

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Max-Planck-Institut für Biochemie

**Kritische Analyse des Verfahrens zur Erweiterung
des genetischen Codes in Eukaryoten.**

**Design von Lipase-Kongeneren durch Genetic
Code Engineering.**

Sebastian Nehring

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Nediljko Budisa
2. Univ.-Prof. Dr. Thomas Kiefhaber

Die Dissertation wurde am 24.02.2011 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 26.04.2011
angenommen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Fachzeitschriften
veröffentlicht:

Hoesl M G*, Acevedo Rocha C*, **Nehring S***, Wolschner C, Royter M, Wiltschi B,
Budisa N, Antranikian G
Lipase congeners designed by genetic code engineering.
ChemCatChem. 2011; 3(1): 213–221.* Contributed equally.

Nehring S, Budisa N, Wiltschi B
Analysis of orthogonal pairs for the incorporation of different Tyr analogs in
yeast.
2011, in Vorbereitung

Weitere wissenschaftliche Veröffentlichungen:

Wiltschi B, Wenger W, **Nehring S**, Budisa N
Expanding the genetic code of *Saccharomyces cerevisiae* with methionine
analogues.
Yeast. 2008; 25(11): 775-786.

Büttner K, **Nehring S**, Hopfner KP
Structural basis for DNA duplex separation by a superfamily-2 helicase.
Nat Struct Mol Biol. 2007; 14(7): 647-652.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Birgit Wiltschi für Ihre erstklassige Betreuung und Anleitung bei dieser Arbeit und dafür, dass Sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Und natürlich Prof. Dr. Nediljko Budisa dafür, dass er mir diese Arbeit in der dynamischen und motivierenden Atmosphäre seiner Gruppe ermöglicht hat. Auch danke ich beiden für die zahlreichen fachlichen und nicht fachlichen Gespräche und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Dieter Oesterhelt möchte dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Abteilung zu arbeiten.

Prof. Dr. Garabed Antranikian and Dr. Maryna Royter danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit beim Lipase Projekt, die Bereitstellung der TTL und für die Hilfe bei den Lipase-Assays.

Prof. Dr. Peter Schultz und Prof. Dr. Steven Hahn danke ich für die freundliche Bereitstellung der Expressionsplasmide für die orthogonalen Paare mit BpaRS, AzRS3 und PxRS1.

Im Weiteren möchte ich mich bei Petra Birle und Tatjana Krywcun für ihre große Hilfe bei der Klonierung des pEcTyrRS/tRNA_{CUA} Tanden-Vektors und der Mutation von AzRS1 bedanken.

Bei Traudl Wenger möchte ich mich recht herzlich für ihre stetige Hilfsbereitschaft, ihre Unterstützung bei allerlei technischen und praktischen Fragen und für die vielen netten Gespräche bei der einen oder anderen Tasse Kaffee bedanken.

Martin Turk danke ich für das 3D Modeling der TTL.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Elisabeth Weyher-Stingl für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und dafür, dass sie es durch ihr Wissen und ihre Erfahrung geschafft hat, auch noch so geringe hSOD1-Spuren in meinen Proben zu finden. Bei Snezan Marinkovic bedanke ich mich für die Bearbeitung der unzähligen DNA-Sequenzierungen, mit denen ich ihn überhäuft habe.

Bei Dr. Lars Merkel und Dr. Birgit Wiltschi möchte ich mich für das kritische Lesen des Manuskriptes und für ihre konstruktiven Verbesserungsvorschläge bedanken.

Michael Hoesl und Dr. Carlos Acevedo Rocha danke ich ganz besonders für die außerordentlich gute Teamarbeit bei unserem Lipase Projekt. Ich denke, hiervon haben wir alle sehr profitiert und ohne die Bündelung unserer Energien und Stärken hätten wir dieses anspruchsvolle und umfangreiche Projekt nicht stemmen können.

Meinen beiden Kollegen Dr. Carlos Acevedo Rocha und Lena Strube danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die lockere Stimmung im „kleinen“-Labor. Und darüber hinaus möchte ich mich bei allen übrigen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Budisa-Gruppe für die freundliche und inspirierende Arbeitsatmosphäre und ihre große Hilfsbereitschaft bedanken.

Und schließlich möchte ich mich im ganz Besonderen bei meinen Eltern, Christine und Günter, bei meinem Bruder Oliver und bei meiner Freundin Nathalie für ihre selbstverständliche und selbstlose Unterstützung bedanken, durch die mir dieser Weg überhaupt erst möglich wurde.

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden neben den SI-Einheiten und Abkürzungen gemäß den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur, noch die folgenden Abkürzungen verwendet:

A	Adenin
aa	Aminosäure
aaRS	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
ad	auffüllen auf
Ala	Alanin
AmF	<i>p</i> -Amino-L-phenylalanin
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
AzF	<i>p</i> -Azido-L-phenylalanin
Bpa	<i>p</i> -Benzoyl-L-phenylalanin
C	Cytosin
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
cFP	<i>cis</i> -4-Fluorprolin
cHP	<i>cis</i> -4-Hydroxyprolin
CV	Säulenvolumen (eng.: <i>column volume</i>)
Cys	Cystein
Da	Dalton
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (eng.: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
His	Histidin
6×His-Tag	Hexahistidin-Tag
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (eng.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
hSOD1	humane Superoxiddismutase 1
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -d-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
LC	Flüssigchromatographie (eng.: <i>liquid chromatography</i>)
Leu	Leucin
LiOAc	Lithiumacetat
Lys	Lysin
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (eng.: <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>)
MeOH	Methanol
Met	Methionin
mFF	<i>meta</i> -Fluorphenylalanin
mFY	<i>meta</i> -Fluortyrosin
mRNA	messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
NCAA	nicht-kanonische Aminosäure (eng.: <i>non-canonical amino acid</i>)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMM	<i>New minimal medium</i>
o/n	über Nacht
OD	Optische Dichte

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
oFY	<i>ortho</i> -Fluortyrosin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (eng.: <i>polymerase chain reaction</i>)
pFF	<i>para</i> -Fluorphenylalanin
Phe	Phenylalanin
PheRS	Phenylalanyl-tRNA Synthetase
pH _{opt}	optimaler pH-Wert
Pi	Phosphat-Anion (PO ₄ ³⁻)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat
PPi	Pyrophosphat-Anion (P ₂ O ₇ ⁴⁻)
Pro	Proline
PxF	<i>p</i> -Propargyloxy-L-phenylalanin
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Umkehrphasen Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (eng.: <i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (eng.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCS	Stop-Codon-Suppression
SDS	Natriumdodecylsulfat (eng.: <i>sodium dodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serine
SPI	Einbau durch Supplementation (eng.: <i>supplementation based incorporation</i>)
T	Thymin
TEE	Totale Einbaueffizienz
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TFA	Trifluoressigsäure (eng.: <i>trifluoroacetic acid</i>)
tFP	<i>trans</i> -4-Fluorprolin
THF	Tetrahydrofuran
tHP	<i>trans</i> -4-Hydroxyprolin
Thr	Threonin
Tm	Schmelzpunkt

T _{opt}	optimale Temperatur
tR	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
tRNA _{CUA}	Suppressor-tRNA für das Amber-Stop-Codon
Trp	Tryptophan
TTL	Lipase aus <i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i>
Tyr	Tyrosin
TyrRS	Tyrosyl-tRNA Synthetase
U	Einheit (eng.: <i>unit</i>)
U	Uracil
Ura	Uracil
Val	Valin
wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei grundlegend verschiedene Methoden des *Protein Engineerings* durch *in vivo* Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren (NCAAs) in Proteine angewendet, analysiert und ihr Potential für biotechnologische Anwendungen beurteilt werden.

Im ersten Teil wurde ein System für den Einbau der Tyr-Analoga *p*-Azido-L-phenylalanin (AzF), *p*-Propargyloxy-L-phenylalanin (PxF) und *p*-Benzoyl-L-phenylalanin (Bpa) in Proteine, exprimiert in der Hefe *S. cerevisiae*, durch Suppression von *in frame* Amber-Stop-Codons (UAG), rekonstruiert. Mittelpunkt dieses Systems sind dabei orthogonale Paare, die jeweils aus, für die Analoga spezifischen *E. coli* TyrRS Mutanten und einer *E. coli* Suppressor-tRNA_{CUA} bestehen. Als Modellprotein diente die humane Superoxiddismutase 1 (hSOD1) mit einer Trp33 → Amber Stop Mutation. Es konnte der Einbau von PxF und Bpa, in Antwort auf das *in frame* Amber-Stop-Codon an Position 33, erfolgreich durchgeführt werden, allerdings waren die Proteinausbeuten sehr gering. Der Einbau von AzF war hingegen nicht reproduzierbar. Belege aus der Literatur, dass Arylazide wie AzF nicht stabil sind und durch Hefe reduziert werden können, wurden durch Einbauversuche mit *p*-Amino-L-phenylalanin (AmF), der reduzierten Form von AzF behandelt. Obwohl volllängen hSOD1 in Gegenwart von AmF mit einem für AzF entwickelten orthogonalen Paar erhalten wurde, konnte der Einbau von AmF aufgrund von nur 1 Da Massenunterschied zu Tyr nicht eindeutig bewertet werden.

Zusätzlich wurden die *E. coli* TyrRS Mutanten in Bezug auf die Aktivierung von Tyr und der Analoga mit Hilfe des ATP-PPi-Austausch-Assays analysiert. Keines der Enzyme zeigte Aktivität gegenüber dem Analog, für das es entwickelt wurde, aber alle zeigten nach wie vor hohe Aktivität gegenüber Tyrosin. So konnte dargelegt werden, dass die größte Problematik der Stop-Codon-Suppressions Methode in der Entwicklung von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen liegt, die eine hohe Spezifität und katalytische Aktivität gegenüber der gewünschten NCAA haben. Weitere Entwicklungen werden für die biotechnologische Anwendung dieser Technik in Hefe erforderlich sein.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Design von Proteinkongeneren, mit Hilfe der *Supplementation Based Incorporation* Methode. Hierzu

wurde die als Biokatalysator industriell relevante Lipase aus dem thermophilen, anaeroben Bakterium *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (TTL) in *E. coli* exprimiert. Die Phenylalanin-, Prolin- und Tyrosinreste wurden jeweils proteinweit gegen entsprechende nicht-kanonische Aminosäureanaloge ausgetauscht. Die erhaltenen Lipase-Kongenere zeigten neue und teils stark verbesserte Eigenschaften in ihrer Enzymaktivität, Substratspezifität, optimalen Temperatur und pH und Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenen organischen Lösungsmitteln, Metallionen, Detergenzien oder Inhibitoren. Da sie globale Effekte hervorruft, kann die *Supplementation Based Incorporation* Methode von NCAAs für das *Engineering* von industriell relevanten Proteinen verwendet werden.

Summary

In this work two fundamentally different methods of protein engineering by *in vivo* incorporation of non-canonical amino acids (NCAAs) in proteins were used, analyzed and their potential for biotechnological applications were assessed.

In the first part, a system for incorporation of the Tyr analogs *p*-azido-L-phenylalanine (AzF), *p*-propargyloxy-L-phenylalanine (PxF) and *p*-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) into proteins expressed in the yeast *S. cerevisiae* by suppression of in frame amber stop codons (UAG) was reconstructed. Central to this system are orthogonal pairs, consisting each of a mutant *E. coli* TyrRS that is specific for the analog of interest and an *E. coli* suppressor tRNA_{CUA}. As the model protein, human superoxide dismutase 1 (hSOD1) with a Trp33 → amber stop mutation was used. Incorporation of PxF and Bpa in response to the in frame amber stop codon at position 33 could be performed successfully, but the protein yields were very low. The incorporation of AzF, however, was not reproducible. Evidence from the literature that arylazides such as AzF are not stable and can be reduced by yeast were addressed by incorporation experiments with *p*-amino-L-phenylalanine (AmF), the reduced form of AzF. Although full length hSOD1 was obtained in the presence of AmF with an orthogonal pair evolved for AzF, the incorporation of AmF could not be unambiguously assessed due to only 1 Da mass difference to Tyr.

In addition, the *E. coli* TyrRS mutants were analyzed with respect to activation of Tyr or the analogs by performing a radioactive ATP-PPi exchange assay. None of the enzymes revealed activity towards the analog it was developed for, but all still showed high activity towards tyrosine. Thus, it could be demonstrated that the most serious problem of this method lies in the evolution of aminoacyl-tRNA synthetases with high specificity and catalytic activity toward the desired NCAA. Further development will be needed for the biotechnological application of this technique in yeast.

The second part of this thesis deals with the design of protein-congeners using the supplementation based incorporation method. To achieve this, the industrially relevant lipase from the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (TTL) was expressed in *E. coli*. The phenylalanine, proline and tyrosine residues were globally replaced by corresponding non-canonical

amino acid analogs. The resulting lipase congeners showed new and in parts significantly improved features with respect to their enzymatic activity, substrate specificity, optimal temperature, and pH, and resistance towards various organic solvents, metal ions, detergents or inhibitors. As it elicits global effects, the supplementation based incorporation of NCAAs can be used for the engineering of industrially relevant proteins.

Inhaltverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der genetische Code und seine Interpretation	1
1.2 Genetic Code Engineering - Co-Translationale Inkorporation von nicht-kanonischen Aminosäuren in Proteine <i>in vivo</i>	6
1.2.1 <i>Supplementation Based Incorporation (SPI)</i>	7
1.2.2 <i>Suppression von Stop-Codons (SCS)</i>	8
1.3 Der erweiterte genetische Code in Eukaryoten	13
1.4 Industrielle Biotechnologie - Design von Lipase-Kongeneren	16
1.4.1 <i>Neue Wege zum optimierten Enzym</i>	17
1.4.2 <i>Lipasen – vielseitige Biokatalysatoren</i>	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit	24
2. Materialien	25
2.1 Plasmide	25
2.2 Primer	25
2.3 <i>E. coli</i> Stämme	27
2.4 <i>S. cerevisiae</i> Stämme	27
2.5 Enzyme	27
2.6 Antikörper	28
2.7 Standards	28
2.8 Präparationskits	28
2.9 Dialyse- und Blotting-Membranen	28
2.10 Chromatographiesäulen	28
2.11 Konzentratoren	29
2.12 Puffer	29
2.12.1 <i>Puffer für Agarosegele</i>	29
2.12.2 <i>Puffer für SDS-Gele</i>	30
2.12.3 <i>Puffer für Immunoblot</i>	31
2.12.4 <i>Puffer für Ni-NTA-Säule</i>	32
2.12.5 <i>Puffer für Hefe Zellaufschluss</i>	32
2.12.6 <i>Puffer für die Herstellung von Hefe Gesamtprotein-Extrakten</i>	33
2.12.7 <i>Puffer für <i>Strep</i>-Tactin Säule</i>	33
2.12.8 <i>Puffer ATP-PPi-Austausch-Assay</i>	34
2.12.9 <i>Puffer für Spektrophotometrischen Lipase-Assay</i>	34
2.13 Chemikalien	35
2.14 Geräte	35
2.15 Medien und Antibiotikallösungen	36
2.15.1 <i>Medien für <i>E. coli</i></i>	36
2.15.2 <i>Medien für <i>S. cerevisiae</i></i>	37
2.15.3 <i>Antibiotika-Stammlösungen</i>	38

3. Methoden	39
3.1 Molekularbiologische Methoden	39
3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese	39
3.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
3.1.3 Fällung von DNA	39
3.1.4 PCR - Polymerase-Kettenreaktion.....	40
3.1.5 Restriktionsverdau von DNA	40
3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	41
3.1.7 DNA-Sequenzierung	42
3.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration	42
3.2 Mikrobiologische Methoden	42
3.2.1 Herstellung elektro-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	42
3.2.2 Transformation elektro-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	43
3.2.3 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	43
3.2.4 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	44
3.2.5 Transformation in <i>S. cerevisiae</i> Zellen	45
3.2.6 Überexpression rekombinanter hSOD1.....	46
3.3 Biochemische Methoden	47
3.3.1 Proteinaufreinigung und Isolierung	47
3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	49
3.3.3 Enzym Assays	52
3.3.4 ESI-Massenspektrometrie	56
3.3.5 Circular dichroismus.....	56
3.4 3D-Struktur-Modeling der TTL	57
4. Ergebnisse und Diskussion	58
4.1 Einbau von Tyrosinanaloga durch Suppression von Amber-Stop-Codons in die hSOD1 in <i>S. cerevisiae</i>	58
4.1.1 Orthogonale Paare	58
4.1.2 Das Zielprotein	63
4.1.3 Expression und Analyse der hSOD1 Varianten	66
4.1.4 Intrazelluläre Expression von TyrRS Mutanten	72
4.2 In vitro Aktivierung von Tyrosinanaloga durch die verschiedenen TyrRS-Mutanten	74
4.2.1 Klonierung und Expression von Wildtyp TyrRS und TyrRS Mutanten für den ATP-Pi Assay.	74
4.2.2 Charakterisierung der TyrRS Mutanten mit dem ATP-Pi-Austausch-Assay	77
4.3 Lipase-Kongenere	84
4.3.1 Dreidimensionales Modell der <i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> Lipase (TTL)	85
4.3.2 Klonierung der TTL, Expression und Aufreinigung	87
4.3.3 Einbaueffizienz der nicht-kanonischen Aminosäureanaloga	89
4.3.4 Optimale Temperatur und optimaler pH-Wert	92
4.3.5 Abhängigkeit der Lipase-Aktivität von der Temperaturexposition und Thermische Aktivierung.....	97
4.3.6 Substrat Toleranz.....	103
4.3.7 Einfluss von Additiven auf die Lipase-Aktivität	104

4.3.8	Toleranz der TTL-Struktur gegenüber Austausch von Aminosäuren	114
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	117
5.1	Welches Potential hat die Stop-Codon-Suppressions Methode (SCS) in Hefe? 117	
5.2	Perspektiven für das Design von Biokatalysatoren mit synthetischen Aminosäureanaloga	118
6.	Anhang	120
7.	Referenzen	122
8.	Abbildungsverzeichnis.....	128
9.	Tabellenverzeichnis	130

1. Einleitung

1.1 Der genetische Code und seine Interpretation

Schon 1958 publizierte Francis Crick folgende, heute als zentrales Dogma der Molekularbiologie bezeichnete Hypothese: „Wenn (sequenzielle) Information einmal in ein Protein übersetzt wurde, kann sie dort nicht wieder herausgelangen.“^[1] Daraus ergibt sich, dass der Informationsfluss in biologischen Systemen nur zwischen den Nukleinsäuren DNA und RNA und von Nukleinsäuren zu Proteinen möglich ist. Ein Transfer von sequenzieller Information in der entgegengesetzten Richtung, also von Protein zu Nukleinsäure oder von Protein zu Protein ist hingegen nicht möglich. Für eine exakte Übersetzung, der in der Basensequenz der DNA (bestehend aus den vier Nucleotiden Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T), bzw. Uracil (U) bei RNA) gespeicherten genetischen Information in die 20, in Proteinen vorkommenden (proteinogen oder kanonischen) Aminosäuren, bedarf es daher eines eindeutigen Schlüssels. Dieser Übersetzungsschlüssel wird als genetischer Code bezeichnet. Er basiert auf der Umsetzung von linear auf der DNA angeordneten Basentriplets, den so genannten Codons. Von den 64 Möglichkeiten, nach denen die vier Nucleotide der DNA miteinander kombiniert werden können, codieren 61 Codons für Aminosäuren. Die restlichen drei sind als Stop-Codons für die Termination der Translation verantwortlich (vergl. Abb. 1).^[2] Die Tatsache, dass die meisten Aminosäuren durch mehrere Codons codiert werden, wird als Degeneration bezeichnet. Dabei ist die Variabilität der Basentriplets nicht beliebig, sondern folgt bestimmten Regeln die als Wobble-Hypothese bekannt sind. Diese besagt, dass die Basenpaarung zwischen dem Codon-Triplett der messenger-RNA (mRNA) und dem Anticodon-Triplett der transfer-RNA (tRNA) nur bei der 1. und 2. Base der mRNA durch eine feste Wasserstoffbrückenbindung erfolgt. Die Bindung der 3. Base ist schwächer und kann auch zu Nicht-Watson-Crick-Paarungen führen. Damit diese Paarungen möglich sind, müssen die Basen allerdings während der Translation am Ribosom aus ihrer Position „herauswackeln“, weshalb sie auch als „Wobble-Paarungen“ bezeichnet werden.^[3, 4]

Diese endet dann, wenn eines der drei Stop-Codons, UAG (Amber), UGA (Opal) oder UAA (Ochre), erreicht wird.

