (HÖFFKEN ET AL., 1988). Die Domänen sind lose über sechs Wasserstoffbrückenbindungen und eine ionische Wechselwirkung miteinander verbunden. Die beiden Untereinheiten bilden über 20 Wasserstoffbrückenbindungen und vier ionische Wechselwirkungen starke Interaktionen miteinander aus (HÖFFKEN ET AL., 1988). Die Röntgenkristallstruktur der Creatinase aus *Actinobacillus* (Sequenz und Strukturdaten zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht veröffentlicht) ist ebenfalls gelöst und weist die gleiche allgemeine Faltung auf, die der

Creatinase aus *Pseudomonas putida* (PADMANABHAN & HORIKOSHI, 2002; PADMANABHAN ET AL., 2002) entspricht.

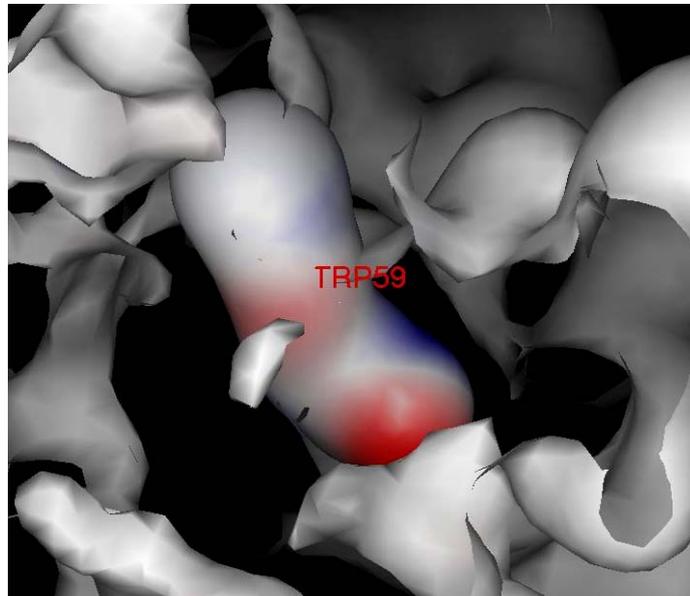


Abbildung 28 Elektronendichte von Aminosäure Tryptophan 59 (Mutation Phe59Trp)
Schematische Darstellung der Elektronendichte von Tryptophan 59 und seiner Umgebung in der Modellstruktur von Creatinase-Mutante CTsd7. Möglicherweise füllt das voluminösere Tryptophan die Kavität an dieser Stelle besser auf als Phenylalanin.

In die Modellstruktur der Mutante CTsd7 wurden die vier Aminosäureaustausche F59W, N130D, M203V und F395L lokalisiert. Mutation F395L bewirkte die erhöhte enzymatische Effizienz. Die drei anderen Mutation führten zur Stabilisierung von CTsd7. Mit Ausnahme der Mutation F395L, die in einer α -Helix lokalisiert ist, befinden sich die Mutationen in ungeordneten Bereichen des Proteins. Die Mutationen stehen weder im direkten Kontakt miteinander noch befinden sie sich an der Kontaktfläche der beiden Untereinheiten oder an der Moleküloberfläche, so dass sich hieraus keine direkten Einflüsse der Mutationen auf die Stabilität der Creatinase ableiten lassen. Die bereits in Abschnitt 10.1 erwähnte Additivität der Effekte der Mutationen korrespondiert zur der Tatsache, dass die Mutationen räumlich nicht im direkten Kontakt miteinander stehen und somit keine synergistischen Wechselwirkungen miteinander eingehen können. Die Mutation F395L, welche eine Erhöhung der enzymatische Effizienz bewirkt, liegt weit entfernt vom aktiven Zentrum, welches an der Kontaktfläche zwischen beiden Untereinheiten lokalisiert ist (HÖFFKEN ET AL., 1988). Dies bedeutet, dass ihr positiver Einfluss auf die enzymatische Effizienz vermutlich nicht direkt mit dem Katalysemechanismus, sondern indirekt über weitreichende Wechselwirkungen erfolgt. Denkbar wäre z.B. eine Erhöhung der strukturellen Flexibilität.