Für die eigentliche Interpretation des genetischen Codes sind verschiedene Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs) zuständig. Diese fungieren während der Translation als Adaptermoleküle („Vermittler“) zwischen der in der mRNA gespeicherten genetischen Information und der Aminosäuresequenz des entstehenden Polypeptids. Der Degeneration des genetischen Codes entsprechend, existieren für jede proteinogene Aminosäure mindestens eine, meist jedoch bis zu sechs verschiedene tRNAs, die als Isoakzeptoren bezeichnet werden. Dabei ist das aus drei Nukleotiden bestehende Anticodon jeweils zu dem entsprechenden Codon der mRNA komplementär.^[2]

Die Sekundärstruktur der zwischen 73 und 95 Nucleotiden umfassenden tRNA-Moleküle wird aufgrund von intramolekularen Basenpaarungen auch als Kleeblattstruktur bezeichnet und gliedert sich in bestimmte Domänen, die unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. So ist der aus den beiden Enden bestehende, sieben Basenpaare umfassende Bereich, der als Akzeptor-Arm bezeichnet wird, für die Bindung der jeweiligen Aminosäure verantwortlich. Der Anticodon-Arm enthält mit dem Anticodon die für die Translation erforderliche Information, wohingegen die anderen beiden Arme aufgrund des Vorhandenseins modifizierter Nucleotide als DHU-Arm (Dihydrouracil) und TΨC-Arm (Pseudouracil) bezeichnet werden. Sie dienen vor allem der Stabilisierung der tRNA-Moleküle (siehe Abb. 2 A). Die dreidimensionale Struktur der tRNAs zeigt einen L-förmigen Aufbau und wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt (Abb. 2 B).^[5-7]

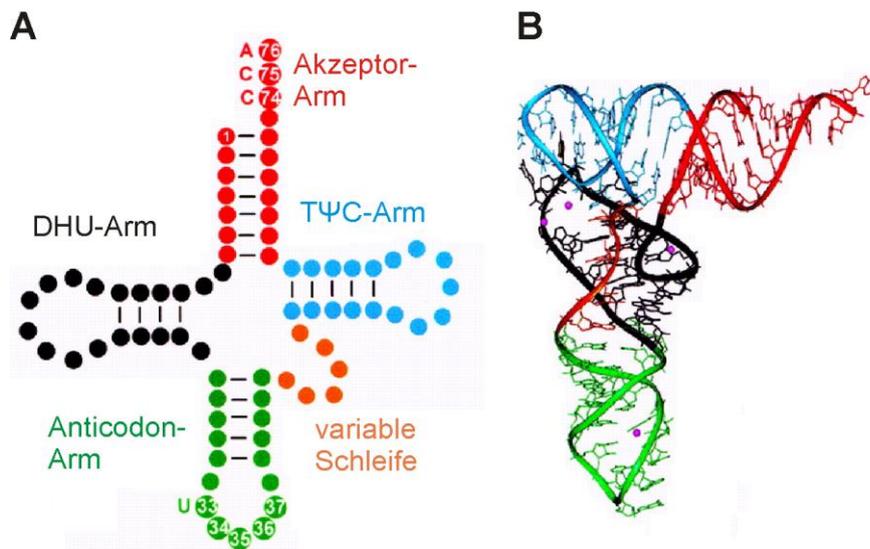
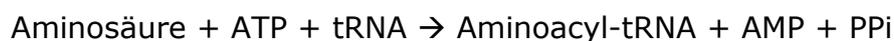


Abb. 2 Struktur der tRNA.

In **(A)** ist die Sekundärstruktur oder „Kleeblattstruktur“ der *S. cerevisiae* tRNA^{Phe} abgebildet. Die verschiedenen tRNA-Domänen sind farblich gekennzeichnet. Die dreidimensionale, L-förmige Struktur ist in **(B)** zu sehen. (Abb. modifiziert aus Agris *et al.*^[7])

Die Beladung einer tRNA mit der passenden Aminosäure wird als Aminoacylierung bezeichnet. Sie erfolgt durch die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen der Carboxylgruppe der Aminosäure und der 2'- oder 3'-OH-Gruppe des Adenosins der CCA-Sequenz am 3'-Ende der tRNA (vergl. Abb. 2 A). Diese Reaktion wird durch so genannte Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRSs) katalysiert, wobei für jede Aminosäure ein eigenes Enzym existiert; Isoakzeptoren werden somit durch dasselbe Enzym beladen. Die Reaktion der einzelnen aaRSs lässt sich dabei wie folgt beschreiben:



Dabei entsteht zunächst ein gemischtes Anhydrid zwischen der Aminosäure und dem AMP; die so aktivierte Aminosäure wird anschließend auf die OH-Gruppe der Ribose am 3'-Ende der tRNA übertragen (Esterbildung). Häufig erkennt die Aminoacyl-tRNA-Synthetase dazu das Anticodon auf der tRNA. Es können aber auch andere Strukturelemente, wie etwa der Akzeptor-Arm, bei der Erkennung eine Rolle spielen. Die dabei entstehende energiereiche Bindung wird später während der Translation zur Bildung der Peptidbindung zwischen der Aminosäure und der wachsenden Polypeptidkette genutzt. aaRS lassen sich in zwei Klassen einteilen, wobei Klasse I die Aminosäuren mit der 2'-OH-Gruppe der Ribose am 3'-Ende der tRNA verknüpft, Enzyme der Klasse II hingegen die Veresterung mit der 3'-OH-Gruppe katalysieren.^[2, 4]

Die Proteinbiosynthese erfolgt schließlich an den Ribosomen, an denen die mRNA und die mit Aminosäuren beladenen tRNAs zusammengeführt werden. Sie lässt sich in drei Phasen unterteilen, wobei die Initiation mit der Positionierung des Startcodons (AUG) beginnt und dadurch das Leseraster der mRNA bestimmt wird. Während der sich anschließenden Elongation findet eine schrittweise Verknüpfung von Aminosäuren unter gleichzeitiger Entstehung einer Polypeptidkette statt. Bei Erreichen eines Stop-Codons kommt es schließlich zur Termination der Translation. An allen drei Phasen sind sowohl bei Prokaryoten, als auch bei Eukaryoten eine Reihe von Proteinfaktoren beteiligt, die teilweise unter Hydrolyse von GTP Einzelschritte kontrollieren. Zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen bestehen besonders in der Initiation Unterschiede: Bei Prokaryoten bindet die 16S-rRNA der kleinen 30S-Untereinheit des Ribosoms an eine spezielle purinreiche Sequenz (Shine-Dalgarno-Sequenz), die 8 bis 13 Nucleotide *upstream* vom ersten AUG-Codon im nicht-codierenden Bereich der mRNA liegt.^[8] Anschließend bindet die große 50S-Untereinheit des Ribosoms und es entsteht der 70S-Initiationskomplex. Dabei befindet sich die Initiator-fMet-tRNA (Formylmethionyl-tRNA) bereits in der P-Stelle der 50S Untereinheit und bindet an das Start AUG-Codon. Bei Eukaryoten ist die erste Aminosäure zwar auch ein Methionin, allerdings ist es nicht formyliert. Die Initiation ist hier insgesamt komplexer. Dabei bindet die kleine 40S-Untereinheit des eukaryotischen Ribosoms, die bereits die Initiator-Met-tRNA gebunden hat, an die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA und sucht diese ab bis es auf das erste AUG-Codon trifft. Jetzt kommt die große 60S-Untereinheit hinzu und bildet den 80S-Initiationskomplex. Im weiteren Verlauf ist die Translation bei Prokaryoten und Eukaryoten abgesehen von der Tatsache, dass sich beide Zellformen im Aufbau ihrer Ribosomen und in der Art und Weise der Genexpression unterscheiden (z.B. polycistronische Transkripte bei Prokaryoten, monocistronische Transkripte bei Eukaryoten) und bei Eukaryoten teilweise wesentlich mehr Proteinfaktoren beteiligt sind, grundsätzlich ähnlich.^[2, 4]

Die Termination erfolgt, wenn eines der drei Stop-Codons UAA, UGA oder UAG erreicht wird. Hier bindet im Normalfall (außer bei der Suppression durch Suppressor-tRNAs, siehe dazu 1.2.2) keine tRNA an die A-Stelle des Ribosoms. Stattdessen binden sogenannte *Release* Faktoren (RFs) an das Stop-Codon. Dabei erkennt bei Prokaryoten RF1 UAG und UAA und RF2 UAA und UGA, bei Eukaryoten erkennt ein einzelner Faktor (eRF1) alle drei Stop-Codons. Ein weiterer Faktor (RF3 bzw. eRF3) vermittelt die Interaktion zwischen RF1/RF2

bzw. eRF1 und dem Ribosom. Zur Freisetzung der synthetisierten Polypeptidkette und zur Trennung der mRNA vom Ribosom kommt es dadurch, dass RF1/RF2 bzw. eRF1 über eine bestimmte Aminosäuresequenz (Gly-Gly-Gln) ein Wassermolekül in das Peptidyl-Transferase-Zentrum des Ribosoms transportieren. Dieses Wassermolekül spaltet durch nucleophilen Angriff die Esterbindung zwischen Polypeptidkette und der tRNA in der P-Stelle des Ribosoms.^[4, 9]

1.2 Genetic Code Engineering - Co-Translationale Inkorporation von nicht-kanonischen Aminosäuren in Proteine *in vivo*

Die Möglichkeit den genetischen Code über die 20 kanonischen Aminosäuren, die in der Proteinbiosynthese aller Lebewesen verwendet werden, hinaus zu erweitern, hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Durch die „Umprogrammierung“ der ribosomalen Proteinsynthese können neben natürlich vorkommenden, jedoch vom genetischen Code nicht codierten Aminosäuren auch synthetische, in der Natur nicht vorkommende Aminosäurederivate *in vivo* in Proteine eingebaut werden. Diese so genannten nicht-kanonischen Aminosäuren (NCAAs), die eine ganze Reihe verschiedener chemisch funktioneller Gruppen tragen können, ermöglichen das Design und die Synthese von Proteinen mit vollkommen neuen Eigenschaften.^[10]

Damit eine nicht-kanonische Aminosäure in der ribosomalen Proteinsynthese aktiv ist, muss sie einige wichtige Voraussetzungen erfüllen: Sie muss von den Aminosäuretransportern in die Zelle aufgenommen werden können und in der Zelle muss es eine Aminoacyl-tRNA Synthetase geben, die sie erkennen und auf die entsprechende(n) tRNA(s) laden kann. Darüber hinaus muss sie in das aktive Zentrum des Ribosoms passen und darf die 3-dimensionale Struktur des Proteins, in das sie eingebaut wird, nicht stören.^[11]

So sind etwa nicht-kanonische Aminosäuren, die voluminöse Seitenketten, wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffe oder Polyethylenglycole tragen, oft translational inaktiv.^[12] Um Proteine dennoch mit diesen Resten funktionalisieren zu können, werden nicht-kanonische Aminosäuren mit post-translational chemisch derivatisierbaren, funktionellen Gruppen eingebaut.^[13-15] Diese dürfen nicht invasiv sein, das heißt der lebenden Zelle nicht schaden. Sie müssen bioorthogonal sein, darunter versteht man „nicht-native, nicht störende

orthogonale chemische Funktionalitäten, die in lebenden Zellen durch Zugabe einer Chemikalie von außen selektiv modifiziert werden können.^[12] Beispiele für solche Gruppen wären etwa Aldehyde und Ketone, die an der Proteinoberfläche elektrophile Ligationen mit Hydrazid- oder Aminoxy-Derivaten eingehen können. Oder Azide und terminale Alkine, die über Staudinger Ligation^[16, 17] oder [2+3]-Cycloaddition („Click-Chemie“)^[18] reagieren können.

Für den co-translationalen Einbau dieser nicht-kanonischen Aminosäuren in Proteine *in vivo* gibt es dabei zwei grundlegend verschiedene Methoden. Die eine ist der Einbau durch Supplementation oder auch *Supplementation Based Incorporation* (SPI) genannt,^[13-15, 19] die zweite Möglichkeit stellt die Suppression von Stop-Codons (SCS) dar.^[14, 15, 20]

1.2.1 **Supplementation Based Incorporation (SPI)**

Diese Methode hat ihren Ursprung bereits in den 50er Jahren, als es unter anderem gelang das Methioninanalogue Ethionin durch einfache Zugabe zum Medium in Proteine von *Tetrahymena* einzubauen.^[21] Dies verdeutlichte, dass die einzelnen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zwar sehr spezifisch zwischen den verschiedenen kanonischen Aminosäuren unterscheiden können, aber nicht zwischen kanonischen und strukturell ähnlichen, nicht-kanonischen Aminosäuren. Eben diese Promiskuität der aaRSs ermöglicht nun den co-translationalen Einbau von Analoga der zwanzig Standard-Aminosäuren. Allerdings war ein wirklich effizienter Einbau dieser Aminosäureanaloga in bakterielle Proteine erst durch die Verwendung von auxotrophen Bakterienstämmen möglich.^[22]

Bei der heute verwendeten und weiter optimierten Version der *Supplementation Based Incorporation* (SPI) Methode benötigt man daher ein nicht-kanonisches Aminosäureanalogue, das der entsprechenden kanonischen Aminosäure strukturell und/oder chemisch ähnlich ist und einen Expressionsstamm, der genau für diese Aminosäure auxotroph ist. Die Zellen werden zuerst in Medium mit kanonischen Aminosäuren angezchtet. Das Medium enthält die auszutauschende Aminosäure in limitierender Konzentration, wodurch das Zellwachstum zum Erliegen kommt, sobald diese aufgebraucht ist. Dann wird diese Aminosäure-depletierte Kultur mit der gewünschten nicht-kanonischen Aminosäure supplementiert. Erst jetzt wird die Expression des Zielproteins induziert und es kommt zu einem stochastischen Einbau der nicht-kanonischen anstatt der kanonischen Aminosäure an den durch die entsprechenden Codons codierten Positionen im Zielprotein.^[13, 19, 23] Diese

Vorgehensweise ist aufgrund der Substrattoleranz der zellulären Aufnahme und des endogenen Translationssystemes gegenüber strukturell verwandten Aminosäureanaloga möglich.^[24] Proteine die auf diese Weise hergestellt werden, können als Kongenere bezeichnet werden, da sie von der gleichen Gensequenz abstammen, aber diese in Teilen unterschiedlich übersetzt wird. Der Aminosäureaustausch findet dabei aminosäurerestspezifisch statt. Die Translation solcher Protein-Kongenere schließt die Neuordnung von *Sense Codons* an allen Positionen innerhalb einer Proteinsequenz, ohne der Notwendigkeit von DNA-Mutagenese, ein.^[13]

Nachteilig an dieser Methode ist, dass es nicht möglich ist, einzelne Aminosäurereste gezielt auszutauschen, sondern eine bestimmte Aminosäure nur an allen Positionen im Protein gegen das Analog ausgetauscht werden kann. Auch kann es durch noch vorhandene Spuren der kanonischen Aminosäure (etwa aus intrazellulärem Proteinabbau oder unvollständiger Depletion) zu einem heterogenen Einbau kommen. Durch Optimierung der Fermentationsbedingungen ist die quantitative Substitution der kanonischen Aminosäure möglich, allerdings ist die Substitutionseffizienz oft vom Protein, dem Analog und dem Expressionsorganismus abhängig.^[25, 26]

Großer Vorteil dieser Methode ist jedoch, dass sich mit relativ geringem Aufwand große Mengen an auf diese Weise modifizierten Proteinen herstellen lassen. Auch ist, im Gegensatz zur SCS Methode, ein gleichzeitiger (paralleler) Einbau von mehreren verschiedenen Analog in ein Protein möglich.^[27] Dabei muss allerdings ein Expressionsstamm verwendet werden, der für alle auszutauschenden Aminosäuren auxotroph ist. Nach Depletion aller dieser Aminosäuren in der Kultur, können die gewünschten Analog parallel zugegeben und die Expression des Zielproteins induziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SPI Methode für die Herstellung verschiedener Lipase-Kongenere in *E. coli* verwendet. Darüber hinaus wurde diese Methode auch schon erfolgreich in *S. cerevisiae*^[26] und *Pichia Pastoris*^[28] durchgeführt.

1.2.2 Suppression von Stop-Codons (SCS)

Bei dieser Methode (vergl. Abb. 3) wird die Bedeutung eines *in frame* Stop-Codons so verändert, dass es nicht mehr für die Termination der Translation codiert, sondern für den Einbau einer nicht-kanonischen Aminosäure. Besonders

geeignet ist hierfür das Amber Stop-Codon (TAG), da es von allen drei Stopp-Codons in *E. coli* und *S. cerevisiae* am seltensten verwendet wird.^[20] Bei der Suppression von Stop-Codons durch tRNAs, die ein zum Stop-Codon passendes Anticodon haben (Suppressor-tRNAs), handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Phänomen.^[29, 30] So existieren auch eine ganze Reihe von natürlichen, aber auch von gentechnisch hergestellten Suppressor-tRNAs u. a. für *E. coli*,^[31] Säugierzellen,^[32, 33] Hefe^[34] oder *C. elegans*.^[35] Sie konkurrieren allerdings mit der Termination der Translation durch *Release* Faktoren. Und auch ist die Suppression abhängig von der das Stop-Codon umgebenden DNA-Sequenz^[36] und der Anzahl der in der Zelle vorkommenden Kopien der Suppressor-tRNA,^[37] wodurch die Effizienz dieser Methode beeinflusst wird.

Das Kernstück des SCS Systems ist ein orthogonales Aminoacyl-tRNA Synthetase/Suppressor-tRNA Paar, das den exklusiven Einbau einer bestimmten nicht-kanonischen Aminosäure an der, durch das entsprechende Stop-Codon definierten Stelle ermöglicht. Im Gegensatz zum stochastischen Einbau bei der SPI Methode, kann bei dieser Methode die nicht-kanonische Aminosäure gezielt und (im Rahmen der oben genannten Nachteile) an nahezu jeder beliebigen Stelle im Protein eingebaut werden. Das zu überlesende Stop-Codon kann dabei über ortsgerichtete Mutagenese-PCR in die Sequenz des Zielproteins eingefügt werden. Allerdings ist der Einbau an der ersten Position eines Proteins, also am AUG-Start-Codon, nicht möglich. Mit der SPI Methode lassen sich hingegen auch diese N-terminalen Reste austauschen.^[13, 26]

Damit diese aaRS/Suppressor-tRNA Paare in der Wirtszelle orthogonal sind, müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein: Zum einen muss die Suppressor-tRNA so konstruiert sein, dass sie nicht von den endogenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRSs) des Wirtes erkannt wird, aber trotzdem in der Translation effizient arbeitet (orthogonale tRNA). Ebenfalls notwendig ist eine neue aaRS (eine orthogonale Synthetase), die die orthogonale tRNA aminoacyliert, aber keine der endogene tRNAs mit einer Aminosäure belädt. Diese aaRS darf die tRNA ausschließlich mit der gewünschten nicht-kanonischen Aminosäure und nicht mit einer kanonischen Aminosäure aminoacylieren. Andererseits darf die nicht-kanonischen Aminosäure aber auch kein Substrat für eine der endogenen aaRS sein.^[38]

Erste Versuche solch ein orthogonales aaRS/Suppressor-tRNA Paar zu entwickeln fanden in *E. coli* statt. Dabei wurde versucht, die Spezifität des bereits

existierenden Glutaminyl-tRNA-Synthetase (GlnRS)/tRNA₂^{Gln} Paares aus *E. coli* zu modifizieren. In einem ersten Schritt wurden Schlüsselnucleotide an der Grenzfläche zwischen tRNA und aaRS, ausgehend von der Röntgenstruktur des Komplexes,^[39] mutiert um die Affinität der tRNA für ihre kognate aaRS zu reduzieren, ohne aber die Orthogonalität gegenüber den anderen endogenen aaRS zu verlieren. Im nächsten Schritt sollte eine Mutante der Wildtyp (wt) GlnRS entwickelt werden, die eindeutig diese mutierte tRNA₂^{Gln} erkennt, aber weiterhin orthogonal zu den endogenen *E. coli* tRNAs ist.^[40, 41] Allerdings gelang es dabei nicht ein vollständig orthogonales GlnRS/tRNA₂^{Gln} Paar zu generieren.^[41]

In folgenden Ansätzen wurde dann versucht, ein bereits bestehendes aaRS/Suppressor-tRNA Paar aus einem anderen Organismus zu finden, das in *E. coli* orthogonal ist. Vielversprechend war hier etwa das GlnRS/tRNA_{CUA}^{Gln} Paar aus *S. cerevisiae*, jedoch konnte keine GlnRS-Mutante entwickelt werden, die spezifisch eine NCAA in *E. coli* aminoacyliert.^[42] Auch gab es recht erfolgreiche Experimente mit einem Phenylalanyl-tRNA-Synthetase/tRNA_{CUA}^{Phe} Paar aus Hefe, die Einbaurate der verwendeten NCAA lag dabei aber nur bei 64-75 % (der Rest waren Phe und Lys).^[43]

Den Durchbruch in *E. coli* brachte dann das aus dem Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* stammende TyrRS/tRNA_{CUA}^{Tyr} Paar.^[44] Dieses Paar weist eine natürliche Orthogonalität auf, weil es aus einem evolutionär entfernten Organismus stammt. P. G. Schultz und seine Kollegen entwickelten zahlreiche auf *M. jannaschii* TyrRS/tRNA_{CUA}^{Tyr} basierende orthogonale Paare in bakteriellen Zellen (*E. coli*) weiter.^[45] Zwar wurde diese *MjtRNA* auch noch von endogenen aaRSs aminoacyliert, durch die Generierung einer Suppressor-tRNA Bibliothek und einem anschließendem Screeningverfahren mit negativen und positiven Selektionsschritten, konnte eine *MjtRNA*-Mutante gefunden werden die zusammen mit der *MjTyrRS* eine hohe Orthogonalität in *E. coli* aufwies.^[45]

Die größte Herausforderung bei der SCS besteht allerdings darin, die Substratspezifität der Aminoacyl-tRNA-Synthetase des orthogonalen aaRS/Suppressor-tRNA Paares durch Mutation so zu verändern, das sie nur die gewünschte NCAA und keine der 20 kanonischen Aminosäuren auf die Suppressor-tRNA lädt. Denn eine Aminosäurepromiskuität in der orthogonalen aaRS würde zu Proteinen führen, die an der Position des Stop-Codons eine Mischung von NCAA und kanonischer Aminosäure enthalten.

Wang *et al.* generierten dazu, basierend auf der homologen Kristallstruktur der TyrRS aus *Bacillus stearothermophilus* eine Bibliothek von *Mj*TyrRS-Mutanten, bei denen fünf Reste im Umkreis von 6,5 Å um die *para*-Position des Arylrings des gebundenen Tyrosins randomisiert waren.^[46] Es folgte eine positive Selektionsrunde, die auf der Suppression eines Amber-Stopp-Codons im Chloramphenicolacetyltransferase-Gen (CAT), in Gegenwart der gewünschten NCAA und Chloramphenicol basierte. Die überlebenden Zellen wurden jetzt in einer negativen Selektionsrunde in Gegenwart von Chloramphenicol jedoch ohne die NCAA angezüchtet. Zellen die hier nicht überlebten wurden von einer Replikaplatte isoliert und die Gene ihrer *Mj*TyrRS-Mutanten durch *in vitro* DNA-Shuffling rekombiniert. Durch Wiederholen dieser Selektionsrunden mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen wurden die *Mj*TyrRS-Mutanten so weiter verbessert.^[45, 46] Bei einer Weiterentwicklung dieser Methode wurde eine negative Selektionsrunde eingeführt, die auf der Suppression von Amber-Stopp-Codons im Barnase-Gen ohne der Anwesenheit der NCAA beruht. Zellen die eine *Mj*TyrRS-Mutante exprimierten, die neben der NCAA auch eine kanonische Aminosäure auf die Suppressor-tRNA luden, starben ab und konnten auf diese Weise eliminiert werden.^[38, 42]

Ein anderes *in vivo* Screening Verfahren basiert neben dem CAT-Reporter auf dem amplifizierbaren Fluoreszenzreporter T7/GFPuv (pREP). Hierbei induziert die Suppression eines Amber-Stopp-Codons im Gen der T7-RNA-Polymerase die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFPuv). Infolgedessen können fluoreszierende und nichtfluoreszierende Zellen durch FACS (*fluorescence activated cell sorting*) getrennt werden.^[20, 47]

Obwohl es möglich war, ausgehend von *Mj*TyrRS/tRNA_{CUA}^{Tyr} eine ganze Reihe von orthogonalen Paaren mit für verschiedene NCAs spezifischen aaRSs herzustellen, so ist deren Entwicklung doch von strukturellen Grenzen im aktiven Zentrum der aaRS abhängig.^[48] Aus diesem Grund wurden noch zahlreiche zusätzliche orthogonale Paare für die Verwendung in *E. coli* adaptiert. Diese stammen u. a. aus *S. cerevisiae* (z. B. AspRS/tRNA^{Asp}, GlnRS/tRNA^{Gln}, TyrRS/tRNA^{Tyr} oder PheRS/tRNA^{Phe}) oder es handelt sich um „Hybrid-Paare“ deren aaRS und tRNA aus zwei verschiedenen Organismen stammen.^[48] Auch wurden Organismen entdeckt, die eine natürlich vorkommende Pyrrolsyl-tRNA-Synthetase (PylRS) besitzen, die die zugehörige tRNA_{CUA}^{Pyl} mit Pyrrolsins

aminoacyliert.^[49, 50] Dieses Paar konnte somit als orthogonales Paar in anderen Organismen genutzt werden.

Insgesamt können auf diese Weise bis jetzt schon mehr als 50 NCAs dem genetischen Code in *E. coli* hinzugefügt werden.^[48] Dabei muss der für die Herstellung des Zielproteins verwendete Stamm keine spezifischen Aminosäureauxotrophien aufweisen, da die mutierte aaRS im Idealfall ja nur noch die nicht-kanonische Aminosäure als Substrat erkennt und keine kanonische mehr. Für die Expression wird dem Medium die entsprechende nicht-kanonische Aminosäure zusätzlich zugesetzt. Diese muss für einen erfolgreichen Einbau allerdings effizient in das Cytoplasma transportiert oder aber durch den Wirt biosynthetisiert werden.^[38] Im Gegensatz zur weiter oben beschriebenen SPI Methode ist ein induzierbarer Promotor dabei nicht zwingend erforderlich, da die Translation des Zielproteins in Abwesenheit der beladenen Suppressor-tRNA am internen *in frame* Stop-Codon abbricht, und so nur ein trunkiertes (d. h. verkürztes) Proteinfragment entsteht. Erst in Gegenwart der nicht-kanonischen Aminosäure wird die Suppressor-tRNA beladen und der Einbau in das Zielprotein kann erfolgen (siehe Abb. 3).

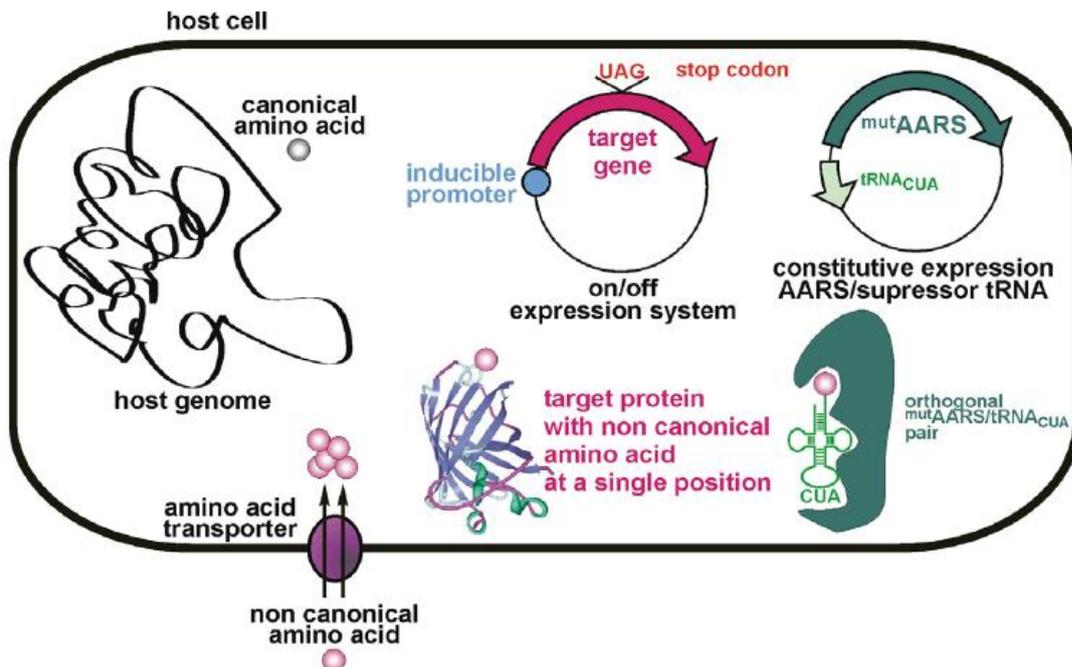


Abb. 3: Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren durch Stop-Codon Suppression.^[11]

1.3 Der erweiterte genetische Code in Eukaryoten

Das in *E. coli* entwickelte Verfahren zur genetischen Codierung von NCAAs sollte auch auf höhere eukaryotische Organismen übertragen werden, was die Generierung orthogonaler aaRS/Suppressor-tRNA Paare für diese Organismen erforderlich machte. Da die Sequenzidentität und die Identitätselemente der tRNAs von Prokaryoten und Eukaryoten stärker von einander abweichen, als die von Eukaryoten und Archaea oder von Eukaryoten untereinander, sind die meisten orthogonalen Paare für Eukaryoten aus bakteriellen Paaren abgeleitet worden.^[15]

Für die Transkription von tRNA-Genen sind in eukaryotischen Zellen die RNA-Polymerase III und ihre assoziierten Faktoren, die spezielle A- und B-Box-Sequenzen im tRNA-Gen erkennt, verantwortlich.^[51] Manchen bakteriellen tRNAs fehlen diese A- und B-Box-Sequenzen teilweise, wodurch sie in Eukaryoten ohne entsprechende Modifizierung, nur ineffizient biosynthetisiert oder prozessiert werden.^[33, 52] Auch wird in Eukaryoten, im Gegensatz zu *E. coli*, die CCA-Sequenz am 3'-Ende der tRNA enzymatisch durch spezielle tRNA-Nucleotidyltransferasen angefügt, was ein Entfernen dieser 3'-CCA-Sequenz bei aus *E. coli* importierten tRNA-Genen notwendig machen kann.^[53] Manchmal kann es, um funktionelle tRNAs zu erhalten auch erforderlich sein, spezifische 5'- und 3'-flankierende Sequenzen anzufügen, Introns herauszunehmen, oder den Export in das Cytoplasma durch einen Exportin-abhängigen Prozess zu ermöglichen.^[54-56]

Eines der für den Einbau von NCAAs in *Saccharomyces cerevisiae* entwickelten orthogonalen Paare ist das, auch im Rahmen dieser Arbeit verwendete Amber-Suppressor TyrRS/tRNA_{CUA} Paar aus *E. coli*. Es ist bekannt, dass *E. coli* Tyrosyl-tRNA_{CUA} ein schlechtes Substrat für *S. cerevisiae* aaRSs ist und in Gegenwart der *E. coli* TyrRS als ein Amber-Suppressor agiert. Auch aminoacyliert die *E. coli* TyrRS keine Hefe-tRNAs.^[57, 58]

Daneben existieren noch weitere Paare für Hefe, wie etwa das *E. coli* LeuRS/tRNA^{Leu}, oder das *M. mazei* PylRS/tRNA^{Pyl} Paar.^[59, 60] oder auch das von der *E. coli* GlnRS und humaner Initiator-tRNA abgeleitete GlnRS/tRNA_{CUA}^{Gln} Paar,^[61] das auch für eine effiziente Amber-Suppression in Säugerzellen benutzt wurde.^[33]

Um eine Substratspezifität der verwendeten aaRSs, für eine gewünschte NCAA zu erzeugen, musste ein Screening Verfahren für Hefe (analog zum *E. coli*-System)

entwickelt werden. Dazu generierten Chin *et al.* einen speziellen, *HIS3* und *URA3* auxotrophen *S. cerevisiae* Selektionsstamm, der das transkriptionelle Aktivatorprotein GAL4 enthält. Zwei Codons der GAL4-Sequenz wurden dabei zu Amber-Stop-Codons mutiert. Dieser Stamm kann mit einer Plasmid-Bibliothek transformiert werden, die Mutanten der aaRS und die zugehörige tRNA_{CUA} enthält. Die Suppression der Amber-Codons produziert das Volllängenprotein GAL4, das wiederum die Transkription der auf GAL4 responsiven *HIS3*-, *URA3*- und *lacZ*-Reporter-Gene induziert. Die Expression von *HIS3* und *URA3* komplementiert die Auxotrophie für Histidin und Uracil dieses Stammes und bringt positiv selektierte Klone hervor, die aktive aaRS/tRNA_{CUA} Paare exprimieren. Hingegen verursacht ein Zusatz von 5-Fluororotsäure (5-FOA), die durch *URA3* in ein toxisches Produkt (5-Fluoruracil) umgewandelt wird, den Zelltod bei Zellen, die aktive aaRS/tRNA_{CUA} Paare exprimieren. In Abwesenheit einer NCAA ist dies eine negative Selektion zur Entfernung von Synthetasen, die für kanonische Aminosäuren spezifisch sind. Das *lacZ*-Reporter-Gen dient dabei als zusätzlicher Farbmärker um aktive aaRS von inaktiven zu unterscheiden (siehe Abb. 4).^[62]

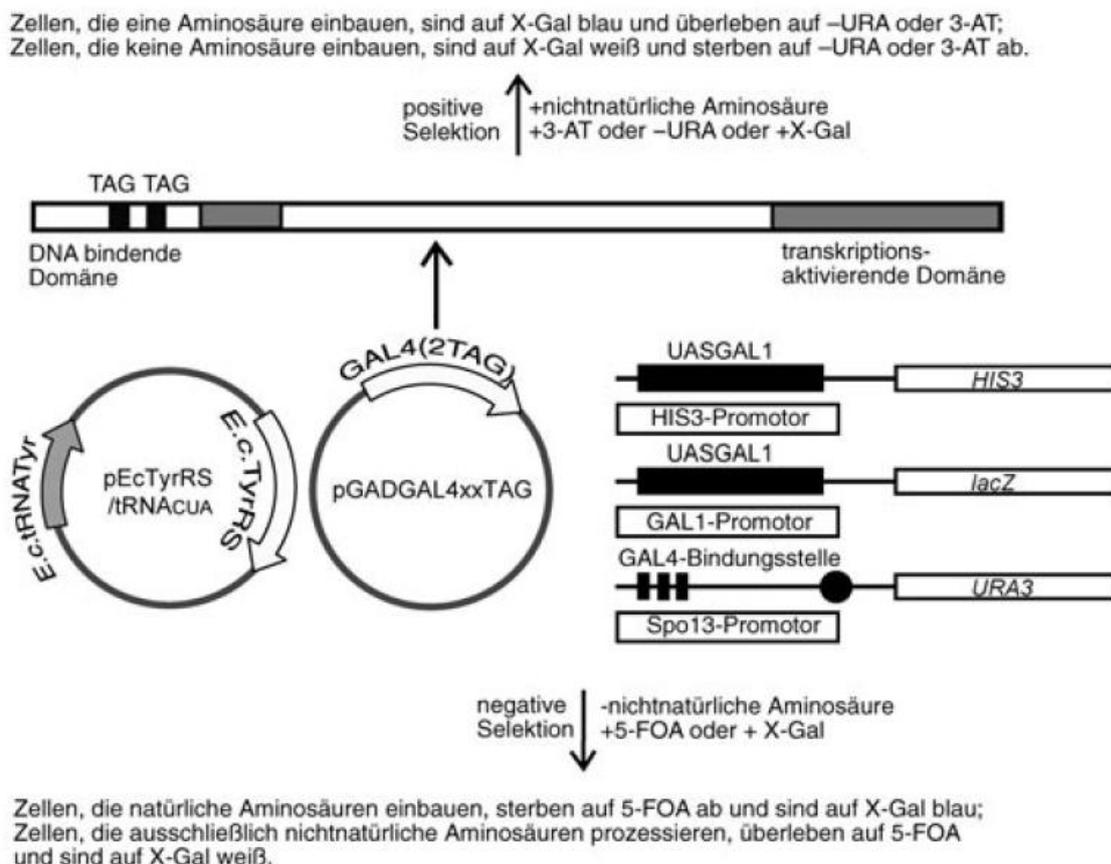


Abb. 4 Selektionsschema für NCAA-spezifische aaRS Mutanten in *S. cerevisiae*.

(Abb. aus Wang *et al.*^[15])

Im Falle des von der Gruppe von P. G. Schultz entwickelten *E. coli* TyrRS/tRNA_{CUA} Paares^[62, 63] wurden eine ganze Reihe verschiedener TyrRS Mutanten für die spezifische Erkennung von verschiedenen NCAAs wie etwa *p*-Azido-L-phenylalanin (AzF), *p*-Propargyloxy-L-phenylalanin (PxF) oder *p*-Benzoyl-L-phenylalanin (Bpa) (siehe Abb. 9) entwickelt. Dazu wurden auf der Grundlage der Kristallstruktur der homologen TyrRS aus *Bacillus stearothermophilus* fünf ausgewählte Reste in der Bindetasche und im aktiven Zentrum der *E. coli* TyrRS zufällig mutiert und in drei Runden (positiv/negativ/positiv) des oben beschriebenen Screenings in Hefe die gewünschten Mutanten selektioniert.^[62-64]

Chin *et al.* verwendeten anschließend rekombinante humane Superoxiddismutase 1 (hSOD1) als Modellprotein, in das sie verschiedene NCAAs einbauten. hSOD1 enthielt dabei am C-Terminus einen Hexahistidin-Tag (6×His-Tag) und an Position 33 ein *in frame* Amber-Stop-Codon (TGA). Nur bei einem erfolgreichen Einbau der NCAA an Position 33 wurde die volllängen hSOD1 mit 6×His-Tag exprimiert, die dann aufgereinigt oder über Immunoblot nachgewiesen werden konnte. NCAAs enthaltende hSOD1-Varianten wurden mit einer Ausbeute von etwa 50 ng/ml erhalten, während für Wildtyp hSOD1 eine Ausbeute von 250 ng/ml erzielt wurde.^[63]

Auf vergleichbare Weise konnten neben den Paaren der *E. coli* TyrRS/tRNA_{CUA} auch eine Reihe von, auf dem *E. coli* LeuRS/tRNA^{Leu} Paar basierenden orthogonalen Paare entwickelt werden, was das Hinzufügen von mehr als 22 NCAAs zum genetischen Code von *S. cerevisiae* ermöglicht.^[60, 63-69] Diese aaRS/tRNA_{CUA} Paare behalten darüber hinaus auch ihre Aktivität und Orthogonalität wenn sie in *Pichia pastoris* verwendet werden.^[48] Dadurch ist eine Produktion von großen Mengen an rekombinanten Proteinen und die Kontrolle über Glykosylierungsmuster möglich.^[48, 70]

Nachteilig an der SCS Methode ist, neben der recht aufwendigen Generierung von neuen für NCAAs spezifische aaRS Mutanten, auch das Problem der Suppressionseffizienz. Wie schon weiter oben erwähnt ist diese zum einen von der, das Stop-Codon umgebenden DNA-Sequenz abhängig.^[36] Durch die rationale Auswahl des zu mutierenden Codons, oder durch das Austesten mehrere Stop-Codons an verschiedenen Positionen im Zielgen, kann dem entgegengewirkt werden. Zum andern besteht Konkurrenz der Suppressor-tRNAs mit den *Release* Faktoren (RF) der Translations-Termination. Hier wurde versucht, durch speziell entwickelte orthogonale Ribosomen, die nur mRNAs mit artifiziellen 5'-Sequenzen

translatieren und durch Mutationen eine verringerte Interaktion mit den *Release* Faktoren zeigen, eine vorzeitige Termination zu verhindern.^[71] Darüber hinaus ist die Suppression abhängig von der Anzahl der in der Zelle vorkommenden Kopien der Suppressor-tRNA. Chen *et al.* haben hier in einem verbessertem System für Hefe versucht, dieses Problem durch 3 Kopien der tRNA_{CUA} auf dem Expressionsvektor, zusammen mit einem optimierten Promotor und 5'- + 3'-flankierenden Regionen des Hefe *SUP4* Gens, zu lösen.^[37] Und schließlich kommt es in eukaryotischen Zellen zum sogenannten *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). D. h. mRNAs, die ein vorzeitiges Stop-Codon im offenen Leseraster der mRNA besitzen, werden durch einen Kontrollmechanismus der Zellen erkannt und abgebaut.^[72] Dieses Problem kann durch die Verwendung von NMD defizienten *S. cerevisiae* Stämmen umgangen werden.^[73]

Da die Seitenketten von den NCAs AzF, PxF und Bpa (vergl. Abb. 9) effiziente Instrumente für *in vitro* Bio-orthogonale Transformationen wie z. B. Click-Chemie (AzF und PxF) bzw. für *in vivo* Foto-Quervernetzung von Proteinen (Bpa)^[12, 74] sind, war es für uns von großem Interesse, diese Methode für unterschiedliche Zielproteine zu etablieren. Daher beschlossen wir als ersten Schritt, die Expression von hSOD1 in *S. cerevisiae* mit den genannten NCAs in unserem Labor zu etablieren. Der Vorteil der Genexpression in Hefe liegt dabei in der Möglichkeit, im Gegensatz zu *E. coli*, auch Proteine exprimieren zu können, die posttranslational modifiziert werden.

1.4 Industrielle Biotechnologie - Design von Lipase-Kongeneren

Ein anderer Ansatz, als die oben beschriebene SCS Methode in *S. cerevisiae*, sollten im zweiten Teil dieser Doktorarbeit verwendet werden. Dabei sollten Protein-Kongeneren einer als Biokatalysator industriell relevanten Lipase, unter Verwendung der *Supplementation Based Incorporation* Methode in *E. coli* hergestellt werden.