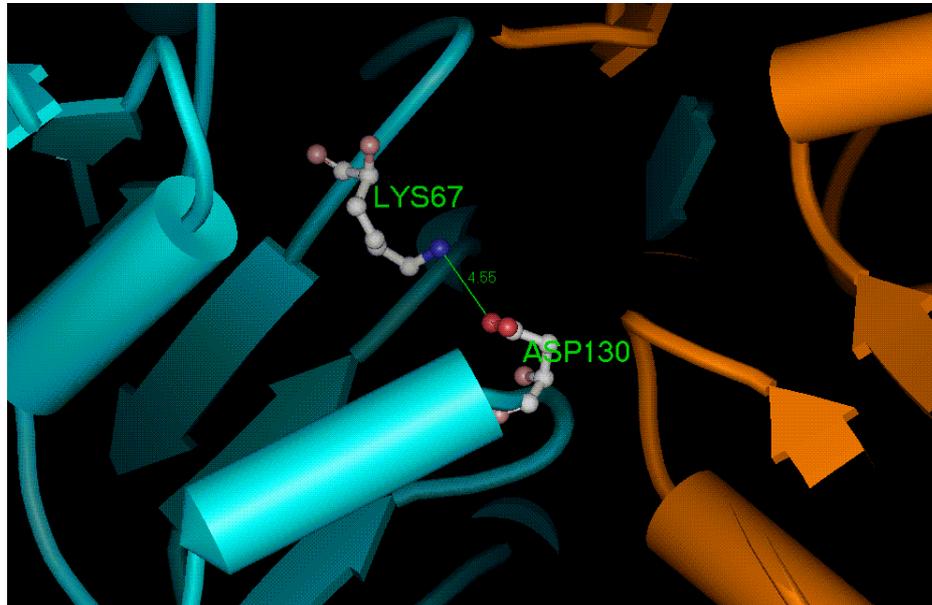


Abbildung 29 Umgebung von Asparagin 130 (Mutation Asn130Asp)
 Schematische Darstellung der Umgebung von Aspartat 130 in der Modellstruktur von Creatinase-Mutante CTsd7. Das saure Aspartat 130 befindet sich in der Nachbarschaft des basischen Lysin 67. Möglicherweise können beide Aminosäuren miteinander elektrostatische Wechselwirkungen eingehen.

Die Erkenntnisse zu den Beziehungen zwischen der dreidimensionalen Proteinstruktur und ihrer Stabilität sind weitaus intensiver erforscht und verstanden als die zwischen Proteinstruktur und Enzymaktivität. So ist bekannt, dass thermische Stabilität auf erhöhte Packungseffizienz (hauptsächlich durch „van der Waals“-Wechselwirkungen), Netzwerke von Ionenpaaren und Wasserstoffbrücken-Bindungen (einschließlich α -Helix-Stabilisierung), Verringerung konformationeller Spannungen (Loop-Stabilisierung) und Resistenz gegen chemische Modifizierungen (JAENICKE & BOEHM, 1998) zurückgeführt werden kann. Die in Mutante CTsd7 eingeführten Aminosäureaustausche sollen deshalb im folgenden genauer betrachtet werden.

Der Ersatz des Phenylalanins durch ein Tryptophan an Position 59 kann mit der deutlichen Stabilisierung der Creatinase um 4 °C assoziiert werden. Wie in Abbildung 28 zu sehen, kann dies eventuell auf die Zunahme des Volumens der Seitenkette von 203,4 Å³ auf 237,6 Å³ (CHOTHIA, 1975) zurückgeführt werden. Diese Aminosäure befindet sich in einer Kavität, die durch das voluminösere Tryptophan besser ausgefüllt werden kann, was möglicherweise zur erhöhten Packungsdichte des Moleküls führt. Der Austausch des Asparagins gegen Aspartat

an Position 130 wird mit einer Stabilisierung des Proteins um 1 °C und eventuell mit Verminderung der Aggregation in Verbindung gebracht. In der Modellstruktur befindet sich dieses Aspartat in räumlicher Nähe zu Lysin 67 (Abbildung 29). Zwischen der Aminogruppe des Lysins und der Carboxylgruppe des Aspartats können eventuell elektrostatische Wechselwirkungen auftreten, die zur Stabilisierung führen. Weiterführende Experimente zu dieser Annahme könnten DSC-Messungen mit einer Einzelmutante bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich zum Wildtyp sein. Der Austausch des Methionin gegen ein Valin an Position 203 führte zur Thermostabilisierung um 4 °C im Vergleich zur elterlichen Mutante. Es wäre möglich, dass das deutlich kleinere Valin (170,8 Å³ vs. 141,7 Å³; CHOTHIA, 1975) die Proteinstruktur etwas zusammendrückt, was erhöhte Packungsdichten zur Folge haben kann. Zur Überprüfung dieser Annahmen wäre die Strukturauflösung von Wildtyp und der Mutante CTsd7 erforderlich, da letztlich nur aus diesen Strukturen korrekte Angaben zur Orientierung und zu Abständen der Aminosäuren zueinander bzw. zu den Positionen von Wassermolekülen getroffen werden können.

11.Literatur

Teile der Arbeit wurden in den Patenten WO2003002736 (Walk-Through technique for in vitro recombination of polynucleotide sequences) und EP 298213 (Variants of an Erwinia-type creatinase) publiziert.

Akasako, A., Haruki, M., Oobatake, M. & Kanaya, S. (1995) High resistance of Escherichia coli ribonuclease HI variant with quintuple thermostabilizing mutations to thermal denaturation, acid denaturation, and proteolytic degradation., *Biochemistry*. 34, 8115-22.

Arnold, F. H. (2001) Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design., *Nature*. 409, 253-7.

Arnold, F. H. (2001) Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design, *Nature*. 409, 253-7.

Beck, R. & Burtscher, H. (1994) Expression of human placental alkaline phosphatase in Escherichia coli., *Protein Expression and Purification*. 5, 192-7.

Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E. M. & Couturier, M. (1994) Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene., *Gene*. 148, 71-4.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA., *Nucleic Acids Research (Online)*. 7, 1513-23.

Boder, E. T., Midelfort, K. S. & Wittrup, K. D. (2000) Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97, 10701-5.

Bohm, G. & Jaenicke, R. (1994) Relevance of sequence statistics for the properties of extremophilic proteins., *International Journal of Peptide and Protein Research*. 43, 97-106.

Cadwell, R. C. & Joyce, G. F. (1994) Mutagenic PCR., *Pcr Methods and Applications*. 3, S136-40.

Chartrain, M., Salmon, P. M., Robinson, D. K. & Buckland, B. C. (2000) Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals., *Current Opinion in Biotechnology*. 11, 209-14.

Chothia, C. (1975) Structural invariants in protein folding., *Nature* 254, 304-308

Coco, W. M., Levinson, W. E., Crist, M. J., Hektor, H. J., Darzins, A., Pienkos, P. T., Squires, C. H. & Monticello, D. J. (2001) DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes., *Nature Biotechnology*. 19, 354-9.

Coll, M., Knof, S. H., Ohga, Y., Messerschmidt, A., Huber, R., Moellering, H., Russmann, L. & Schumacher, G. (1990) Enzymatic mechanism of creatine amidinohydrolase as deduced from crystal structures., *Journal of Molecular Biology*. 214, 597-610.

- Cramer, A., Raillard, S. A., Bermudez, E. & Stemmer, W. P. (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution., *Nature*. 391, 288-91.
- Dagert, M. & Ehrlich, S. D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells., *Gene*. 6, 23-8.
- Demetrius, L. (1997) Selective neutrality and enzyme kinetics, *J Mol Evol*. 45, 370-7.
- Dietmaier, W., Fabry, S. & Schmitt, R. (1993) DISEC-TRISEC: di- and trinucleotide-sticky-end cloning of PCR-amplified DNA., *Nucleic Acids Research (Online)*. 21, 3603-4.
- Dill, K. A. (1990) Dominant forces in protein folding., *Biochemistry*. 29, 7133-55.
- Farinas, E. T., Bulter, T. & Arnold, F. H. (2001) Directed enzyme evolution., *Current Opinion in Biotechnology*. 12, 545-51.
- Fiels, G., Alonso, D., Stigter, D. & Dill, K. (1992) Theory for the aggregation of proteins and copolymers., *J. Phys. Chem*, 96: 3974-3981
- Gershenson, A., Schauerte, J. A., Giver, L. & Arnold, F. H. (2000) Tryptophan phosphorescence study of enzyme flexibility and unfolding in laboratory-evolved thermostable esterases., *Biochemistry*. 39, 4658-65.
- Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P. O. & Arnold, F. H. (1998) Directed evolution of a thermostable esterase., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95, 12809-13.
- Glieder, A., Farinas, E. T. & Arnold, F. H. (2002) Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase., *Nature Biotechnology*. 20, 1135-9.
- Hoeffken, H. W., Knof, S. H., Bartlett, P. A., Huber, R., Moellering, H. & Schumacher, G. (1988) Crystal structure determination, refinement and molecular model of creatine amidinohydrolase from Pseudomonas putida., *Journal of Molecular Biology*. 204, 417-33.
- Hogrefe, H. H., Hansen, C. J., Scott, B. R. & Nielson, K. B. (2002) Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99, 596-601.
- Jaenicke, R. (1991) Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions., *European Journal of Biochemistry*. 202, 715-28.
- Jaenicke, R. & Bohm, G. (1998) The stability of proteins in extreme environments., *Current Opinion in Structural Biology*. 8, 738-48.
- Jaenicke, R., Schurig, H., Beaucamp, N. & Ostendorp, R. (1996) Structure and stability of hyperstable proteins: glycolytic enzymes from hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima., *Advances in Protein Chemistry*. 48, 181-269.