Die Industrielle oder Weiße Biotechnologie nutzt Enzyme bzw. Mikroorganismen als Ganzzellkatalysatoren um Chemikalien, Werkstoffe und Kraftstoffe aus erneuerbaren Quellen nachhaltig zu produzieren.^[75] Dieses Gebiet verspricht die Optimierung von Prozessen bei niedrigeren Betriebskosten und Investitionsausgaben, was einen bedeutenden marktwirtschaftlichen Vorteil gegenüber klassischen Produktionsverfahren darstellt.^[76] Die Errungenschaften

und Verheißungen von *Enzym Engineering*, *Metabolic Engineering*, synthetischer Biologie und Systembiologie dürften zusätzlich zu einer Beschleunigung der Entwicklung der Industriellen Biotechnologie führen.^[75, 77] Darüber hinaus könnte das *Engineering* von Mikroorganismen oder Enzymen, in Kombination mit verschiedenen Verfahren für eine effizientere Produktion, einen Paradigmenwechsel von einer auf fossilen Brennstoffen beruhenden hin zu einer biologisch basierten Produktion von Chemikalien, wie etwa Biodiesel, darstellen.^[75] Ein weiterer Vorteil der Industriellen Biotechnologie liegt schließlich darin, dass moderne industrielle Biotechnologieprozesse sehr stark mit reduziertem Energieverbrauch, geringerem Abfallaufkommen und einer geringeren Emission von Treibhausgasen verbundenen sind.^[76]

1.4.1 Neue Wege zum optimierten Enzym

Eines der wichtigsten Werkzeuge für die Industrielle Biotechnologie ist das *Protein Engineering*, da native Enzyme selten die ideale Kombination von Eigenschaften und Aktivitäten aufweisen, die für den industriellen Einsatz benötigt werden.^[78] Daher müssen Biokatalysatoren optimiert werden, um in teilweise extremen Prozessbedingungen wie der Exposition gegenüber Lösungsmitteln oder denaturierenden Zusätzen, über einen längeren Zeitraum funktionieren zu können. In der Vergangenheit war die Suche geeigneter Biokatalysatoren hauptsächlich auf Enzyme beschränkt, die in der Natur gefunden wurden.^[79]

Mit dem Aufkommen von rekombinanten DNA-Technologien, war eine Enzym-Optimierung über rationale und gerichtete Evolutions-Methoden (Zufallsmutagenese und *DNA-Shuffling*) möglich, die Biokatalysatoren mit veränderter Spezifität, Selektivität und Stabilität hervorbrachte.^[80] Gemeinsam ist all diesen Verfahren, dass sie in den Bereich des klassischen *Protein Engineerings* gehören und zunächst eine Bibliothek von Gen-Mutanten erstellt werden muss, deren Proteinprodukte anschließend auf die gewünschten Eigenschaften hin selektioniert werden müssen.^[81] Diese funktionellen Screenings sind nicht immer trivial und darüber hinaus können v. a. lange Protein-Sequenzen nicht problemlos permutiert werden. Auch erfordern rationale Methoden oft strukturelle Informationen, die nicht immer verfügbar sind.^[81]

Anstatt klassische Mutanten zu erzeugen, wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit analysiert, durch gezielte chemische Modifikationen die Enzymaktivität zu

manipulieren. Diese werden voraussichtlich keine wesentlichen strukturellen Störungen in einem Enzym verursachen, aber neue physikalisch-chemischen Eigenschaften liefern.^[82, 83] Im Rahmen des Standard-Aminosäurerepertoires, könnte dies durch Austauschen von etwa Ser/Ala/Cys, Thr/Val, Glu/Gln, Asp/Asn oder Tyr/Phe erreicht werden. Jedoch sind solche Änderungen nicht möglich für andere kanonische Aminosäuren wie Met oder Pro, welche oft eine entscheidende Rolle in der Struktur und funktionellen Integrität eines Enzyms spielen. Isostrukturelle Analoga dieser kanonischen Aminosäuren sind nur in Form von nicht-kanonischen (vor allem synthetischen) Aminosäuren verfügbar, die vom universellen genetischen Code nicht codiert werden. Sie ermöglichen gezielte Manipulationen auf der Ebene von einzelnen Atom-Substitutionen wie etwa H/F, S/CH₂ oder H/OH. Diese „atomaren Mutationen“^[82, 84] können durch translationalen Einbau von synthetischen Aminosäureanaloga mit Hilfe der SPI Methode, an Stelle ihrer kanonischen Pendants eingeführt werden (vergl. 1.2.1).

Obwohl bereits mehrere Studien zur Verbesserung der Enzymkatalyse mithilfe isostruktureller Aminosäureanaloga veröffentlicht wurden,^[85-89] fehlt bisher eine systematische Untersuchung zu den Auswirkungen der Inkorporation einer größeren Anzahl von verschiedenen Analoga auf die Enzymaktivität und Substraterkennung.

1.4.2 Lipasen – vielseitige Biokatalysatoren

Extrazelluläre Lipasen (EC 3.1.1.3) gehören zu den vielseitigsten Biokatalysatoren und werden aufgrund ihrer Lösemittelbeständigkeit, breiten Substratspezifität und Hydrolyse- sowie Synthese-Aktivität für viele wichtige industrielle Prozesse verwendet.^[90]

Lipasen hydrolysieren Triglyceride in Glycerin und Fettsäuren (Lipolyse), oder sie katalysieren unter Bedingungen mit niedrigem Wassergehalt die umgekehrte Reaktion (siehe Abb. 5).

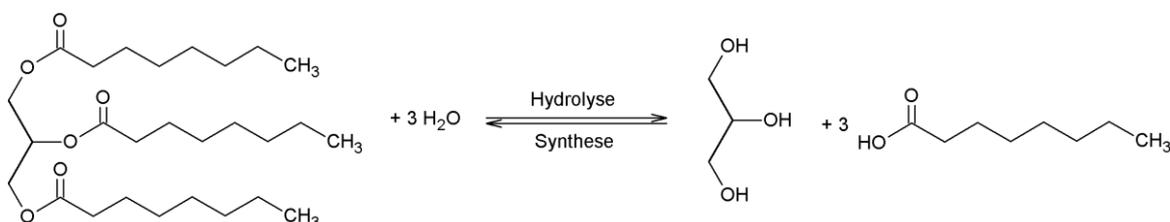


Abb. 5 Lipase Reaktion.

Lipasen katalysieren sowohl die Hydrolyse von Triglyceriden in Glycerin und Fettsäuren als auch die Synthese von Triglyceriden (Rückreaktion).

Lipasen sind weit verbreitet um Fette und Öle in der Lebensmittel-, Kosmetik-, Leder-, Textil- und Waschmittelindustrie abzubauen. Ihre Aktivität und Stabilität kann von Tensiden und Detergenzien beeinflusst werden, wenn diese zum Reaktionsmedium zugegeben werden. Und nachdem gezeigt werden konnte, dass sie in nahezu 100%igen organischen Lösungen aktiv waren,^[91] entwickelten sich Lipasen zu idealen Werkzeugen in der organischen Chemie.

In Gegenwart einer Säure können Lipasen einen Alkohol verestern, oder einen Ester mit einem zweiten Alkohol (Alkoholyse), einer Säure (Acidolyse) oder einem weiteren Ester umestern. Auf diese Weise werden Lipasen für spezifische regioselektive Reaktionen in organischen Lösungsmitteln bei der Produktion von Enantiomeren verwendet.^[92] Diese hydrolytische und synthetische Vielseitigkeit von Lipasen macht sie zu den attraktivsten und am meisten verwendeten Biokatalysatoren. Daher ist der Lipase-Sektor kommerziell sehr interessant und es werden ständig neue Anwendungen gesucht, wie etwa aus den Bereichen der Nahrungsmittelindustrie (insbesondere die Reduktion von Fetten oder die Steigerung der Aromausbeute), der Abfallwirtschaft, dem biologischen Abbau von Öl, oder der Produktion von Biokraftstoffen, Pestiziden und biologisch abbaubaren Polymeren.^[93] Aus diesen Gründen ist der Bedarf an der Identifizierung weiterer Enzyme oder der Optimierung bereits vorhandener besonders groß und wird auch noch durch eine schnell steigende Nachfrage nach Feinchemikalien verstärkt.^[93] Schließlich ist auch die pharmazeutische Industrie ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet, da Krebs-, Alzheimer-, antivirale-, Blutdruck oder Cholesterin senkende und entzündungshemmende Medikamente mit Lipase-basierten Verfahren hergestellt werden.^[94]

Die Lipolyse erfolgt dabei ausschließlich an der Lipid-Wasser-Grenzfläche, an der die Konzentration an Lipase-Molekülen direkt die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Allerdings folgt die Kinetik einer Lipase-Reaktion nicht dem klassischen Michaelis-Menten-Modell, da dies nur für lösliche Enzyme und Substrate gültig ist. Vielmehr kommt es zu einem starken Anstieg der Lipase-Aktivität, wenn die Löslichkeitsgrenze des Substrats überschritten wird und das Substrat eine Emulsion bildet.^[95] Im Gegensatz dazu ist die Esterase-Aktivität von der Substratkonzentration abhängig und folgt der Michaelis-Menten-Kinetik, wobei die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, lange bevor die Lösung mit Substrat gesättigt ist.^[95]

Es wurde deshalb folgendes Modell zur Beschreibung der Lipase Kinetik vorgeschlagen (Abb. 6).^[96, 97]

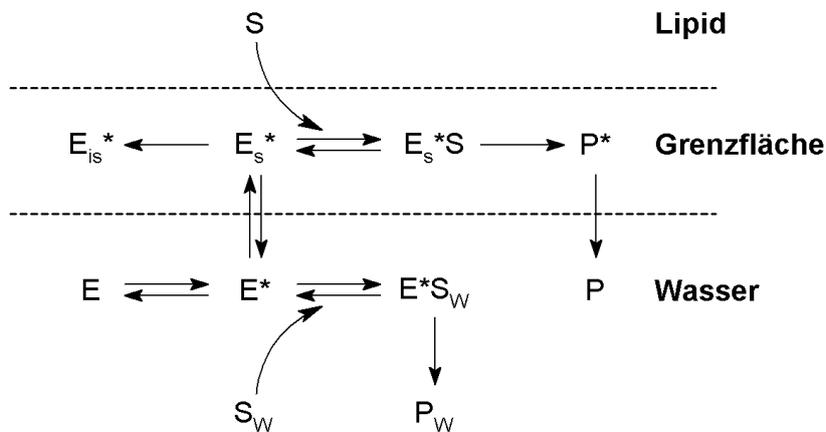


Abb. 6 Modell der Lipase Kinetik.

Dieses Modell zeigt sowohl die Esterase Aktivität einer Lipase (E), bei der wasserlösliche Substrate (S_w) in einer der Michaelis-Menten-Kinetik folgenden Reaktion umgesetzt werden. Als auch die an der Lipid-Wasser-Grenzfläche stattfindende Lipase-Aktivität. Hierbei bildet das aktivierte (E^*) und an der Grenzfläche adsorbierte Enzym (E_s^*) zusammen mit dem wasserunlöslichen Substrat (S) einen Enzym-Substrat-Komplex (E_s^*S). Nach der Katalyse entsteht hieraus das Produkt (P^*), das dann in der wässrigen Phase gelöst wird (P). Das wieder frei werdende Enzym (E_s^*) kann nun wieder die nächste Reaktion katalysieren, oder seine Aktivität verlieren (E_{is}^*).

Der erste Schritt besteht aus einer Akkumulation der Lipase an der Lipid-Wasser-Grenzfläche, ein Schritt der die Aktivierung des Enzyms, d. h. die Öffnung des Deckels (siehe dazu weiter unten), einschließen kann. Im zweiten Schritt wird der Komplex zwischen der Lipase und dem Substrat geformt. Nach erfolgter Katalyse wird das gebildete Produkt freigesetzt und kann sich in der wässrigen Phase lösen. Das freiwerdende, regenerierte Enzym bleibt an der Grenzfläche adsorbiert und steht für die nächste Reaktion zur Verfügung.^[97]

Die Lipase-Reaktion wird von einem nucleophilen Ser, einem His und einem sauren Asp katalysiert (katalytische Triade). Der detaillierte Mechanismus ist in Abb. 7 dargestellt.^[97]

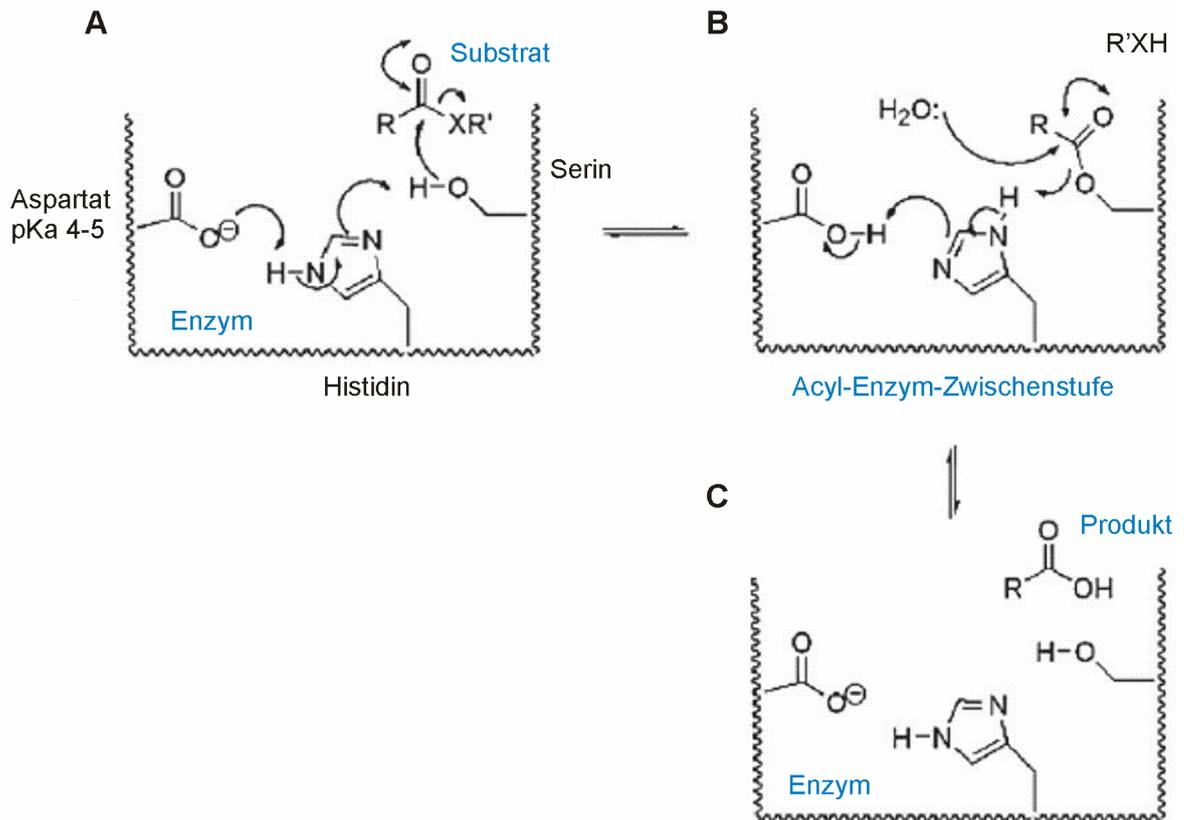


Abb. 7 Mechanismus der Lipase-Katalyse.

(A): Aktivierung von Serin und nucleophiler Angriff des Serins an der Carbonylgruppe des potenziellen Substrats unter Bildung einer Acyl-Enzym-Zwischenstufe (B). In diesem Schritt werden die Ladungen neutralisiert, was zur Bildung des *oxyanion holes* führt. (C): Freisetzung des Produktes und Regeneration der katalytischen Reste. (Abb. modifiziert aus Reis *et al.*^[97])

Im ersten Schritt wird Serin durch Deprotonierung, für die Histidin und Aspartat erforderlich sind, aktiviert (Abb. 7 A). Somit ist die Nucleophilie der Hydroxylgruppe des Serin verstärkt und sie greift die Carbonylgruppe des Substrats an, was zu der Bildung einer Acyl-Enzym-Zwischenstufe führt (Abb. 7 B). Das Vorhandensein eines *oxyanion holes* trägt zur Stabilisierung der Ladungsverteilung und zur Reduktion der Grundzustandsenergie der tetraedrischen Zwischenstufe bei. Der Deacylierungsschritt, der in Abb. 7 C dargestellt ist, wird durch die Elektronegativität der Moleküle die an der Grenzfläche sitzen, kontrolliert. In diesem Schritt greift ein Nucleophil (z.B. H₂O oder Monoglycerid) das acylierte Enzym an, was zu einer Freisetzung des Produktes und der Regeneration des katalytischen Zentrums führt.^[96, 97]

Obwohl Lipasen oft keine klaren Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz haben, zeigen sie doch alle eine ähnliche räumliche Struktur.^[98] Dabei handelt es sich um die häufigste natürliche Proteinfaltung, die kanonische α/β -Hydrolase-Faltungen. Diese ist aufgebaut aus acht, im Zentrum der Lipasen nahezu parallel

angeordneten β -Faltblättern (mit Ausnahme des zweiten β -Faltblattes, welches invers in die Struktur eingeordnet ist), die wiederum von α -Helices eingeschlossen sind^[98] (vergl. Abb. 8). Die kanonische α/β -Hydrolase-Faltungen wird durch die Gegenwart einer katalytischen Triade gekennzeichnet, die aus einem Nucleophil (Ser, Cys oder Asp), einem streng konservierten His und einem sauren Asp- oder Glu-Rest (im Fall von Lipasen) gebildet wird.^[99] Um die Katalyse zu ermöglichen, sind strukturelle Veränderungen rund um das aktive Zentrum nötig. Dieser Prozess ist durch die Bewegung oder „Öffnung“ der helikalen Deckel- oder *lid*-Domäne, die das aktive Zentrum des Enzyms verdeckt (siehe Abb. 8 und Abb. 25), gekennzeichnet.^[100] Dieser flexible Deckel ist bei vielen Lipasen mit dem Enzymkern verbunden und er ist zwischen verschiedenen Organismen stark konserviert.^[101] Daher haben Lipasen sowohl eine offene und eine geschlossene Konformation, doch in der wässrigen Phase ist das Gleichgewicht in Richtung der inaktiven, geschlossenen Form verschoben.^[96]

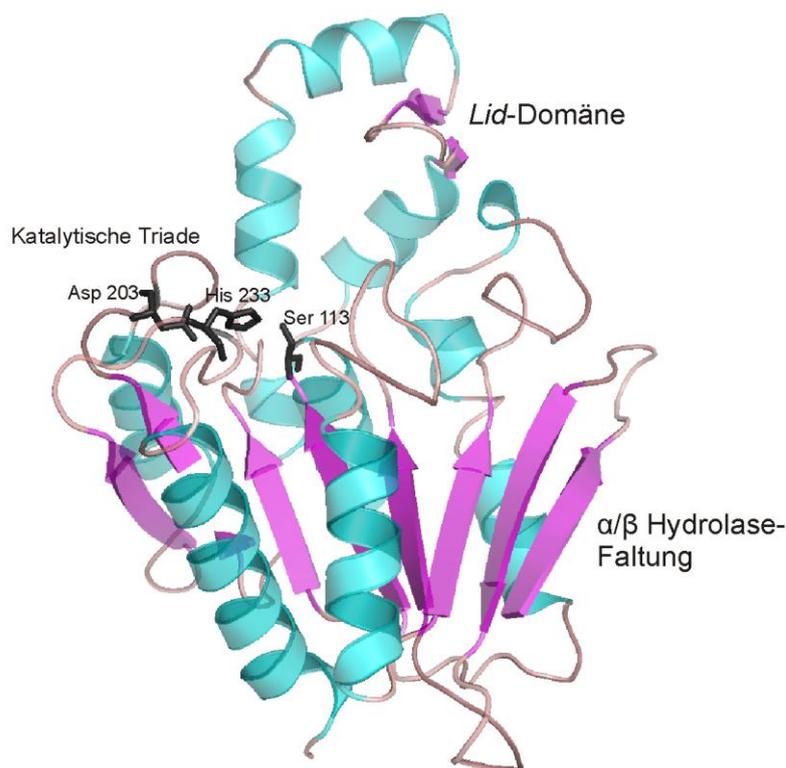


Abb. 8 Strukturelle Merkmale von Lipasen.