- Kauffman, S. A. & Macready, W. G. (1995) Search strategies for applied molecular evolution, *J Theor Biol*. 173, 427-40.
- Kikuchi, M., Ohnishi, K. & Harayama, S. (1999) Novel family shuffling methods for the in vitro evolution of enzymes., *Gene*. 236, 159-67.
- Kikuchi, M., Ohnishi, K. & Harayama, S. (2000) An effective family shuffling method using Koyama, Y., Kitao, S., Yamamoto_Otake, H., single-stranded DNA., *Gene*. 243, 133-7.
- Koeller, K. M. & Wong, C. H. (2001) Enzymes for chemical synthesis., *Nature*. 409, 232-40.
- Kolkman, J. A. & Stemmer, W. P. (2001) Directed evolution of proteins by exon shuffling., *Nature Biotechnology*. 19, 423-8.
- Kuchner, O. & Arnold, F. H. (1997) Directed evolution of enzyme catalysts., *Trends in Biotechnology*. 15, 523-30.
- Lehmann, M., Kostrewa, D., Wyss, M., Brugger, R., D_Arcy, A., Pasamontes, L. & van_Loon, A. P. (2000) From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase., *Protein Engineering*. 13, 49-57.
- Lehmann, M., Loch, C., Middendorf, A., Studer, D., Lassen, S. F., Pasamontes, L., van_Loon, A. P. & Wyss, M. (2002) The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept., *Protein Engineering*. 15, 403-11.
- Lehmann, M. & Wyss, M. (2001) Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution., *Current Opinion in Biotechnology*. 12, 371-5.
- Lutz, S., Ostermeier, M. & Benkovic, S. J. (2001) Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha-phosphothioate nucleotides., *Nucleic Acids Research (Online)*. 29, E16.
- Mandel, M. & Higa, A. (1992) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. 1970., *Biotechnology (Reading, Mass.)*. 24, 198-201.
- Martinez, A., Lanot, C., Perez, C., Castro, A., Lopez-Serrano, P. & Conde, S. (2000) Lipase-catalysed synthesis of new acetylcholinesterase inhibitors: N-benzylpiperidine aminoacid derivatives, *Bioorg Med Chem*. 8, 731-8.
- Matsuda, Y., Wakamatsu, N., Inouye, Y., Uede, S., Hashimoto, Y., Asano, K. & Nakamura, S. (1986) Purification and characterization of creatine amidinohydrolase of *Alcaligenes* origin. 34, 2155-60.
- May, O., Nguyen, P. T. & Arnold, F. H. (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine., *Nature Biotechnology*. 18, 317-20.

- Meiering, E. M., Serrano, L. & Fersht, A. R. (1992) Effect of active site residues in barnase on activity and stability., *Journal of Molecular Biology*. 225, 585-9.
- Miyazaki, K. & Arnold, F. H. (1999) Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function., *Journal of Molecular Evolution*. 49, 716-20.
- Miyazaki, K., Wintrode, P. L., Grayling, R. A., Rubingh, D. N. & Arnold, F. H. (2000) Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme., *Journal of Molecular Biology*. 297, 1015-26.
- Moore, G. L., Maranas, C. D., Lutz, S. & Benkovic, S. J. (2001) Predicting crossover generation in DNA shuffling., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98, 3226-31.
- Murakami, H., Hohsaka, T. & Sisido, M. (2002) Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs., *Nature Biotechnology*. 20, 76-81.
- Ness, J. E., Welch, M., Giver, L., Bueno, M., Cherry, J. R., Borchert, T. V., Stemmer, W. P. & Minshull, J. (1999) DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin., *Nature Biotechnology*. 17, 893-6.
- Olsen, M., Iverson, B. & Georgiou, G. (2000) High-throughput screening of enzyme libraries., *Current Opinion in Biotechnology*. 11, 331-7.
- Ostermeier, M., Nixon, A. E. & Benkovic, S. J. (1999) Incremental truncation as a strategy in the engineering of novel biocatalysts., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 7, 2139-44.
- Ostermeier, M., Nixon, A. E., Shim, J. H. & Benkovic, S. J. (1999) Combinatorial protein engineering by incremental truncation., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96, 3562-7.
- Ostermeier, M., Shim, J. H. & Benkovic, S. J. (1999) A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology., *Nature Biotechnology*. 17, 1205-9.
- Pace, C. N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves., *Methods in Enzymology*. 131, 266-80.
53. Pace, C. N. (1990) Measuring and increasing protein stability., *Trends in Biotechnology*. 8, 93-8.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein., *Protein Science : a Publication of the Protein Society*. 4, 2411-23.
- Padmanabhan, B. & Horikoshi, M. (2002) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of creatine amidinohydrolase from *Actinobacillus*., *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*. 58, 322-3.

- Padmanabhan, B., Paehler, A. & Horikoshi, M. (2002) Structure of creatine amidinohydrolase from *Actinobacillus*., *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*. 58, 1322-8.
- Pantoliano, M. W., Whitlow, M., Wood, J. F., Dodd, S. W., Hardman, K. D., Rollence, M. L. & Bryan, P. N. (1989) Large increases in general stability for subtilisin BPN' through incremental changes in the free energy of unfolding., *Biochemistry*. 28, 7205-13.
- Pelletier, J. N. (2001) A RACHITT for our toolbox., *Nature Biotechnology*. 19, 314-5.
- Pfeil, W. (1998) Protein stability and folding: A collection of thermodynamic data. *Springer, Berlin, Heidelberg, New York*.
- Privalov, P. L. & Potekhin, S. A. (1986) Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins., *Methods in Enzymology*. 131, 4-51.
- Riley, M. R., Muzzio, F. J. & Reyes, S. C. (1997) Effect of oxygen limitations on monoclonal antibody production by immobilized hybridoma cells, *Biotechnol Prog*. 13, 301-10.
- Rogers, S. G. & Weiss, B. (1980) Exonuclease III of *Escherichia coli* K-12, an AP endonuclease., *Methods in Enzymology*. 65, 201-11.
- Sali, A. & Blundell, T. L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints., *Journal of Molecular Biology*. 234, 779-815.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74, 5463-7.
- Schmidt_Dannert, C. (2001) Directed evolution of single proteins, metabolic pathways, and viruses., *Biochemistry*. 40, 13125-36.
- Schmidt_Dannert, C., Umeno, D. & Arnold, F. H. (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways., *Nature Biotechnology*. 18, 750-3.
- Schumann, J., Bohm, G., Schumacher, G., Rudolph, R. & Jaenicke, R. (1993) Stabilization of creatinase from *Pseudomonas putida* by random mutagenesis., *Protein Science : a Publication of the Protein Society*. 2, 1612-20.
- Schumann, J. & Jaenicke, R. (1993) Creatinase in its collapsed A state shows properties of a molten globule with dimeric quaternary structure., *European Journal of Biochemistry*. 213, 1225-33.
- Schumann, J., Mollering, H. & Jaenicke, R. (1993) Intrinsic stability and extrinsic stabilization of creatinase from *Pseudomonas putida*., *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 374, 427-34.
- Serrano, L., Day, A. G. & Fersht, A. R. (1993) Step-wise mutation of barnase to binase. A procedure for engineering increased stability of proteins and an experimental analysis of the evolution of protein stability., *Journal of Molecular Biology*. 233, 305-12.

- Shafikhani, S., Siegel, R. A., Ferrari, E. & Schellenberger, V. (1997) Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization., *Biotechniques*. 23, 304-10.
- Shao, Z., Zhao, H., Giver, L. & Arnold, F. H. (1998) Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution., *Nucleic Acids Research (Online)*. 26, 681-3.
- Shigekawa, K. & Dower, W. J. (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells., *Biotechniques*. 6, 742-51.
- Shoichet, B. K., Baase, W. A., Kuroki, R. & Matthews, B. W. (1995) A relationship between protein stability and protein function., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 452-6.
- Shuman, S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase., *The Journal of Biological Chemistry*. 269, 32678-84.
- Sieber, V., Martinez, C. A. & Arnold, F. H. (2001) Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences., *Nature Biotechnology*. 19, 456-60.
- Slupphaug, G., Alseth, I., Eftedal, I., Volden, G. & Krokan, H. E. (1993) Low incorporation of dUMP by some thermostable DNA polymerases may limit their use in PCR amplifications., *Analytical Biochemistry*. 211, 164-9.
- Soong, N. W., Nomura, L., Pekrun, K., Reed, M., Sheppard, L., Dawes, G. & Stemmer, W. P. (2000) Molecular breeding of viruses., *Nature Genetics*. 25, 436-9.
- Speed, M.A., Wang, D.I.C., & King, J. (1996) Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition., *Nat. Biotechnol.* 14, 1283-1287
- Steipe, B. (1999) Evolutionary approaches to protein engineering, *Curr Top Microbiol Immunol*. 243, 55-86.
- Stemmer, W. P. (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91, 10747-51.
- Stemmer, W. P. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling., *Nature*. 370, 389-91.
- Stemmer, W. P. (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 10747-51.
- Stoltzfus, A. (1999) On the possibility of constructive neutral evolution., *Journal of Molecular Evolution*. 49, 169-81.

- Suzuki, K., Sagai, H., Sugiyama, M. and Imamura, S. (1993) Molecular cloning and high expression of the Bacillus creatinase gene in Escherichia coli. *J. Ferment. Bioeng.* 76, 77-81
- Suzuki, M. & Nakano, E. (1990) Cloning and expression of the creatinase gene from Flavobacterium sp. U-188 in Escherichia coli. *54*, 1453-7.
- Tindall, K. R. & Kunkel, T. A. (1988) Fidelity of DNA synthesis by the Thermus aquaticus DNA polymerase., *Biochemistry.* 27, 6008-13.
- Tobin, M. B., Gustafsson, C. & Huisman, G. W. (2000) Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design, *Curr Opin Struct Biol.* 10, 421-7.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 76, 615-9.
- Vogt, G., Woell, S. & Argos, P. (1997) Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs., *Journal of Molecular Biology.* 269, 631-43.
- Volkov, A. A., Shao, Z. & Arnold, F. H. (1999) Recombination and chimeragenesis by in vitro heteroduplex formation and in vivo repair., *Nucleic Acids Research (Online).* 27, e18.
- Wang, W. (1999) Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals., *International Journal of Pharmaceutics.* 185, 129-88.
- Wells, J. A. (1990) Additivity of mutational effects in proteins., *Biochemistry.* 29, 8509-17.
- Wrba, A., Schweiger, A., Schultes, V., Jaenicke, R. & Zavodsky, P. (1990) Extremely thermostable D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the eubacterium Thermotoga maritima., *Biochemistry.* 29, 7584-92.
- You, L. & Arnold, F. H. (1996) Directed evolution of subtilisin E in Bacillus subtilis to enhance total activity in aqueous dimethylformamide., *Protein Engineering.* 9, 77-83.
- Zaccolo, M. & Gherardi, E. (1999) The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase., *Journal of Molecular Biology.* 285, 775-83.
- Zhao, H. & Arnold, F. H. (1997) Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination., *Nucleic Acids Research (Online).* 25, 1307-8.
- Zhao, H. & Arnold, F. H. (1999) Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase., *Protein Engineering.* 12, 47-53.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A. & Arnold, F. H. (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination., *Nature Biotechnology.* 16, 258-61.