3D-Strukturmodell der Lipase aus *T. thermohydrosulfuricus* (TTL) (Details siehe 3.4) zu Verdeutlichung der strukturellen Merkmale von Lipasen: Die kanonische α/β -Hydrolase-Faltung ist aus acht, im Zentrum der Lipasen nahezu parallel angeordneten β -Faltblättern (in violett), die von α -Helices (in türkis) umschlossen sind, aufgebaut. Die katalytische Triade besteht aus einem Nucleophil (hier Ser113), einem streng konservierten His (His233) und einem sauren Asp- oder Glu-Rest (Asp203). Die flexible Deckel- oder *lid*-Domäne, kann das aktive Zentrum des Enzyms verdecken und ist durch mehrere α -Helices gekennzeichnet. TTL ist hier in der offenen Konformation dargestellt.

Wenn das Enzym an der Lipid-Wasser-Grenzfläche der mizellaren oder emulgierten Substrate tätig ist, kommt es zu einer Grenzflächenaktivierung.^[96, 102] Dabei bewegt sich der Deckel vom aktiven Zentrum weg, was zu dessen vollständiger Freilegung und einer Aktivierung des Enzyms führt. Einige Lipasen zeigen darüber hinaus die ungewöhnliche Eigenschaft der thermischen Aktivierung, die sich auf das Phänomen bezieht, dass die Enzyme erst bei Temperaturen von über 40 °C aktiviert werden. Dies ist zum Beispiel bei Lipasen aus *Pseudomonas aeruginosa*,^[95, 103, 104] *P. glumae*^[105] oder *Candida Antarctica*^[106] der Fall, die alle einen amphiphilen Deckel für das aktive Zentrum haben.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten in der Hefe *S. cerevisiae* Proteine exprimiert werden, die durch den ortsspezifischen Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren post-translational chemisch derivatisierbare, funktionellen Gruppen enthalten. In einem nächsten Schritt hätten diese Gruppen dann über Staudinger Ligation oder [2+3]-Cycloaddition selektiv modifiziert werden können.

Dazu sollte die von der Gruppe von P. G. Schultz entwickelte Methode zum *in vivo* Einbau der nicht-kanonischen Aminosäuren AzF, PxF und Bpa durch Suppression von *in frame* Amber-Stop-Codons in *S. cerevisiae* rekonstruiert und diese NCAs in das Modellprotein hSOD1 eingebaut werden. Zusätzlich sollte eine umfassende Analyse der verwendeten *E. coli* TyrRS Mutanten in Bezug auf die Aktivierung von Tyr und der NCAs mit Hilfe des ATP-Pi-Austausch-Assays durchgeführt werden.

Ein alternatives Verfahren zur Erweiterung des genetischen Codes, diesmal in Prokaryoten, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit Verwendung finden.

Dabei sollte das Potential der *Supplementation Based Incorporation* Methode bei dem Design von neuen industriell relevanten Biokatalysatoren beurteilt werden. Hierfür wurde die, in *E. coli* exprimierte Lipase aus dem thermophilen, anaeroben Bakterium *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (TTL) verwendet. Durch einen proteinweiten Austausch aller Phenylalanine, Proline und Tyrosine gegen entsprechende nicht-kanonische Aminosäureanaloga sollten Lipase-Kongenere hergestellt werden, die anschließend auf Einbaueffizienz und Veränderungen in Enzymaktivität und -stabilität hin untersucht werden sollten.

5'tyr muta 3306-2	GGTAGCCCAGGTGACGGACGAGGAAGCGTTAGCA GAGCGACTGGCGCAAGGCCCGATCGCACTCCTTTG TGGCTTCGA	
5'tyr muta 3306-3	CATGCATG GAATTC ATGGCAAGCAGTAACTTGATT AAACAATTGCAAGAGCGGGGGCTGGTAGCCCAGG TGACGGA	<i>EcoRI</i>
Thr37f	CCGATCGCACTCACGTGTGGCTTCGATCCTACCG	-
Thr37r	ATCGAAGCCACACGTGAGTGCGATCGGGCCTTGC	-
Ala183f	CAGGGTTATTCGGCTGCCTGTGCGAACAAACAGT	-
Ala183r	GTTTCGCACAGGCAGCCGAATAACCCTGCAACAGG	-
Leu186f	TCGGCTGCCTGTCTTAACAAACAGTACGGTGTGG	-
Leu186r	GTA CTGTTTGTTAAGACAGGCAGCCGAATAACCC	-
hSODfp	CATGCATGCATG AAGCTT ATGGCGACGAAGGCC	<i>HindIII</i>
hSODrp	CATGCATGCATG GAATTC CAATGGTGATGGTGAT <u>GATGTTGGGCGATCCCAATTAC</u>	<i>EcoRI</i> / Hexahistidin-Tag
SODmutf	AAGGTGTAGGGAAGCATTAAAG	-
SODmutr	GCTTCCCTACACCTTCACTGGT	-
PGK1fp	GCTTAATGGGGCGCTACAGGGCGCGTGGGGATGA TCCACTAGTACTTCAACTCAAGACGCACAGATATTA TAACATCTGC	-
PGK1rp	CTTAATATCCCTATAGTGAGTCGTATTACAGCTGT GTTTTATATTTGTTGTA AAAAGTAGATAATTACTTCC TTGATGA	-
hSOD1_Strep_f p	AGGAAACGCTGGAAGTCGTTTGGCTTGTGGTGTA TTGGGATCGCCAAAGCGCTTGGAGCCACCCGCAG	<i>Strep-Tag II</i>
hSOD1_Strep_r p	CCCTCTAGATGCATGCTCGAG CGGCCG CAGTGT GATGGATATCTGCAG GAATTC TTATTTTTCGAACTGC <u>GGGTGGCTCC</u>	<i>NotI, EcoRI</i> / <i>Strep-Tag II</i>
azPheRS1- (6xHis)_fp	TCTTGCAATTGTTAATCAAGTTACTGCTTGCCATA <u>TGGTGATGGTGATGATGCATGAATTCAGTTGATTG</u> TATGCTTGG	<i>EcoRI</i> / Hexahistidine-Tag
azPheRS1- (6xHis)_rp	TTCTGGCAACCAAACCC	-
TTLpf	tatatctatatc GAATTC ATTAAGAGGAGAAATTAAG CATGCAAAAGGCTGTTGAAATTACATATAAC	<i>EcoRI</i>
TTLpr	cgtgccggcgg CTGCAG TTATCAGTGATGGTGATGGT <u>GATGGGATCCTCCCTTTAACAATTCCTTTTTGAAAA</u> ACT	<i>PstI</i> / Hexahistidine-Tag

2.6 Antikörper

- mouse anti *Strep*-Tag II antibody MAB-Classic IBA, Göttingen,
Deutschland
- mouse anti 6×His-Tag antibody (GTX74699) GeneTex, Irvine,
USA
- goat anti mouse IgG HRP Conjugate Bio-Rad, Hercules,
CA, USA

2.7 Standards

- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Fermentas, St. Leon-Rot
- Page Ruler Prestained Protein Ladder Fermentas, St. Leon-Rot

2.8 Präparationskits

- Plasmid Mini Kit Qiagen, Hilden, Deutschland
- Plasmid Midi Kit Qiagen, Hilden, Deutschland
- QIAquick Gel-Extraction Kit Qiagen, Hilden, Deutschland
- QIAquick PCR Purification Kit Qiagen, Hilden, Deutschland

2.9 Dialyse- und Blotting-Membranen

- Nitrocellulose: 0,025 µm, (White VSWP, 13 mm ø)
Millipore, Billerica, MA, USA
- Spectra/por molecularporous membrane (MWCO: 3500)
Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez CA, USA
- Blotting Membran; Protran 0,1 µm
Whatman International Ltd, Maidstone Kent, UK

2.10 Chromatographiesäulen

- HiTrap Chelating HP Ni-NTA Agarose™ Säule Amersham
Pharmacia, Freiburg, Deutschland
- *Strep*-Tactin Sepharose Säule IBA, Göttingen, Deutschland

2.11 Konzentratoren

- Microcon[®]-Konzentratoren (10 kDa MWCO) Millipore,
Billerica, MA, USA
- Centriprep[®]-Konzentratoren (15/50 ml) Amicon, Beverly,
MA, USA

2.12 Puffer

Alle verwendeten Puffer wurden mit Millipore gefiltertem, demineralisiertem Wasser hergestellt und vor Gebrauch, falls erforderlich, sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße).

2.12.1 Puffer für Agarosegele

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde 1× TAE-Puffer (Tris/Essigsäure/ EDTA) als Laufpuffer verwendet.

50× TAE-Puffer:

- 24,2 % (w/v) Tris
- 5,71 % (w/v) Essigsäure
- 3,72 % (w/v) Na₂EDTA × 2 H₂O

mit HCl auf pH 8,0 einstellen

1× TAE-Puffer:

- 50× TAE-Puffer 1:50 (v/v) mit ddH₂O verdünnen.

1 % Agarose-Gel:

- 1 g Agarose
- 100 ml 1× TAE-Puffer
- 5 µl Ethidiumbromid (0,5 mg/ml)

Agarose-Auftragspuffer:

- 6× Loading Dye New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.12.2 Puffer für SDS-Gele

Für die SDS-Gelelektrophorese wurde 1× SDS-PAGE Laufpuffer als Laufpuffer verwendet.

10× SDS-PAGE Laufpuffer:

- 0,25 M Tris
- 1,92 M Glycin
- 1 % (w/v) SDS

auf pH 8,3 einstellen (mit HCl)

1× SDS-PAGE Laufpuffer:

- 10× SDS-PAGE Laufpuffer 1:10 (v/v) mit ddH₂O verdünnen.

4× Trenngel-Puffer (1,5 M Tris/Cl pH 8,8):

- 1,5 M Tris
- 0,4 % SDS

auf pH 8,8 einstellen (mit HCl)

4× Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris/Cl pH 6,8):

- 0,5 M Tris
- 0,4 % SDS

auf pH 6,8 einstellen (mit HCl)

5× SDS-Auftragspuffer:

- 0,08 M Tris/Cl pH 6,8
- 10 % SDS
- 12,5 % Glycerin
- 4 % (v/v) β-Mercaptoethanol
- 0,2 % (w/v) Bromphenolblau

auf pH 6,8 einstellen (mit HCl)

Coomassie-Lösung:

- 40 % (w/v) EtOH
- 10 % (v/v) Eisessig
- 0,1 % (w/v) Coomassie-Blau R-250

2.12.3 Puffer für Immunoblot

10× Transfer-Puffer:

- 1,92 M Glycin (144 g/l)
- 1 % SDS (10 g/l)
- 0,25 M Tris (30 g/l)

1× Transfer-Puffer:

- 10× Transfer Puffer (100 ml/l)
- MeOH 200 (ml/l)
- ad 1 l mit ddH₂O

Endkonzentration: 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 25 mM Tris und 20 % (v/v) Methanol.

Ponceau S stain:

- 0,5 % (w/v) in 1 % (v/v) Essigsäure (0,5 g / 100 ml)

10× TBS:

- 0,5 M Tris (60 g/l)
- 1,5 M NaCl (87 g/l)
- mit HCl auf pH 8,0 eistellen

1× TTBS:

- 10× TBS (25ml / 250 ml)
- 0,1 % Tween20 (250 µl / 250 ml)
- ad 250 ml mit ddH₂O

1× TTBS + 3 % BSA:

- 1× TTBS 50 ml
- 3 % Bovine Serum Albumin (1,5 g / 50 ml)

Pierce Super Signal® West Pico:

Pierce, Rockford, IL, USA

- Luminol Enhancer Solution
- Stable Peroxide Solution

2.12.4 Puffer für Ni-NTA-Säule

Ni-NTA-Lysepuffer:

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 10 mM Imidazol

auf pH 8,0 einstellen

Ni-NTA-Waschpuffer:

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 20 mM Imidazol

auf pH 8,0 einstellen

Ni-NTA-Waschpuffer (High salt):

- 50 mM NaH₂PO₄
- 2 M NaCl
- 20 mM Imidazol

auf pH 8,0 einstellen

Ni-NTA-Elutionspuffer:

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 500 mM Imidazol

auf pH 8,0 einstellen

2.12.5 Puffer für Hefe Zellaufschluss

- Y-PER (Yeast Protein Extract Reagent) Pierce, Rockford, IL, USA

2.12.6 Puffer für die Herstellung von Hefe Gesamtprotein-Extrakten

2× Proben-Puffer:

- 100 mM Tris/HCl pH 6,8
- 4 mM EDTA 4 % SDS
- 20 % Glycerin
- 0,002 % Bromophenol Blau

Riezmann-Puffer:

- $2 \times V_{\text{tot}}$ 2× Proben Puffer
- $1 \times V_{\text{tot}}$ 1 M Tris Base
- 2 % 2-Mercaptoethanol

2.12.7 Puffer für *Strep*-Tactin Säule

Strep-Waschpuffer:

- 100 mM Tris/HCl pH 8,0
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA

Strep-Elutionspuffer:

- 100 mM Tris/HCl pH 8,0
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1 mM Desthiobiotin

Strep-Regenerationspuffer:

- 100 mM Tris/HCl pH 8,0
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1 mM HABA (hydroxy-azophenyl-benzoic acid)

2.12.8 Puffer ATP-PPi-Austausch-Assay

aaRS-Puffer:

- 20 mM Tris/HCl pH 8,0
- 150 mM KCl
- 15 mM MgCl₂
- 5 mM β -Mercaptoethanol

Stopp-Lösung:

- 240 mM Natriumpyrophosphat

gelöst in 70 % (v/v) Perchlorsäure

Aktivkohle-Suspension:

- 7,5 % (w/v) Aktivkohle in ddH₂O

2.12.9 Puffer für Spektrophotometrischen Lipase-Assay

Lipase buffer:

- 50 mM Tris/HCl pH 8,0

pNPP Suspension:

- 1 mg/mL Gum Arabic
- 1 mM pNPP (*p*-Nitrophenylpalmitat)

gelöst in 25 mM Tris/HCl pH 8,0 und homogenisiert bei 22.000 rpm für 4 min bei RT

Stopp-Lösung:

- 1 M Na₂CO₃

Tricaprylin Substratlösung:

- 10 mM Tricaprylin (1,2,3-Trioctanoylglycerol)
- 5 g/L Gum Arabic

gelöst in 40 mM Universal pH Puffer pH-Wert 7,0 oder 8,0 und homogenisiert bei 22.000 rpm für 1 min bei RT

Kupfer-Reagenz:

- Kupfer(II)-Acetat-I-Hydrat (58 mg/mL)

in ddH₂O und mit Pyridin auf pH 6,1 eingestellt

Farbreagenz:

- 1 mg/mL Diethyldithiocarbamat

gelöst in 99,8 % (v/v) Ethanol

2.13 Chemikalien

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| - Agarose | Gibco BRL, Paislay, Schottland |
| - Bacto Trypton | Difco Laboratories, MI, USA |
| - Bacto Yeast Extract | Difco Laboratories, MI, USA |
| - BSA (bovine serum albumin) | SERVA, Heidelberg |
| - Coomassie Brilliant Blau R250 | SERVA, Heidelberg |
| - Dithiothreitol (DTT) | Fluka, Neu-Ulm |
| - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Fluka, Neu-Ulm |
| - Gum Arabic | Acros Organics, Geel, Belgien |
| - Natriumhydroxid | J.T.Baker, Holland |
| - <i>p</i> -Nitrophenylpalmitat | Sigma, Deisenhofen |

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden ausschließlich von den Firmen Merck AG, Darmstadt, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen und Carl Roth GmbH Co., Karlsruhe bezogen.

2.14 Geräte

- Autoklav: Varioklav Dampfsterilisator Typ 500 E (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland).
- Waagen: TE1502S, BP211D (Sartorius, Göttingen, Deutschland); GB2002, PC4400 Delta Range (Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland).
- Blotting Apparatur: Trockenblot 250/180, 05/04 (MPI für Biochemie, München, Deutschland).
- CD Spectropolarimeter: Jasco J-715, Temperatur Kontrolle von Peltier FDCC attachment PFD-350S/350L (JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japan).
- Zentrifugen: Avanti J-25; Avanti J-20 XP (Beckmann, München, Deutschland); Zentrifuge 5415 C/D; Zentrifuge 3200 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland); Universal 32R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland).
- Zentrifugen Rotoren: JA 25.50, JLA 8.1000, JLA 10.500, (Beckmann, München, Deutschland).
- Küvetten: Hellma 104.002-QS, Hellma 104.002F-QS, Hellma 110-QS, (Hellma, Müllheim, Deutschland).

- Elektroporator: Electroporator 1000 (Stratagene, La Jolla, CA, USA).
- FPLC: Äktaexplorer, Äktabasic (GE Healthcare, München, Deutschland)
- Gel Documentation: Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla CA, USA), High Performance CCD Camera (COHU, Inc., San Diego CA, USA).
- Inkubatoren: Thermomixer comfort, Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), Incubator 3033 (GFL, Burgwedel, Deutschland).
- Magnet Rührer: MR 3001 (Heidolph, Kehlheim, Deutschland).
- Massen Spektrometer: MicrOTOF ESI-MS (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland)
- PCR-Zykler: Robocycler gradient 96 (Stratagene, La Jolla CA, USA).
- pH-Meter: MP 220, (Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland).
- Photometer: UV/VIS Spectrometer Lambda 19 (PerkinElmer Life Sciences, Boston MA, USA); Ultrospec 6300 pro (GE Healthcare, München, Deutschland); ND 1000 (NanoDrop, Wilmington DE, USA).
- Sonifier: Sonifier 450 Macrotip (Branson, St. Louis, MO, USA).
- Vortex: Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz).
- Ultra-Turrax Emulsifier (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)

2.15 Medien und Antibiotikallösungen

2.15.1 Medien für *E. coli*

2.15.1.1 LB-Medium

- 1,0 % Bacto-Trypton
- 0,5 % Bacto Yeast Extract
- 1,0 % NaCl

2.15.1.2 LB-Agar

- 1,0 % Bacto-Trypton
- 0,5 % Bacto Yeast Extract
- 1,0 % NaCl
- 1,5 % Agar

2.15.1.3 NMM-Medium

- 7,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 8,5 mM NaCl
- 22,5 mM KH_2PO_4
- 50 mM K_2HPO_4
- 20 mM Glukose
- 50 mg von allen Aminosäuren, außer der Aminosäuren die ersetzt werden soll
- 1 mM MgSO_4
- 1 mg/l Ca^{2+}
- 1 mg/l Fe^{2+}
- 10 mg/l Spuren Elemente (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , MoO_4^{2+})
- 10 mg/l Thiamin
- 10 mg/l Biotin

2.15.2 Medien für *S. cerevisiae*

2.15.2.1 YPD

- 20 g/l Bacto-Peptide
- 10 g/l Yeast Extract
- 20 mg/l Adenine Hemisulfat
- 20 g/l Glucose

2.15.2.2 SC – Ura - Trp

- 6,7 g/l Yeast Nitrogen Base
- 1,4 g/l YSDOMS* – Leu – His - Trp – Ura
- 76 mg/l His
- 76 mg/l Leu
- 10 g/l Glucose

* yeast synthetic drop out medium supplement (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen)

2.15.2.3 SC – Ura

- 6,7 g/l Yeast Nitrogen Base
- 1,4 g/l YSDOMS – Leu – His – Trp – Ura
- 76 mg/l His
- 76 mg/l Trp
- 76 mg/l Leu
- 10 g/l Glucose

2.15.2.4 SC – Ura – Trp, GAL

- 6,7 g/l Yeast Nitrogen Base
- 1,4 g/l YSDOMS – Leu – His – Trp – Ura
- 76 mg/l His
- 76 mg/l Leu
- 10 g/l Galactose

2.15.2.5 SC – Ura, GAL

- 6,7 g/l Yeast Nitrogen Base
- 1,4 g/l YSDOMS – Leu – His – Trp – Ura
- 76 mg/l His
- 76 mg/l Trp
- 76 mg/l Leu
- 10 g/l Galactose

2.15.3 Antibiotika-Stammlösungen

Die entsprechenden Antibiotikallösungen wurden dem fertigen Medium jeweils im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

- Ampicillin (Amp): 100 mg/ml
- Kanamycin (Kan): 50 mg/ml
- Chloramphenicol (Cam): 34 mg/ml

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Bei allen Arbeiten mit DNA wurde darauf geachtet, die Proben nicht mit DNasen zu kontaminieren. Aus diesem Grund wurde mit Handschuhen gearbeitet und es wurden nur autoklavierte Materialien verwendet.

3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA- und RNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge im elektrischen Feld auftrennen. Dabei wandern kurze Fragmente aufgrund ihrer geringeren Wechselwirkung mit der Gelmatrix schneller als große Fragmente. Durch die Beimengung geringer Mengen Ethidiumbromid zum Agarosegel können die DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht (254 nm), so dass die Gele zur Dokumentation fotografiert oder einzelne Banden ausgeschnitten werden können.

Die Herstellung der Gele mit 1 % Agarosegehalt erfolgte durch Lösen (kurzes Aufkochen) von 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer und Gießen der fertigen Lösung in eine horizontale Gelwanne. In die etwas abgekühlte, aber noch flüssige Lösung wurden $\sim 5 \mu\text{l}$ Ethidiumbromid-Lösung gemischt und ein geeigneter Kamm zur Bereitung der Probenaschen eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wurden die mit $6\times$ Auftragspuffer versetzten Proben zusammen mit einem DNA-Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 bis 120 Volt.