12.2. Sequenz der Wildtyp-Creatinase

1	ATGACTGACGACATGTTGCACGTGATGAAATGGCACAATGGTGAGAAGGAATATTCCCCC	60
1	<i>M T D D M L H V M K W H N G E K E Y S P</i>	20
61	TTTTCCGATGCCGAGATGACGCGCCGCCAGAGTGACGTGCGGCGCTGGATGGCCGAAAAC	120
21	<i>F S D A E M T R R Q S D V R R W M A E N</i>	40
121	GACGTCGACGCTGCGCTGTTACCTCCTATCATTGCATCAATTACTACTCTGGATTCTCTG	180
41	<i>D V D A A L F T S Y H C I N Y Y S G F L</i>	60
181	TACTGCTATTTTCGGCCGCAAATACGGCATGGTCATCGACCAGGACCATGCCACGACCATC	240
61	<i>Y C Y F G R K Y G M V I D Q D H A T T I</i>	80
241	TCGGCCGGCAGATCGATGGCGGTGAGCCCTGGCGCCGTAGCTTCGGCGACAACATCACCTAT	300
81	<i>S A G I D G G Q P W R R S F G D N I T Y</i>	100
301	ACGGACTGGCGCCGCGACAACCTTCTACCAGGCCGTCCGCCAACTCACCCCGGCGCCAGG	360
101	<i>T D W R R D N F Y Q A V R Q L T P G A R</i>	120
361	CGCATCGGTATCGAGTTCGATCACGTGAACCTTGACTTCGCGCCGACGCTCGAAGAGGCG	420
121	<i>R I G I E F D H V N L D F R R T L E E A</i>	140
421	CTGCCCGCGCTCGAGTTCGTCGATATCGTCAACCGTCGATGTGGATGCGCACGGTCAAG	480
141	<i>L P G V E F V D I G Q P S M W M R T V K</i>	160
481	TCGCTCGAAGAGCAGAAGCTGATCCGCGAGGGTGCCCGTATCTGCGACGTCGGCGGTGCC	540
161	<i>S L E E Q K L I R E G A R I C D V G G A</i>	180
541	GCCTGCGTTGCGCCGTCAAGGCCGCGTTCGCGAGCAGAGGTCGCGATCGCCACAACC	600
181	<i>A C V A A V K A G V P E H E V A I A T T</i>	200
601	AATGCGATGGTCCGCGAGATCGCCAAGTCGTTCCCCTTCGTCGAACTGATGGACACCTGG	660
201	<i>N A M V R E I A K S F P F V E L M D T W</i>	220
661	ACCTGGTTCAGTCGGGCATCAACACCGACGGCGCCACAATCCGGTGACCAACCGCATC	720
221	<i>T W F Q S G I N T D G A H N P V T N R I</i>	240
721	GTGCAATCGGGCGATATCCTGTGCTCAACACGTTCCCGATGATCTTCGGCTACTACACG	780
241	<i>V Q S G D I L S L N T F P M I F G Y Y T</i>	260
781	GCGCTGGAGCGAACGCTGTTCTGCGACCACGTCGACGATGCCAGCCTTGACACCTGGGAG	840
261	<i>A L E R T L F C D H V D D A S L D T W E</i>	280
841	AAGAACGTCGCCGTGCACCGCCGCGCCTCGAACTCATCAAGCCGGGTGCGCGCTGCAAG	900
281	<i>K N V A V H R R G L E L I K P G A R C K</i>	300
901	GATATCGCCATCGAACTCAACGAGATGTACCGGGAGTGGGATCTGCTGAAGTACCGCTCC	960
301	<i>D I A I E L N E M Y R E W D L L K Y R S</i>	320
961	TTCGGCTACGGCCACTCCTTCGGCGTGTCTCCCACTACTACGGCCGCGAGGGGGCGTG	1020
321	<i>F G Y G H S F G V L S H Y Y G R E A G V</i>	340
1021	GAACGTCGCGAGGACATCGATACCGTGTGCGAGCCCGCATGGTGGTCTCCATGGAGCCG	1080
341	<i>E L R E D I D T V L Q P G M V V S M E P</i>	360
1081	ATGGTGATGTTGCCAGAAGGCGCTCCCGCGCGGGCGGCTACCGCGAGCACGACATCCTG	1140
361	<i>M V M L P E G A P G A G G Y R E H D I L</i>	380
1141	ATCGTGGGGGAAGACGGCGCAGAGAACATTACCGGATTCCCCTTCGGGCCTGAGCACAAC	1200
381	<i>I V G E D G A E N I T G F P F G P E H N</i>	400
1201	ATCATCCGCAACTGA	1215
401	<i>I I R N *</i>	405

Abbildung 31

DNA- und Aminosäure-Sequenz der Wildtyp-Creatinase aus *Erwina spec*

Die Darstellung der DNA-Sequenz erfolgte in Standardschrift; die Darstellung der Aminosäure-Sequenz in Kursivschrift.

12.3. Creatinase-Screening

Tabelle 10

Vergleich der Creatinase-Mutanten hinsichtlich enzymatischer Effizienz und Stabilität

Standardabweichungen und -Fehler der Proteinbestimmungen, K_M - und V_{max} -Berechnungen sowie Zwischenergebnisse der für Tabelle 6 (siehe Abschnitt 8.1) zu Grunde liegenden Daten zur Effizienz der Creatinase-Mutanten: ($Protein_{ges}$) Proteinbestimmung vor dem Verdünnen (E_0) Enzymkonzentration im Aktivitätstest, (V_{max}) Maximalgeschwindigkeit, (k_{cat}) Katalysekonstante, (K_M) Michaelis-Menten-Konstante.

Mutante	$Protein_{ges}$				Enzym E_0		V_{max}			k_{cat}	K_M		k_{cat}/K_M
	[mg/ml]	Stabwn	Mittelwert	[mol x l ⁻¹]	Verdünnung [mol x l ⁻¹]	[Delta E/min]	Stfehler	[mol x l x s ⁻¹]	[s ⁻¹]	[mM]	Stfehler	[mMol ⁻¹ x s ⁻¹]	
CTwt	1,66	0,02	1,66	$3,61 \times 10^{-5}$	97	$3,71 \times 10^{-7}$	$5,26 \times 10^{-2}$	$2,12 \times 10^{-4}$	$4,87 \times 10^{-2}$	$1,31 \times 10^5$	4,2	$6,12 \times 10^{-2}$	$3,13 \times 10^4$
CT1m7	1,55	0,01	1,55	$3,37 \times 10^{-5}$	38	$8,91 \times 10^{-7}$	$6,20 \times 10^{-2}$	$3,62 \times 10^{-4}$	$5,47 \times 10^{-2}$	$6,44 \times 10^4$	2,9	$7,11 \times 10^{-2}$	$2,22 \times 10^4$
CT1m24	2,53	0,01	2,53	$5,51 \times 10^{-5}$	190	$2,90 \times 10^{-7}$	$5,63 \times 10^{-2}$	$3,93 \times 10^{-4}$	$5,21 \times 10^{-2}$	$1,80 \times 10^5$	7,4	$1,77 \times 10^{-1}$	$2,43 \times 10^4$
CT2m9	1,73	0,01	1,73	$3,77 \times 10^{-5}$	66	$5,67 \times 10^{-7}$	$5,42 \times 10^{-2}$	$7,70 \times 10^{-5}$	$5,02 \times 10^{-2}$	$8,85 \times 10^4$	6,2	$3,34 \times 10^{-2}$	$1,43 \times 10^4$
CT2m10	1,73	0,01	1,73	$3,78 \times 10^{-5}$	75	$5,03 \times 10^{-7}$	$4,72 \times 10^{-2}$	$2,72 \times 10^{-4}$	$4,37 \times 10^{-2}$	$8,69 \times 10^4$	3,1	$7,41 \times 10^{-2}$	$2,80 \times 10^4$
CTqc2	1,85	0,00	1,85	$4,04 \times 10^{-5}$	143	$2,83 \times 10^{-7}$	$4,76 \times 10^{-2}$	$1,59 \times 10^{-4}$	$4,41 \times 10^{-2}$	$1,56 \times 10^5$	6,9	$8,51 \times 10^{-2}$	$2,26 \times 10^4$
CTsd2	2,17	0,01	2,17	$4,73 \times 10^{-5}$	53	$8,90 \times 10^{-7}$	$5,79 \times 10^{-2}$	$1,94 \times 10^{-4}$	$5,36 \times 10^{-2}$	$6,02 \times 10^4$	2,2	$3,25 \times 10^{-2}$	$2,74 \times 10^4$
CTsd7	1,68	0,00	1,68	$3,65 \times 10^{-5}$	53	$6,91 \times 10^{-7}$	$4,93 \times 10^{-2}$	$3,02 \times 10^{-4}$	$4,56 \times 10^{-2}$	$6,61 \times 10^4$	2,0	$5,54 \times 10^{-2}$	$3,30 \times 10^4$

Danksagung

Ich danke allen, von denen ich in den letzten Jahren lernen konnte, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit mit Rat und Tat unterstützten und die diese vier Jahre für mich zu einer guten und produktiven Zeit werden ließen.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph (MLU Halle) zuallererst für die interessierte Betreuung der Arbeit und darüber hinaus für seine Initiative, mir die Promotion im industriellen Umfeld sowie den vorangegangenen Boston-Aufenthalt zu ermöglichen. Herzlichen Dank! Ganz besonders danke ich auch Herrn Dr. Zhixin Shao, der diese Arbeit erst ermöglichte und diese mit großem Know-how zur ‚Gerichteten Evolution‘ und in stets freundlicher Laboratmosphäre betreute. Ebenfalls herzlichen Dank an meinen Penzberger Abteilungsleiter Herrn Dr. Rainer Schmuck für sein jederzeit offenes Ohr für Fragen und vielfältige Anregungen.