3.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um einzelne DNA-Fragmente (PCR-Produkte, gewünschtes Fragment nach einem Restriktionsverdau) aus dem Gel zu isolieren, wurden diese unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten, in ein Eppendorfcup überführt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

3.1.3 Fällung von DNA

Eine einfache und schnelle Methode zum Reinigen und Aufkonzentrieren von DNA aus wässrigen Lösungen ist die Fällung mit Natriumacetat (NaOAc) und Ethanol.

Dazu wurde der wässrigen DNA-Lösung 1/10 ihres Volumens an 3 M NaOAc Lösung (pH = 5,2) zugesetzt und gemixt. Anschließend wurde das 2,5-fache Volumen an eiskaltem, absolutem Ethanol zugegeben, gemixt und für mindestens 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde die gefällte DNA durch zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit ($\sim 20000 \times g$) und Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol (RT) gewaschen. Es wurde erneut abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet luftgetrocknet. Das trockene Pellet wurde dann in der gewünschten Menge ddH₂O aufgenommen.

3.1.4 PCR - Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, mit der ein gewünschter DNA Abschnitt in hoher Reinheit und großer Ausbeute amplifiziert werden kann. Dafür sind zwei spezifische Primer-Oligonukleotide nötig: ein forward-Primer, der komplementär zum sense-Strang am Beginn der zu amplifizierenden DNA-Sequenz ist und ein reverse-Primer, der komplementär zum antisense-Strang am Ende der Sequenz ist. Das DNA-*Template* und die beiden Primer werden zusammen mit dem dNTP-Mix und einer DNA-Polymerase in einem Reaktionsgefäß in einen Thermocycler gestellt. Durch wiederholte Zyklen von Schmelz-, Annealing- und Elongationsphase erfolgt die Amplifikation der DNA-Sequenz.

Üblicherweise wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

- 2,5 µl 10× Reaktionspuffer
- 2 µl 10 mM dNTP-Mix
- 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
- je 0,5 µl 25 pmol/µl Oligonukleotid
- 1 µl DNA-*Template*
- 18 µl ddH₂O

Das jeweils verwendete PCR-Programm richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Bereiches und der Schmelztemperatur der Primer-Oligonukleotide.

3.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an spezifischen Sequenzen. Sie sind damit ein unerlässliches Werkzeug der modernen Molekularbiologie. So kann man

zum Beispiel die beiden Enden eines PCR-Produktes mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen schneiden (die nötigen Erkennungssequenzen wurden durch die verwendeten Primer Oligonukleotide eingefügt) und das so erhaltene Fragment in einen Vektor ligieren, der zuvor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Darüber hinaus kann ein Restriktionsverdau zum Isolieren eines Inserts aus einem Vektor, oder als Kontrolle für eine Ligation verwendet werden. In allen Fällen werden die Verdauprodukte über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und eventuell gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt.

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden jeweils Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 10 µl gemacht. Darin wurden ~0,5 – 2 µl DNA (PCR-Produkt, Plasmid) mit 1 µl 10× Puffer (passend zum Enzym) und je 0,5 µl Restriktionsenzym bei 37 °C für etwa 1 - 2 Stunden inkubiert.

Für einen präparativen Verdau wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 100 µl bereitet und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurden, können über Ligation miteinander verbunden werden. Dabei bildet die T4 DNA-Ligase kovalente 5'-3'-Phosphodiesterbindungen zwischen den zusammenpassenden Enden der DNA-Fragmente. Bei der Ligation eines Inserts in einen Vektor sollte das molare Verhältnis zwischen Insert und Vektor in etwa 5:1 betragen.

Folgender Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde hierzu verwendet:

- 10 µl Insert
(bzw. Volumen entsprechend der DNA Konzentration)
- 1 µl Vektor
(bzw. Volumen entsprechend der DNA Konzentration)
- 4 µl ddH₂O
- 2 µl 50 % PEG 4000
- 2 µl 10× T4-Ligations-Puffer
- 1 µl T4 DNA Ligase (5 U/µl)

Die Ligation erfolgte bei 22 °C für 1 Stunde.

3.1.7 DNA-Sequenzierung

Um sicher zu gehen, dass die richtigen Fragmente in die Vektoren eingebaut wurden und diese auch keine unerwünschten Mutationen enthalten, wurden alle Plasmide, die für die Expression verwendet werden sollten, sequenziert.

Die als Primer verwendeten Oligonukleotide waren dabei zur T7-Promotor oder T7-Terminator Sequenz (auf pYES2 und pET28a Vektor) bzw. zur T5-Promotor Sequenz (auf pQE80L Vektor) komplementär, oder es wurden selbst erstellte Primer gewählt, die eine Sequenzierung des relevanten Bereiches des Plasmides ermöglichen. Auf die jeweils verwendeten Sequenzierprimer wird in den entsprechenden Abschnitten gesondert hingewiesen.

3.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA hat ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei 260 nm. Aus der gemessenen Absorption bei dieser Wellenlänge lässt sich die Konzentration an DNA abschätzen, die bei Abs. = 1,0 ca. 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml ssDNA beträgt. Für den Nullabgleich wird der jeweilige Puffer ohne DNA verwendet.

3.2 Mikrobiologische Methoden

Um Fremdkontaminationen der Bakterien- oder Hefenkulturen zu verhindern, wurden ausschließlich autoklavierte Geräte (Kolben, Pipetten, Spitzen, etc.), bzw. sterilfiltrierte Medien verwendet. Darüber hinaus wurden alle Kulturen vor der Entsorgung totautoklaviert.

3.2.1 Herstellung elektro-kompetenter *E. coli* Zellen

Die Zellmembranen von Bakterien sind für Plasmide undurchlässig. Damit aber bei der Transformation *E. coli* Zellen trotzdem Plasmid-DNA aufnehmen können, müssen sie erst kompetent gemacht werden.

Hierfür wurden 500 ml LB Medium mit 15 ml einer Übernacht-Vorkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,7 – 0,8 inkubiert. Die Kultur wurde in Eiswasser abgekühlt und die Zellen bei 6700 × g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 ml sterilem, eiskaltem 10 %-Glycerin resuspendiert und erneut bei 6700 × g für 10 min abzentrifugiert. Der Waschschritt mit 500 ml eiskaltem 10 %-Glycerin wurde wiederholt und nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in dem verbleibenden 10 %-Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots zu je 40 µl in vorgekühlte

1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.2 Transformation elektro-kompetenter *E. coli* Zellen

Um einen Vektor in *E. coli* Zellen amplifizieren, oder ein Protein überexprimieren zu können, muss man den entsprechenden Vektor in kompetente Bakterienzellen transformieren.

Dazu wurden 40 µl elektro-kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 – 100 ng Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz (dialysiert, um einen Kurzschluss bei der Elektroporation zu verhindern) in einer Elektroporations-Küvette mit einer Spaltbreite von 0,1 cm auf Eis gemischt und in einem Elektroporator bei folgenden Bedingungen „gepulst“:

- U = 1,5 kV
- R = 100 Ohm
- C = 25 µF / 250 µF

Dabei entsteht eine kurzzeitige Permeabilität der Zellmembran, wodurch ein Teil der DNA in die Zellen gelangen kann. Anschließend wurden die Zellen wieder auf Eis abgekühlt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und bei 37 °C 1 Stunde inkubiert. Die Ansätze wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.2.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zum Isolieren von Plasmiden aus transformierten *E. coli* Zellen wurden Klone von den LB-Platten abgenommen und in 5 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) über Nacht (12 – 16 Stunden) bei 200 rpm und 37 °C angezchtet. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurden die Plasmide über das Plasmid Mini Kit (Qiagen) nach Vorschrift isoliert und aufgereinigt.

Über einen Test-Restriktionsverdau und anschließender Auftrennung der Restriktionsfragmente im Agarosegel wurde festgestellt, ob das gewünschte DNA-Fragment im isolierten Plasmid enthalten ist.

3.2.4 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

3.2.4.1 Testexpression von aaRSs und Lipase (TTL)

Um den besten Expressionsklon zu identifizieren, wurde ein Expressionstest im kleinen Maßstab durchgeführt. Dazu wurden jeweils 5 mal 5 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) mit je einem Klon des mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformierten *E. coli* Stammes angeimpft und bei 37 °C, 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 wachsen gelassen. Je 1 ml dieser Kulturen wurde in sterile 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und die Expression durch Zugabe von je 1 µl 1 M IPTG induziert. Nach 4 h Inkubation bei 30 °C, 200 rpm wurde eine Zellmenge entsprechend 1 OD₆₀₀ geerntet und in 40 µl ddH₂O und 10 µl 5× SDS-Auftragspuffer resuspendiert. Parallel wurde dieselbe Zellmenge von 1 OD₆₀₀ der nicht induzierten Kultur als Vergleichsprobe genommen. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 5 min erhitzt und per SDS-PAGE analysiert. Der Klon, der die stärkste Expression zeigte, wurde für die folgende Expression im großen Maßstab ausgewählt.

3.2.4.2 Expression der aaRSs im großen Maßstab

Der *E. coli* Expressionsstamm B834 (DE3) wurde jeweils mit den verschiedenen pET28a-H6-aaRS Expressionsvektoren transformiert und mit den am besten exprimierenden Klonen jeweils eine 50 ml LB-Kan Vorkultur (LB-Medium mit 50 mg/l Kanamycin) beimpft. Nach Inkubation o/n, bei 37 °C und 200 rpm wurden damit 1 l LB-Kan Hauptkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 beimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nachdem diese Kulturen die Mid-Log Phase (OD₆₀₀ 0,6–0,8) erreicht hatten, wurde die Gene Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet und für 4-5 h bei 25 °C, 200 rpm durchgeführt. Nach Beendigung der Expression wurden die Kulturen durch Zentrifugation bei 3200 × g, 4 °C, 20 min geerntet. Die Zellpellets wurden in je 30 ml Ni-NTA-Lysepuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.2.4.3 SPI (*Supplementation Based Incorporation*) von Aminosäureanaloga in TTL-Lipase

Der prolinauxotrophe *E. coli* Expressionsstamm CAG18515 wurde mit dem Expressions-Plasmid für die TTL-Lipase pQE80L-TTL-H6 transformiert und auf LB-Amp-Platten selektioniert (mit 100 mg/L Ampicillin). Eine Einzelkolonie wurde von der LB-Amp-Platte gepickt und in 5 ml LB-Amp-Medium bei 37 °C o/n

inkubiert. Für die Lipase Expression wurde 1 l New Minimal Medium (NMM), supplementiert mit einer limitierenden Menge der auszutauschenden Aminosäure, mit 1 ml der LB Vorkultur beimpft. Nach der Aminosäuredepletion, was durch einen Wachstumsstopp in der Mid-Log Phase (OD_{600} 0,6–0,8) zu erkennen ist, wurden die Zellen in 1 l NMM mit 0,5 mM der entsprechenden Aminosäure oder des Aminosäureanalog überführt. Für Expression mit den Prolinanaloga tHP und cHP wurden 500 mM NaCl 30 min vor der Induktion zu den Zellen gegeben. Die Expression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet und für 4-5 h bei 30 °C, 200 rpm durchgeführt. Die Kulturen wurden durch Zentrifugation bei $3200 \times g$, 4 °C, 20 min geerntet, die Zellpellets in je 30 ml Ni-NTA-Lysepuffer resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Transformation in *S. cerevisiae* Zellen

Von dem zu transformierenden Hefestamm wurde eine Übernacht- Vorkultur in ~5 ml YPD bei 30 °C und 200 rpm angezchtet. Mit dieser Kultur wurden 50 ml vorgewärmtes YPD auf eine OD_{600} von 0,2 beimpft und bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,8 bis 1,2 wachsen gelassen. Die Zellen wurden bei $3000 \times g$, RT, 5 min steril geerntet, mit 25 ml sterilem ddH₂O gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 1 ml 100 mM LiOAc (Lithiumacetat) aufgenommen. Nach dem Überführen in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen wurden die Zellen pelletiert (15 sec. maximale Geschwindigkeit, RT) und in 100 mM LiOAc auf ein Endvolumen von 500 µl resuspendiert. Je 50 µl dieser Zellsuspension wurden für eine Transformation abzentrifugiert und nach entfernen des LiOAc mit folgendem „Transformations-Mix“ vermischt und gemixt:

- 240 µl PEG (50 % w/v)
- 36 µl 1 M LiOAc
- 25 µl ssDNA (2,0 mg/ml) (vor Verwendung 5 min gekocht!)
- 50 µl ddH₂O und Plasmid DNA (0,1 – 10 µg)

Nach dem sich das Pellet vollständig gelöst hatte wurde 30 min bei 30 °C inkubiert und dann ein Hitzeschock für 20 – 25 min bei 42 °C durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden abzentrifugiert (7000 rpm, RT, 15 sec.), in 250 µl sterilem ddH₂O aufgenommen, auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert und für 2 bis 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

3.2.6 Überexpression rekombinanter hSOD1

3.2.6.1 Testexpression

Für einen Expressionstest mit dem, das bzw. die entsprechende(n) Plasmid(e) enthaltenden InvSc1 Stammes (Invitrogen, siehe 2.4 für Details des Genotyps), wurden mehrere Klone zuerst in je 5 ml SC-Ura (bzw. SC-Ura-Trp) Medium bei 30 °C, 200 rpm für zwei Tage angezüchtet und dann damit je 20 ml SC-Ura im Verhältnis 1:100 (= 0,2 ml) angeimpft. Nach weiterer Inkubation über Nacht bei 30 °C, 200 rpm wurde die OD₆₀₀ gemessen und eine Zellmenge entsprechend 3 OD₆₀₀ für die spätere Analyse über SDS-PAGE und Immunoblot abgenommen. Bei der Verwendung eines Plasmides mit konstitutivem Promotor für die Genexpression (*pTDH3* oder *pPGK1*) entsprach dies der *induzierten Probe*. Bei Verwendung des galaktoseinduzierbaren *pGAL1*-Promotors war dies die *nicht induzierte Probe*. In diesem Fall wurden die Zellen bei 4000 rpm und RT für 4 Minuten abzentrifugiert, einmal mit 30 ml sterilem ddH₂O gewaschen und zur Induktion der Expression in 20 ml SC-Ura + Galaktose Medium aufgenommen. Die Expression erfolgte bei 30 °C, 200 rpm für etwa 24 Stunden. Nach Beendigung der Expression wurden wieder Zellen entsprechen 3 OD₆₀₀ für die spätere Analyse über SDS-PAGE und Immunoblot abgenommen (*induzierte Probe*).

3.2.6.2 Expression im großen Maßstab und Einbauexperimente

Für die Proteinexpression im größeren Maßstab und für die Einbau-Experimente mit der nicht-kanonischen Aminosäure wurde ein Kulturvolumen von 250 ml gewählt. Es wurde zuerst eine 5 ml Vor-Vorkultur von dem die entsprechende(n) Plasmid(e) enthaltenden InvSc1 Stamm in SC-Ura (bzw. SC-Ura-Trp) Medium bei 30 °C, 200 rpm über Nacht angezüchtet. Damit wurde dann eine 50 ml Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,2 beimpft und bei 30 °C, 200 rpm für weitere 24 Stunden inkubiert. Es wurde die OD₆₀₀ gemessen und eine Zellmenge entsprechend 3 OD₆₀₀ für die spätere Analyse über SDS-PAGE und Immunoblot abgenommen (*nicht induzierte Probe*).

Wenn der verwendete Stamm einen Expressionsvektor mit Galaktose induzierbarem Promotor enthielt, wurde die Vorkultur nun bei 4000 rpm, RT für 4 Minuten abzentrifugiert, einmal mit 30 ml sterilem ddH₂O gewaschen und in

250 ml SC-Ura + Galaktose (bzw. SC-Ura-Trp + Galaktose) Expressionsmedium wieder aufgenommen.

In den Fällen, in denen der verwendete Stamm über einen Expressionsvektor mit einem konstitutiven Promotor (*pPGK1*, *pTDH3*) verfügte, wurden die 50 ml der Vorkultur direkt in 250 ml SC-Ura (SC-Ura-Trp) Expressionsmedium inokuliert.

Bei den Einbauexperimenten mit nicht-kanonischen Tyrosinanaloga in die Superoxid-Dismutase 1 wurden die Analoga dem Expressionsmedium jeweils in einer Konzentration von 1 mM direkt zugegeben, vollständig gelöst und das Medium dann vor Inokulation steril Filtriert. Die Expression erfolgte bei RT, 200 rpm für etwa 48 Stunden.

Nach Beendigung der Expression wurden wiederum Zellen entsprechen 3 OD₆₀₀ für die spätere Analyse über SDS-PAGE und Immunoblot abgenommen (*induzierte Probe*) und die Kultur bei 4000 rpm, RT, 5 min geerntet. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Proteinaufreinigung und Isolierung

Um einen Verlust des Proteins durch Denaturierung oder Abbau durch Proteasen zu minimieren, wurde stets auf Eis bzw. bei 4 °C gearbeitet

3.3.1.1 Zellaufschluss von *E. coli* Zellen

Die Zellpellets wurden bei RT aufgetaut, mit je einer Spatelspitze Lysozym, DNase und RNase vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss durch Sonifizieren mit einem Branson Sonifier 450 auf Eis für 15 min. Hierfür wurde ein Duty Cycle von 20 % und ein Output Control Micro Tip Limit von 6 verwendet. Die Suspension wurde bei 10.000 × g für 20 min zentrifugiert und vom Überstand (Lysat) eine Probe für die Analyse mittels SDS-PAGE genommen. Das Lysat wurde bis zur weiteren Proteinaufreinigung bei 4 °C gelagert.

3.3.1.2 Ni-NTA Affinitätschromatographie

Die Reinigung der in *E. coli* überexprimierten Proteine (aaRSs und TTL-Lipase) aus den Lysaten erfolgte über immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Dabei binden die 6×His-Tags der Proteine an

die vom Säulenmaterial komplexierten und dadurch immobilisierten Ni²⁺ Ionen. Die 6×His-Tags wurden über eine entsprechende Klonierungs-Strategie mit den rekombinanten Proteinen fusioniert. Die Elution der Proteine erfolgte über eine Verdrängungsreaktion mit Imidazol.

Das Lysat wurde auf eine a 5 mL HiTrap Chelating HP Ni-NTA Agarose™ Säule (Amersham Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit den gebundenen Proteinen mit 10 Säulenvolumen (CV) Ni-NTA Waschpuffer gewaschen. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten mit 20 – 500 mM Imidazol (entsprechend 0 – 100 % Elutionspuffer) und einer Länge von 15 CV. Die Eluate wurden in Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Von allen eluierten Fraktionen, vom Durchfluss und vom Waschschrift wurden Proben genommen und über SDS-PAGE auf ihren Gehalt an exprimiertem Protein hin untersucht.

3.3.1.3 Herstellung von Hefe Gesamtprotein-Extrakten

Für die Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten wurde eine Zellmenge entsprechend 3 OD₆₀₀ bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten bei RT abzentrifugiert und das Zellpellet in 500 µl ddH₂O resuspendiert. Dann wurden 50 µl 1,85 M NaOH zugegeben, gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 50 % (w/v) TCA dazu gegeben gemischt und wiederum für mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Jetzt wurden die auf diese Weise gefällten Proteine bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Proteinpellet wurde in 70 µl Riezmann Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel wurden die so präparierten Proben für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend abzentrifugiert

3.3.1.4 Zellaufschluss von Hefe Zellen

Der Aufschluss der *S. cerevisiae* Zellen erfolgte mit Hilfe des Y-PER Yeast Protein Extraction Reagenz. Dafür wurden zu je 1 g Zell-Nassgewicht des Pellets 2,5 ml Y-PER gegeben, solange gemischt bis die Suspension homogen ist und dann für 20 min bei RT leicht geschüttelt. Anschließend wurde bei 14000 × g für 10 Minuten abzentrifugiert und das Lysat bei 4 °C bis zur weitem Proteinaufreinigung gelagert.

3.3.1.5 *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie

Bei dem *Strep-tag* Reinigungssystem binden Fusions-Proteine mit dem 8 Aminosäuren langen *Strep*-Tag II (WSHPQFEK) an speziell hergestelltes Streptavidin, das sogenannte *Strep*-Tactin, das an einer Säulenmatrix immobilisiert ist. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt schließlich durch eine Verdrängung mit Desthiobiotin (2,5 mM), einem reversibel bindenden und stabilen Biotin Analog.

Das Lysat des Y-PER Hefe-Zellaufschlusses wurde auf eine 1 ml *Strep*-Tactin-Säule (IBA BioTAGnology, Gottingen) gegeben und anschließend die Säule mit der gebundenen hSOD1 5 × mit je einem Säulenvolumen (CV) *Strep*-Waschpuffer gewaschen. Dann wurde die hSOD1 mit 6 × 0,5 CV *Strep*-Elutionspuffer eluiert. Die Eluate wurden gepoolt und durch Ultrafiltration (Centricon YM-10, MWCO 10000; Amicon, Beverly, MA, USA) auf ein Endvolumen von 150 µl aufkonzentriert. Die *Strep*-Tactin-Säule wurde mit 3 × 5 CV *Strep*-Regenerationspuffer wieder regeneriert und durch Equilibration mit 2 × 4 CV *Strep*-Waschpuffer wieder für die nächste Reinigung vorbereitet.

3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

3.3.2.1 UV-Vis-Spektroskopie

Eine einfache und schnelle Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen ist die UV-Vis-Spektroskopie. Sie beruht auf der Eigenschaft, dass sowohl die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, als auch Cystein bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren. Die Intensität der Absorption ist abhängig von der Anzahl dieser Aminosäuren in einem Protein und wird durch dessen Extinktionskoeffizienten definiert. Dieser lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\epsilon_{280} = n_{\text{Trp}} \times \epsilon_{\text{Trp}} + n_{\text{Tyr}} \times \epsilon_{\text{Tyr}} + n_{\text{Cys}} \times \epsilon_{\text{Cys}}$$

mit n_x = Anzahl der jeweiligen Aminosäure im Protein

und ϵ_x = molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm.

$$(\epsilon_{\text{Trp}} = 5690 \frac{1}{\text{M}\cdot\text{cm}}, \epsilon_{\text{Tyr}} = 1280 \frac{1}{\text{M}\cdot\text{cm}}, \epsilon_{\text{Cys}} = 120 \frac{1}{\text{M}\cdot\text{cm}})$$

Die Proteinkonzentration kann nun über das Lambert-Beer'sche Gesetz errechnet werden:

$$A_{280} = \varepsilon \times c \times d$$

mit A_{280} = Absorption bei 280 nm

ε = Extinktionskoeffizient [cm^2/mmol] bei 280 nm

c = Proteinkonzentration [mol/l]

d = Schichtdicke Küvette [cm]

Bei dieser Methode muss jedoch berücksichtigt werden, dass auch Nukleinsäuren (Absorptionsmaximum bei 260 nm) teilweise bei 280 nm absorbieren, weshalb diese in der Probenlösung möglichst nicht enthalten sein sollten.

3.3.2.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) nach Laemmli

Mit Hilfe der SDS-PAGE lassen sich Proteine ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld auftrennen. Um dabei den Einfluss der räumlichen Struktur der gefalteten Proteine und deren Ladung auszuschalten, werden die Proben vor dem Auftragen durch Zugabe von SDS und Erhitzen auf 95 °C für 5 min denaturiert (linearisiert) und die Ladungen durch die negative Ladung des SDS (sodium dodecyl sulfate) maskiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt aufgrund ihrer verschiedenen Beweglichkeit im Raumgitter des Polyacrylamids-Gels. Im angelegten elektrischen Feld werden große Proteine vom Gel stärker zurückgehalten und wandern deshalb langsamer als kleine Proteine. Nach erfolgter Elektrophorese werden die Proteinbanden mit Coomassie-Blau-Lösung angefärbt und dadurch sichtbar gemacht. Über einen Molekulargewichtsstandard, der ebenfalls auf das Gel aufgetragen wird, lassen sich die Proteingrößen der einzelnen Banden abschätzen.

Für die Auftrennung der Proteine wurden SDS-Gele verwendet, die aus einem 4 %-igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel bestanden. Die Gele wurden nach Tabelle 2 hergestellt und nacheinander in die Gel-Apparatur gegossen. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf die auspolymerisierten Gele mit 5 × SDS-Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelapparatur in 1× SDS-PAGE Laufpuffer bei einer Spannung von 120 - 200 V durchgeführt. Die fertig gelaufenen Gele wurden ~20 min in Coomassie-Blau-Lösung inkubiert und anschließend mit heißem H₂O entfärbt.

Tabelle 2: Bestandteile der verwendeten Polyacrylamidgele (für 2 Gele):

Trenngel (12%ig):

Sammelgel (4%ig):

2,5 ml 4× Trenngel-Puffer	1,0 ml 4× Sammelgel-Puffer
4,02 ml 30 % Acrylamid/Bis	0,65 ml 30 % Acrylamid/Bis
3,43 ml ddH ₂ O	2,37 ml ddH ₂ O
5 µl Temed	2 µl Temed
50 µl 10 % APS	20 µl 10 % APS

3.3.2.3 Immunoblot (Western Blot)

Der Immunoblot oder auch Western Blot, ist eine sehr sensitive und extrem spezifische Methode zum immunologischen Nachweis von Proteinen, die auf einer Membran immobilisiert („geblottet“) wurden. Dabei macht man sich die Eigenschaft von Antikörpern zu nutze, dass diese mit hoher Affinität nur ein spezifisches Antigen (Epitop) erkennen. Das heißt, ein spezieller Antikörper bindet nur an das Protein, das genau dieses Epitop besitzt.

Zuerst werden dafür die Proteinproben über eine SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, bevor sie dann im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulose Membran transferiert werden. Dies erfolgte mit dem Semidry-Blot-System, bei dem der mit Transfer Puffer getränkte Blotting-Sandwich in der Blotting Apparatur zwischen den beiden Elektroden eingespannt wird. Der Blotting-Sandwich wurde dabei auf folgende Weise zusammengebaut: Auf die der Kathode (Minus-Pol) wurden zwei Lagen Whatman Filter Papier (3 mm, in der Größe der Membran), dann das Gel und darauf die Membran und dann wieder zwei Lagen Whatman Filter Papier gelegt. Dabei wurden alle Bestandteile vorher in einer Wanne mit Transfer Puffer getränkt und darauf geachtet, dass sich nach dem Zusammenbau keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen des Blotting-Sandwichs befanden. Anschließend wurde die Blotting Apparatur geschlossen, so dass das Gel während des elektrophoretischen Transfers der Kathode zugewandt war, während die Membran auf der Seite der Anode (Plus-Pol) lag. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 200 mA für zwei Stunden.

Nach Beendigung des Transfers wurde der Blotting-Sandwich auseinander gebaut und die Membran zur Kontrolle der Transfer Effizienz in Ponceau S Lösung gefärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden. Nun war es möglich die

einzelnen Spuren sowie die Standardbanden mit Bleistift zu markieren, bevor die Membran mit ddH₂O wieder entfärbt wurde.

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran mit 1× TTBS + 1,5 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT). Danach wurde als erster Antikörper entweder ein monoklonaler Maus anti-(6x)His Antikörper (vergl. 2.6; verdünnt in 1× TTBS) oder ein monoklonaler Maus anti-*Strep*-Tag II Antikörper (vergl. 2.6; verdünnt in 1× TTBS) auf die Membran gegeben und für eine Stunde, RT (oder über Nacht, 4 °C) inkubiert. Vor der Zugabe des Sekundär-Antikörpers wurde die Membran 3 mal 10 min mit 1× TTBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein an Meerrettich Peroxidase gekoppelter anti-Maus Antikörper (vergl. 2.6; verdünnt in 1× TTBS) verwendet. Es wurde wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 mal 10 min mit 1× TTBS gewaschen.

Für die Detektion wurde das Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Detection System von Pierce verwendet, von dem je 1 ml Luminol Enhancer und 1 ml Stable Peroxid Lösung frisch miteinander gemischt wurden. Die Membran wurde für 5 min in dieser Lösung inkubiert, gut abtropfen gelassen und anschließend in Frischhaltefolie eingepackt. Die so präparierte Membran wurde in einer Film-Entwickler-Kassette fixiert. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm so lange auf die Membran gelegt und belichtet, bis das Signal (nach dem Entwickeln) deutlich zu sehen war.

3.3.3 Enzym Assays

3.3.3.1 ATP-PPi-Austausch-Assay

Dieser Assay wird benutzt um die Aktivierungsrate einer Aminosäure (aa) durch eine Aminoacyl-tRNA Synthetase (aaRS) zu bestimmen. In dieser Reaktion wird das Aminoacyladenylate (AMP-aa) durch den Transfer der AMP Gruppe von ATP auf die Aminosäure gebildet, wobei Pyrophosphat (PPi) frei wird. In der Rück-Reaktion bildet mit ³²P radioaktiv markiertes PPi [³²P]-ATP, das dann gemessen werden kann. Aktivkohle (^aC), die eine hohe Affinität gegenüber ATP hat wird benutzt um das [³²P]-ATP zu binden, und von dem [³²P]PPi abzutrennen. So kann die Aminosäuren Aktivierungsrate der aaRS direkt über die Rate der [³²P]-ATP Bildung bestimmt werden.^[107]

Reaktion: $aa + ATP + aaRS \leftrightarrow aaRS (AMP-aa) + PPi$

$aaRS (AMP-aa) + tRNA \rightarrow aa-tRNA + aaRS + AMP$

Radioaktive Reaktion:

$aa + [^{32}P]ATP - ^aC + aaRS \leftrightarrow aaRS (AMP-aa) + [^{32}P]PPi$

Als Reaktionsmix wurden 5 μ M der TyrRS Mutante (oder 1 μ M wt TyrRS), und 5 mM (oder weniger) von Tyr oder des Tyr-Analogs in 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 80 mM MgCl₂, 5 mM KF, 700 mM β -Mercaptoethanol, 5,5 mM ATP, 0,1 mg/ml BSA und 2,2 mM [³²P]-PPi (0,2 cpm/pmol) in einem Gesamtvolumen von 200 μ l bei 37 °C inkubiert. Für den Assay wurden 20 μ M Stock-Lösungen der aufgereinigten aaRSs in aaRS-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM KCl, 15 mM MgCl₂ und 5 mM β -Mercaptoethanol) verwendet. Alle Aminosäuren wurden in 0,01 M HCl in einer Konzentration von 12,5 mM gelöst und jeweils 80 μ l dieser Aminosäure Lösungen wurden pro Reaktionsmix (200 μ l) eingesetzt, um eine Endkonzentration von 5 mM aa zu erhalten. Als Negativ-Kontrolle wurden nur 80 μ l 0,01 M HCl ohne aa verwendet. Jeder Wert wurde durch eine doppelte Messung bestimmt. Nach 15 min wurden 100 μ l der Reaktionslösung in 600 μ l 240 mM Natriumpyrophosphat Lösung mit 70 % (v/v) Perchlorsäure abgestoppt. Dazu wurden 200 μ l einer 7,5% (w/v) Lösung von Aktivkohle gegeben um das gebildete [³²P]-ATP zu absorbieren. Die Suspension wurde gut gemischt und durch Whatman GF/F Filter gefiltert. Anschließend wurden die Filter zweimal mit je 10 ml ddH₂O gewaschen und mit Szintillationslösung gemischt, um die Zerfallsereignisse pro Minute zu messen.

3.3.3.2 Spektrophotometrischer Assay mit *p*-Nitrophenylpalmitat

Die Lipase-Aktivität wurde durch Messung der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP) bestimmt. Dafür wurde die Spaltung von *p*NPP bei verschiedenen Temperaturen (40-90 °C) in 25 mM Tris/HCl pH 8,0 nach dem Protokoll von Winkler und Stuckmann^[108] gemessen. Eine gepufferte *p*NPP Suspension aus 1 mg/mL Gum Arabic (Acros Organics, Geel, Belgien) und 1 mM *p*NPP in 25 mM Tris/HCl pH 8,0 wurde bei 22.000 rpm für 4 min bei RT homogenisiert. Dann wurde die Reaktion durch mischen von 900 μ l gepufferter *p*NPP Suspension mit 100 μ l von der TTL Präparation gestartet. Der Anteil der Autohydrolyse wurde ermittelt, indem eine „Blank“-Probe, die anstatt Enzym dasselbe Volumen 50 mM Tris/HCl pH 8,0 enthielt, mit gemessen wurde. Der Reaktionsmix wurde für 10 oder 15 min bei der gewünschten Temperatur unter

starkem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 μl 1 M Na_2CO_3 und kühlen auf Eis für 1 min gestoppt. Dann wurden die Proben bei $20.000 \times g$ für 10 min bei RT abzentrifugiert und die Absorption des Überstandes bei 410 nm gemessen. Alle Werte wurden dreifach bestimmt und um den Wert der Autohydrolyse korrigiert. Eine Unit (1 U) Lipase-Aktivität ist dabei als die Menge an Enzym definiert, die nötig ist um 1 μmol von *p*NPP (ϵ bei pH 8,0 = $12,75 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) pro Minute unter den oben genannten Bedingungen zu spalten.

3.3.3.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Lipase-Aktivität

Die optimale Temperatur der Lipase-Aktivität wurde mit dem Standard *p*NPP Assay bei pH 8,0 bestimmt. Dazu wurden die Proben für 10 min bei Temperaturen zwischen 40 und 90 °C inkubiert. Um die Thermostabilität zu bestimmen wurden je 100 μl der Lipase Lösungen bei 75, 80, 85, 90, oder 95 °C zwischen 10 und 180 min inkubiert.

3.3.3.2.2 Einfluss von Additiven auf die Lipase-Aktivität

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Lipase-Aktivität zu erforschen wurden die produzierten Lipase Varianten für jeweils 60 min bei RT in Lösungen inkubiert, die entweder 90 % eines organischen Lösungsmittels, 10 % eines Surfactants (Tensid) oder 10 mM eines Inhibitors (bzw. 500 mM Guanidiniumchlorid und 2 M Urea (Harnstoff)) enthielten. Die verbleibende Lipase-Aktivität wurde anschließend mit dem *p*NPP Assay bei der optimalen Temperatur für 10 min, pH 8,0 gemessen.

3.3.3.2.3 Substrat-Spezifizität für *p*-Nitrophenylester

Die Reaktionen wurden genauso wie oben im Spektrophotometrischen Assay mit *p*-Nitrophenylpalmitat beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die folgenden *p*-Nitrophenyl-Substrate (*p*NP) (Sigma) in Konzentrationen von 10 mM verwendet wurden: Acetat (C2:0), Butyrat (C4:0), Caproat (C6:0), Caprylat (C8:0), Caprat (C10:0), Laurat (C12:0), Myristat (C14:0), Palmitat (C16:0) und Stearat (C18:0). Die Reaktionen wurden bei der für des Enzym optimalen Temperatur und pH 8,0 für 10 min inkubiert.

3.3.3.2.4 Spektrophotometrischer Assay mit Tricaprylin

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes der Lipasen wurde ein anderer Assay verwendet, der die Bildung von Kupfer-Seifen für die Detektion von freien Fettsäuren verwendet.^[109] Die Substratlösung besteht aus 10 mM Tricaprylin (1,2,3-Trioctanoylglycerol) und 5 g/L Gum Arabic in 40 mM Universal pH Puffer mit dem benötigten pH-Wert von 7,0 oder 8,0 und wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min bei RT emulgiert. Als Kupfer-Reagenz wurde eine wässrige Kupfer(II)-Acetat-I-Hydrat Lösung (58 mg/mL) mit Pyridin und pH 6,1 verwendet. Das Farbreagenz bestand aus 1 mg/mL Diethyldithiocarbamat, gelöst in 99,8 % (v/v) Ethanol. Für den Assay wurden 200 µl Substratlösung mit 100 µl der entsprechenden Lipase Lösung gemischt und für 18 h bei der optimalen Temperatur für diese Lipase Variante unter starkem schütteln inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 125 µl 3 M HCl gestoppt. Für die Extraktion der freien Fettsäuren wurden 1,5 ml Isooctan zugegeben und die Proben für 10 min bei RT stark geschüttelt. Durch Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min in einer Tischzentrifuge wurden die Phasen getrennt und 1,25 mL der Isooctan Phase wurde abgenommen und mit 250 µl Kupfer-Reagenz gemischt. Diese Emulsion wurde dann bei 1400 rpm für 5 min gemischt, erneut abzentrifugiert (max. Geschwindigkeit, 5 min) und 1 ml der organischen Phase mit 200 µl Farbreagenz gemischt. Nach 5 min wurde die Absorption bei 430 nm gemessen und um den Wert der Autohydrolyse korrigiert („Blank“-Probe mit 100 µl 40 mM Universal pH Puffer des entsprechenden pH-Wertes anstatt der Lipase Lösung). Alle Werte wurden wiederum dreifach bestimmt.

3.3.3.2.5 Einfluss des pH-Wertes auf die Lipase-Aktivität

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Lipase-Aktivität wurde mit Hilfe des oben beschriebenen Tricaprylin-Assays in einem pH Bereich von 4 bis 12 bei der optimalen Temperatur und einer Inkubationszeit von 18 h ermittelt.

3.3.3.2.6 Substrat Spezifität für Triacylglycerine

Für die Reaktionen wurde wiederum der Tricaprylin-Assays verwendet, nur das diesmal die folgenden Substrate (Sigma) in Konzentrationen von 10 mM eingesetzt wurden: Triacetin (C2:0), Tributirin (C4:0), Tricaproin (C6:0), Tricaprylin (C8:0), Tricaprin (C10:0), Trilaurin (C12:0), Trimyristin (C14:0),

Tripalmitin (C16:0) und Tristearin (C18:0). Es wurde wieder bei der optimalen Temperatur und pH 8,0 für 18 h inkubiert.

3.3.4 ESI-Massenspektrometrie

Die Elektrospray Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS) ist eine Methode, bei der die Massen von Proteinen sehr exakt, bis auf mehrere Kommastellen genau, bestimmt werden können.

Dadurch ist es möglich, die genaue molekulare Zusammensetzung von Proteinen zu analysieren. So lassen sich hiermit post-translationale Proteinmodifikationen und der Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren feststellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle massenspektrometrischen Analysen vom MS-Service der „Core-Facility“ des MPI durchgeführt.

Für die Flüssig-Chromatographie ESI-MS wurden je 20 μL Aliquots der zu untersuchenden Proben auf einer Waters RP C4 Säule (300 Å Porengröße; 3,5 μm Partikelgröße; 100 \times 2,1 mm) vorgetrennt. Hierfür wurde die Säule 20 Minuten mit einem Gradienten von 20 bis 90 % 0,05 % (v/v) TFA (Trifluoressigsäure) in Acetonitril in 0,05 % (v/v) TFA in Wasser mit einer Flussrate von 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ eluiert. Die Massen der eluierten Fraktionen wurden auf einem MicrOTOF ESI-MS analysiert.

3.3.5 Circular dichroismus

Circular dichroismus (CD) wird verwendet, um den Grad der Proteinfaltung zu bestimmen. Zusätzlich kann der relative Anteil der Sekundärstruktur Elemente in einer Probe (α -Helix, β -Faltblatt und *random coil*) im Vergleich zu Referenzspektren abgeschätzt werden. Die Messung basiert auf der unterschiedlichen Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht durch optisch aktive Stoffe bei verschiedenen Wellenlängen und wird normalerweise als Elliptizität oder Θ bezeichnet. Die CD-Spektren werden als Elliptizität Θ gegen die Wellenlänge des zirkular polarisierten Lichtes dargestellt. Für die Messung der CD-Spektren wurden Lipase-Proben mit 0,2 mg/ml in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 verwendet. Die Messungen wurden in 110-QS Hellma Quarzküvetten (0,1 cm optische Weglänge) unter kontrollierter Temperatur (Peltier Typ FDGD Anlage, Modell PFD-350S/350L; JASCO International Co., Ltd, Tokyo, Japan) durchgeführt. Die Änderungen der Elliptizität wurden zwischen

200 nm und 250 nm und bei der optimalen Temperatur des entsprechenden TTL-Kongeners aufgezeichnet.

3.4 3D-Struktur-Modeling der TTL

Um einen Einblick in die strukturelle Verteilung der für diese Arbeit bedeutenden Aminosäurereste der TTL zu erhalten, wurde ein Homologie-Modell der 3D-Struktur generiert. Dazu wurde die primäre Aminosäuresequenz der TTL mit bekannten 3D-Strukturen aus anderen Lipasen, Esterasen und Serin-Proteasen aus der gesamten PDB-Datenbanken mit Hilfe der Software HHpred^[110 52] verglichen. Dieses Programm erzeugt 100 Alignments, von denen vier nach Höhe ihrer Übereinstimmungen ausgewählt wurden: HVE 2WTM^[111 40], PDB 2HU5^[112 43], PDB 3JW8^[113 29] und PDB 3KSR. Ein „*multiple-sequence alignment*“ aus diesen *Templates* wurde verwendet, um 100 Homologie-Modelle zu erzeugen, aus denen das am besten übereinstimmende mit Hilfe der Software Modeler gewählt wurde.^[114]

Dieses Modell wurde verwendet, um die räumliche Position der Aminosäurereste von Interesse zu lokalisieren und die möglichen globalen strukturellen Effekte, die durch deren Austausch hervorgerufen werden, besser zu verstehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Einbau von Tyrosinanaloga durch Suppression von Amber-Stop-Codons in die hSOD1 in *S. cerevisiae*

4.1.1 Orthogonale Paare

Ursprünglich war es beabsichtigt, Azido- oder Alkin-Gruppen ortsspezifisch in Zielproteine in *S. cerevisiae* für anschließende bioorthogonale Transformationen einzufügen. Dazu wurden die Expressionsvektoren pAz1/tRNA_{CUA} und Az6/tRNA_{CUA} (vergl. Tabelle 3) zum Einbau von *p*-Azido-L-phenylalanin (AzF) und *p*-Propargyloxy-L-phenylalanin (PxF; Abb. 9) wie von der Gruppe um P. G. Schultz beschrieben^[62-64, 115] rekonstruiert (siehe 4.1.1.1 für Details).