Allen Mitarbeitern der Abteilung LR-DE danke ich sehr herzlich für ihre Hilfsbereitschaft, das bereitwillige Teilen ihrer reichen Laborerfahrungen, für die sehr kompetente fachliche Unterstützung und für ein sehr nettes, anregendes und faires Arbeitsklima. Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn Peter Kratzsch, der mich in seiner geduldigen und pragmatischen Weise so einige Male an seinem großen Erfahrungsschatz teilhaben ließ, an meine zeitweisen Laborkolleginnen Daniela Beck und Dr. Annette Deufel für die engagierte und freundschaftliche Laboratmosphäre, an meine netten Nachbarn aus dem Proteinlabor Dr. Thomas Meier, Gabriele Wachter, Johnny Staepels, Sigrid Stock und Thomas Weidner für viele kleinere und größere Hilfestellungen und an Dr. Bernd Schneidinger, den ich zuweilen mit Laborbuch oder Manuskript unterm Arm aufgesucht habe. Ich danke Abteilung LR-DE sehr herzlich für die zum Teil über die Laborwelt hinaus reichende freundschaftliche Atmosphäre.

Herrn Dr. Martin Lanzendörffer und Dr. A. Papadimitriou sei für die Bereitstellung von Geräten gedankt, Herrn Lothar Driller und Herrn Andreas Adelberger für die Hilfe bei der Verwendung dieser. Ich danke der Abteilung Analytics für die Durchführung der Massenspektrometrie. Meinem „Mitdoktoranden“ Dr. Christian Klein danke ich herzlich für seine vielfältige Unterstützung, zum Beispiel bei der Proteinkristallisation. Auch meinen anderen Penzberger „Mitdoktoranden“ Dirk Demuth, Dr. Kirsten Dettmar, Nicole Euer, Vesna Evtimova, Marion Hirt, Sonia Krauss, Robert de Lange, Dr. Tanja Ligensa, Stephanie Lösch, Robert Macek, Dr. Tanja Schneider, Michael Schräml, Dr. Kathrin Sichler, Dr. Nesrine Tarbe und Dr. Malte Weber möchte ich danken, vor allem für das herzliche Miteinander und viele schöne außerdienstliche Aktivitäten.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls um Prof. Dr. Rainer Rudolph und ganz besonders denen der Arbeitsgruppe Dr. Gerald Böhm sei gedankt für das hervorragende Laborklima und die kollegiale Hilfe, die ich während meiner dortigen Aufenthalte - auch schon zu „Vordoktorandenzeiten“ - erfahren durfte. Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Hauke Lilie für die fruchtbaren Anregungen und seine Diskussionsbereitschaft zu allen Aspekten der Proteinspektroskopie bedanken. Bei Herrn Dr. Hans Jürgen Hecht (GBF Braunschweig) möchte ich mich für die Experimente zur Proteinkristallisation bedanken. Herrn Dr. Gerald Böhm (ACGT ProGenomics AG) danke ich für die Erstellung der Proteinmodelle. Frau Dr. Elisabeth Schwarz, Herrn Dr. Hauke Lilie und Herrn Dr. Zhixin Shao danke ich für das sorgfältige Lesen des Manuskripts.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinen Großeltern für deren jahrelange Unterstützung und Hilfe.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Ich versichere weiterhin, daß allen anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Jena, 23.02. 2004

Lebenslauf

Name: Janet Kenklies
Geburtsdatum: 05.08.1973
Geburtsort: Aschersleben
Eltern: Jürgen Kenklies und Isolde Kenklies, geb. Redlich

Schulbildung

Sep. 1980 – Jul. 1990 Polytechnische Oberschule Hermann Matern, Halle Neustadt
Sep. 1999 – Jun. 1992 Gymnasium im Bildungszentrum, Halle-Neustadt
Jun. 1992 Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

Okt. 1992 – Sep. 1997 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Okt. 1996 – Aug. 1997 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie unter Anleitung von Prof. Dr. Jan R. Andreesen und Dr. Andreas Pich. Thema: Klonierung und Sequenzierung des Gens der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase aus *Clostridium Sticklandii*
Sept. 1997 Abschluß des Studiums mit dem Grad einer Diplom-Biochemikerin

Beruflicher Werdegang

Okt. 1997 – Jul. 1998 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie und am Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Aug. 1998 – Feb. 1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. Eliana de Bernadez Clark im Department of Chemical Engineering, Medford, USA (Thema: Renaturierung der Enterokinase)
Apr. 1999 – Feb. 2003 *Promotion*: Doktorarbeit am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Abteilung Proteintechnologie unter Anleitung von Prof. Dr. Rainer Rudolph; Durchführung der praktischen Arbeiten in der Roche Diagnostics GmbH Business Area Centralized Diagnostics in Penzberg unter Anleitung von Dr. Zhixin Shao
Apr. 2003 – Aug. 2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Trainings- & Applikationslabor für zellfreie Proteinexpression (Roche Diagnostics GmbH Business Area Roche Applied Science, Penzberg)
seit Sep. 2003 Trainings- & Applikationsspezialistin für die Automatisierung molekularbiologischer Protokolle (CyBio Screening GmbH, Jena)

Jena, 23.02. 2004