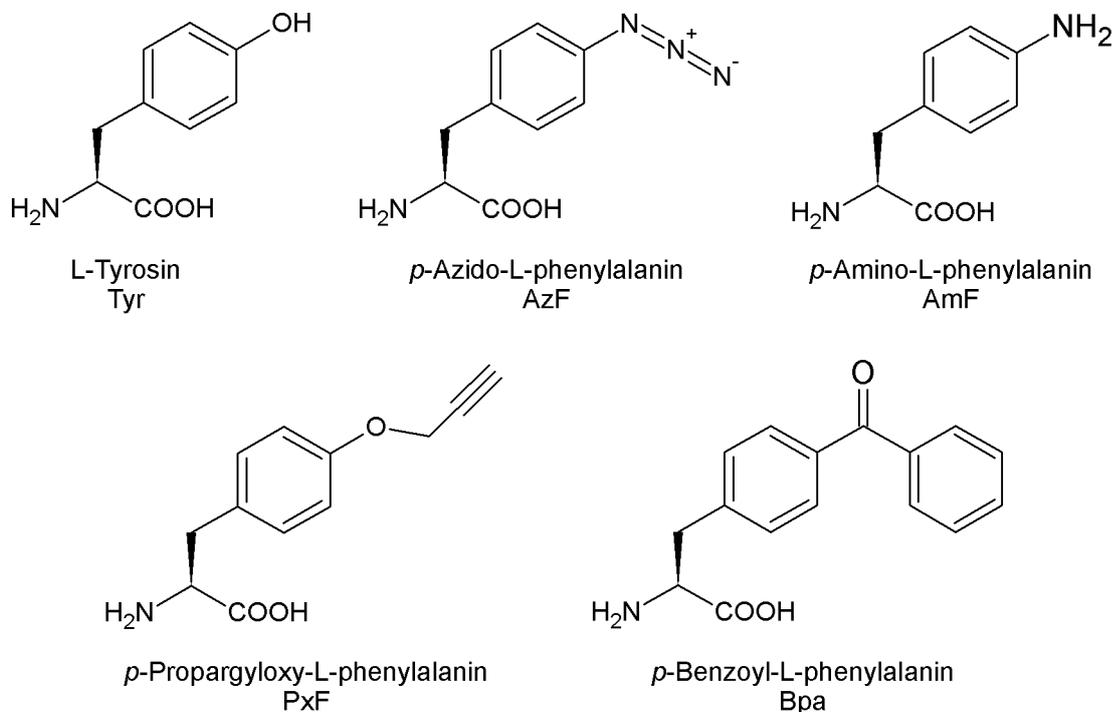


Abb. 9 Strukturen von Tyrosin und dessen Analoga, die in dieser Studie verwendet wurden.

Es sind die Strukturen, die Namen und die Abkürzungen gezeigt.

Da aber die Einbauversuche erfolglos verliefen, vermuteten wir, dass unsere Expressionskonstrukte für die orthogonalen Paare, obwohl nach Literaturangaben^[62, 63] rekonstruiert, dennoch in möglicherweise unerkannten Aspekten von den original Vektoren abweichen könnten. Deshalb wurden die original Plasmide pAz3/3SUP-tRNA_{CUA}^[37] und pPR1/3SUP-tRNA_{CUA}^[37] die uns freundlicherweise von P. G. Schultz zur Verfügung gestellt wurden, in unsere Sammlung an orthogonalen Paaren mit eingeschlossen und wir beschlossen, eine

systematische biochemische Analyse der verschiedenen orthogonalen Paare durchzuführen. Das orthogonale Paar für den Foto-Crosslinker *p*-Benzoyl-L-phenylalanin (Bpa; Abb. 9) wurde in der Gruppe um Schultz und in anderen Laboratorien^[74, 116, 117] erfolgreich in Hefe verwendet. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit pBpa/tRNA_{CUA}^[63] (freundlicherweise von S. Hahn und P. G. Schultz zur Verfügung gestellt) zusammen mit pTyr/tRNA_{CUA} (rekonstruiert nach Chin, 2003^[62]; vergl. Tabelle 3) als positive Kontrollen verwendet.

Tabelle 3: Details der orthogonalen Paare, die für den *in vivo* Einbau von Tyr-Analoga in hSOD1(W33TAG) eingesetzt wurden.

Die Paare bestehen aus der *E. coli* TyrRS oder einer davon abstammenden Mutante und der *E. coli* Amber-Suppressor-tRNA_{CUA}. Die aaRSs werden unter dem starken, konstitutiven *ADH1*-Promotor exprimiert (siehe Abb. 10 für Plasmidkarte).

* Der verbesserte Promotor besteht aus einem Hefe *PGK1*-Promotor, gefolgt von drei Kopien des *E. coli* tRNA_{CUA} Gens (mit interner B-Box), jeweils flankiert von 55 bp *upstream* und 30 bp *downstream* Sequenzen des Hefe *SUP4* Gens.

Orthogonales Paar	aaRS	Original Nomenklatur	Aminosäure Spezifität	6×His-Tag an aaRS	Kopien von tRNA _{CUA}	Promotor für tRNA _{CUA}	Quelle
TyrRS /tRNA _{CUA}	TyrRS	TyrRS ^[63]	Tyr	keiner	1	interne B-Box	Diese Arbeit, rekonstruiert nach ^[63]
AzRS1 /tRNA _{CUA}	AzRS1	<i>p</i> -azido PheRS1 ^[63]	AzF	keiner	1	interne B-Box	Diese Arbeit, rekonstruiert nach ^[63]
AzRS3 /3SUP-tRNA _{CUA}	AzRS3	<i>p</i> -azido PheRS3 ^[37]	AzF	C-term.	3	verbessert*	[37]
AzRS6 /tRNA _{CUA}	AzRS6	<i>p</i> -azido PheRS6 ^[63]	AzF + PxF	keiner	1	interne B-Box	Diese Arbeit, rekonstruiert nach ^[63, 64]
PxRS1 /3SUP-tRNA _{CUA}	PxRS1	<i>p</i> -Ppa RS1 (PR1) ^[37]	PxF	C-term.	3	verbessert*	[37]
BpaRS /tRNA _{CUA}	BpaRS	<i>p</i> -benzoyl PheRS ^[63]	Bpa	keiner	1	interne B-Box	[63]

pTyr/tRNA_{CUA} war das ursprüngliche Paar, von dem aus alle anderen Paare entwickelt wurden. Dieses und die abgeleiteten mutierten Paare sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Um eine Spezifität für eine gewünschte NCAA hervorzurufen, wurde die *E. coli* TyrRS in der Bindetasche und im aktiven Zentrum mutiert. In einer Art gerichteter Evolution wurden zufällige Mutation von ausgewählten Resten (Tyr37, Asn126, Asp182, Phe183 und Leu186) durchgeführt (vergleiche

hierzu auch Abb. 11 und 1.3). Diese Reste wurden auf der Grundlage der Kristallstruktur der homologen TyrRS aus *Bacillus stearothermophilus* gewählt und sind alle weniger als 6,5 Å von der para-Position des Aryl Rings des gebundenen Tyrosins entfernt. In einem positiv/negativ-Screening in Hefe wurden in drei Selektionsrunden (positiv-negativ-positiv) die TyrRS Mutanten detektiert, die nur noch eine Spezifität für die gewählte NCAA und nicht mehr für Tyr haben sollten.^[63]

In allen, die orthogonalen Paare enthaltenen Plasmide, wurden die wt *E. coli* TyrRS und alle TyrRS Mutanten unter dem starken, konstitutiven *ADH1* Promotor exprimiert. In pAz3/3SUP-tRNA_{CUA} und pPR1/3SUP-tRNA_{CUA} wurde durch Sequenzierung ein C-terminaler 6×His-Tag an der aaRS gefunden. Dies wurde in den relevanten Publikation nicht spezifisch erwähnt, aber durch eine erneute Überprüfung der veröffentlichten Primersequenzen wurde deutlich, dass diese 6×His-Tags in der Arbeit von Chen *et al.* 2007 eingeführt wurden.^[37]

Etwas komplizierter ist die Expression der *E. coli* Suppressor-tRNA_{CUA}, da sich die Expression von prokaryontischen tRNAs in eukaryotischen Hefen^[57, 58] von der der RNA-Polymerase II Strukturgenen mit ihren Kern-Promotor Elementen *upstream* der codierenden Sequenz (wie etwa TATA-Box, etc.) unterscheidet. Diese RNA-Polymerase III tRNA-Gene verwenden A- und B-Boxen^[57, 118] als interne Promotor-Elemente. Ein Vergleich zwischen dem Hefe Suppressor-tRNA-Gen *SUP4* und dem *E. coli* Suppressor-tRNA_{CUA}-Gen deutet auf eine weniger stark konservierte A-Box und eine gut konservierte B-Box hin.^[57] Deshalb ist eine Expression der *E. coli* Suppressor-tRNA_{CUA} in Hefe ohne zusätzliche Hefepromotor Elemente möglich. Dennoch versuchten P. G. Schultz und Kollegen die Expression der *E. coli* tRNA_{CUA} in den Plasmiden pAz3/3SUP-tRNA_{CUA} und pPR1/3SUP-tRNA_{CUA} zu verbessern.^[37] Hierbei wurde das *E. coli* tRNA_{CUA} Gen zwischen 55 bp *upstream* und 30 bp *downstream* flankierende Regionen des Hefe *SUP4* Gens eingefügt. Schließlich wurden 3 Kopien dieses Konstruktes hintereinander geklont und unter die Kontrolle des starken *PGK1* Promotors (Pol II) gesetzt.

Eine schematische Darstellung der Expressionsplasmide für die orthogonalen Paare ist in Abb. 10 gezeigt. Abb. 11 zeigt einen Sequenz-vergleich der verschiedenen, verwendeten aaRS.

Natürliche aaRS zeigen eine bemerkenswerte Substrattoleranz.^[10] Dies ist auch der Grund, warum die Translation von Strukturanaloga natürlicher Aminosäuren in Proteine durch Supplementation von Aminosäureauxotrophien möglich ist

(vergl. 1.2.1). Nach dem Einbau von AzF in das Zielprotein beobachteten Chin *et al.* die reduzierte Form *p*-Amino-L-phenylalanin (AmF; Abb. 9) anstatt AzF bei der Analyse durch MALDI-Massenspektrometrie.^[63] Sie führten diese Beobachtung auf die chemische Reaktivität und Photoinstabilität der Azidogruppe während der massenspektrometrischen Analyse zurück.^[119] Allerdings kann *S. cerevisiae* als Biokatalysator verwendet werden, um Arylazide zu Arylaminen zu reduzieren.^[120, 121] Deshalb wurde AmF in die vorliegende systematische Untersuchung mit aufgenommen, um zu analysieren, ob die evolvierte AzRS in der Lage ist, AmF in das Zielprotein einzubauen.

4.1.1.1 Konstruktion der Tandem-Expressionsvektoren für die orthogonalen Paare

Die Expressionsvektoren pTyr/tRNA_{CUA}, pAz1/tRNA_{CUA} und pAz6/tRNA_{CUA} (vergl. Tabelle 3) wurden wie in der Literatur beschrieben^[62-64, 115] konstruiert. Die Primer tRNA(CUA)template_fwd und tRNA(CUA)template_rev (die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgelistet), die die codierende Sequenz für das *E. coli* tRNA_{CUA} Gen enthalten, wurden *annealed* und die daraus resultierende doppelsträngige DNA wurde für die PCR-Amplifikation mit den Primern tRNA5' (enthält eine *AgeI* Schnittstelle) und tRNA3' (enthält eine *NheI* Schnittstelle, siehe Tabelle 1) als *Template* eingesetzt. Das PCR-Produkt und der pESCTrp Zielvektor wurden mit *NheI* als auch mit *AgeI* verdaut und anschließend ligiert (= ptRNA_{CUA}). Der *ADH1*-Promotor für die Expression der *E. coli* TyrRS in *S. cerevisiae* wurde durch PCR mit den Primern pADHf (*AgeI* Schnittstelle) und pADHr (*EcoRI* Schnittstelle) zusammen mit genomischer *S. cerevisiae* DNA als *Template* generiert und das PCR-Produkt wurde mit *EcoRI* und *AgeI* verdaut. Das *E. coli* TyrRS Gen wurde PCR-amplifiziert mit den Primern pESCTrp1 (*EcoRI* Schnittstelle) und pESCTrp2 (*NotI* Schnittstelle) und genomischer *E. coli* DNA als *Template*. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit *EcoRI* und *NotI* verdaut. Der pTyr/tRNA_{CUA} Tandem-Vektor wurde durch Ligation des mit *AgeI/NotI* verdauten ptRNA_{CUA} Vektors mit dem *AgeI/EcoRI* verdautem *ADH1*-Promotor und der mit *EcoRI* und *NotI* geschnittenen *E. coli* TyrRS erhalten. Die Plasmidkarte ist in Abb. 10 dargestellt.

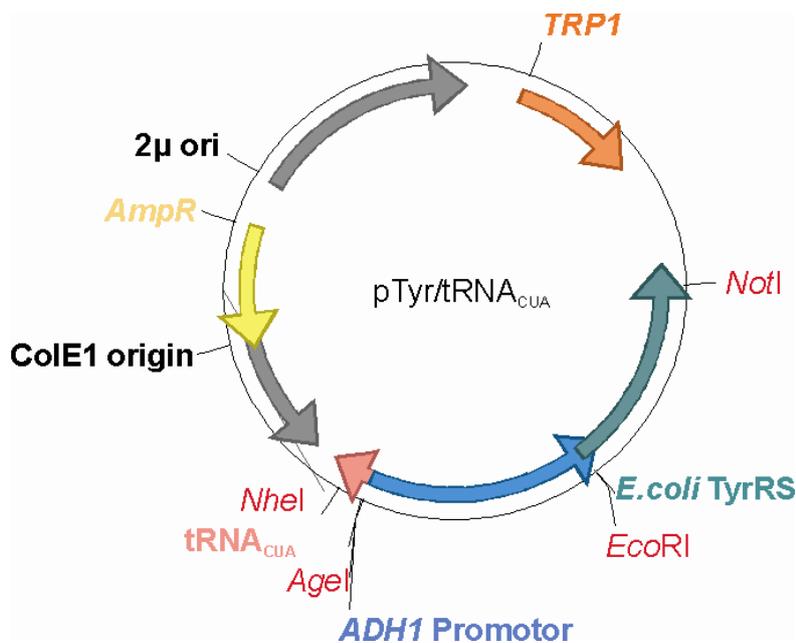


Abb. 10 Schematische Darstellung des Tandem-Expressionsvektors für *E. coli* TyrRS und Amber-Suppressor-tRNA_{CUA}.

Die *E. coli* TyrRS wird unter dem starken konstitutiven Promotor *ADH1* von einem Hefe/*E. coli* Shuttle-Vektor exprimiert. Dieser enthält ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*) und den ColE1 Replikationsursprung für Selektion und Vermehrung in *E. coli*. Der *TRP1* Auxotrophiemarker und der 2 μ Replikations-ursprung gewährleisten die Erhaltung des Plasmids in Hefe.

Der pAz1/tRNA_{CUA} Vektor, der die TyrRS Mutante AzRS1 codiert, wurde durch Mutagenese-PCR mit dem pTyr/tRNA_{CUA} Vektor als *Template* erzeugt. Dafür wurde zuerst das Primerpaar 5’-/3’Muta_N126N verwendet. Die weiteren Mutationen wurden dann mit den Primerpaaren 5’tyr_muta3306-1/pESCTrp2, 5’tyr_muta3306-2/pESCTrp2 und 5’tyr_muta3306-3/pESCTrp2 eingeführt, wobei jeweils das entstehende PCR-Produkt als neues *Template* verwendet wurde. AzRS6 wurde durch das Einbringen zusätzlicher Mutationen in die AzRS1 mit Hilfe der Mutagenese-Primerpaare Thr37f/Thr37r, Ala183f/Ala183r und Leu186f/Leu186r generiert. Abb. 11 zeigt die Mutationen, die in die TyrRS eingebaut wurden, um die aaRS-Mutanten zu erzeugen. Die Sequenzen aller Vektoren wurden durch Sequenzierung verifiziert. Ein *Alignment* der DNA- und Protein-Sequenzen von TyrRS und allen in dieser Arbeit verwendeten Mutanten ist in Abb. 11 dargestellt.

DNA-Sequenz:

```

TyrRS      GCG CTC TAT TGC --- GCG AAC AAC - TTG - GAC TTC GCC TGT CTG - GTT
AzRS1     GCA CTC CTT TGT --- GCC AAT AAT - TTG - TCT ATG GCG TGT GCG - GTT
AzRS3     GCA CTC CTG TGT --- GCC AAT AAT - TTG - TCG GCT GCC TGT GCG - GTT
AzRS6     GCA CTC ACG TGT --- GCC AAT AAT - TTG - TCG GCT GCC TGT CTT - GTT

PxRS1     GCA CTC GGG TGT --- GCC AAT AAT - CTG - TCT ATG GCC TGT TTG - ATT
BpaRS     GCA CTC GGG TGT --- GCC AAT AAT - CTG - GGT TAT GCC TGT ATG - GTT

```

Protein-Sequenz:

Position	35	36	37	38	---	124	125	126	---	178	---	182	183	184	185	186	---	225
TyrRS	A	L	Y	C	---	A	N	N	-	L	-	D	F	A	C	L	-	V
AzRS1	A	L	L	C	---	A	N	N	-	L	-	S	M	A	C	A	-	V
AzRS3	A	L	L	C	---	A	N	N	-	L	-	S	A	A	C	A	-	V
AzRS6	A	L	T	C	---	A	N	N	-	L	-	S	A	A	C	L	-	V
PxRS1	A	L	G		---	A	N	N	-	L	-	S	M	A	C	L	-	I
BpaRS	A	L	G	C	---	A	N	N	-	L	-	G	Y	A	C	M	-	V

Abb. 11 DNA- und Protein-Sequenz Alignment von TyrRS und ihren Mutanten. Mutierte Basen und ausgetauschte Aminosäuren sind farblich hervorgehoben.

4.1.2 Das Zielprotein

Genau wie in den Arbeiten aus dem Schultz Labor wurde die humane Superoxid-Dismutase 1 (hSOD1) als Zielprotein für den Einbau der Analoga gewählt. hSOD1 ist ein kleines, stabiles Protein, das in Hefe gut exprimiert wird.^[122] Zunächst wurde die Expressions-Effizienz der Wildtyp hSOD1 von einem vergleichbaren Konstrukt wie in Chin *et al.*^[63] getestet. Jedoch war die Expression der hSOD1 mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag von dem Galaktose induzierbaren *high copy* Hefe/*E. coli* Shuttle Vektor pYES2 niedrig und es war nicht möglich, saubere Protein-Präparationen zu erhalten. Aus diesem Grund wurde der als nicht ideal für Hefe geeignet beschriebene Hexahistidin-Tag^[123] durch einen *Strep*-Tag II ersetzt. Darüber hinaus wurde der induzierbare *GAL1*-Promotor^[63] gegen den starken, konstitutiven *PGK1*-Promotor ausgetauscht. Die Stärke dieses Promotors ist vergleichbar mit der des *TDH3*-Promotors,^[124] den Chen *et al.* für die hSOD1 Expression zusammen mit einem verbesserten orthogonalen System für Tyrosinanaloga in der Hefe^[37] verwendet hat. Mit diesem modifizierten Expressionskonstrukt war es möglich, reine hSOD1 in sehr guter Ausbeute zu erhalten (Daten nicht gezeigt). Um den Einbau der in Abb. 9 dargestellten Tyrosinanaloga zu ermöglichen, wurde eine Trp (TGG) → Amber-Stop-Codon (TAG) Mutation in hSOD1 an Position 33 eingeführt.

Die detaillierte Konstruktion des Expressionsvektors wird im folgenden Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben. Dort wird auch eine Karte des resultierenden Plasmids, sowie die codierende DNA- und Proteinsequenz der hSOD1(W33TAG) mit einem C-terminalen *Strep*-Tag II in Abb. 12 und Abb. 13 gezeigt.

4.1.2.1 Konstruktion des hSOD1(W33TAG) Expressionsvektors.

Das Gen für die humane Superoxid-Dismutase 1 (hSOD1) wurde mittels PCR von dem cDNA-Vektor pOTB7 (ATCC-Nummer MGC-2325) mit den Primern hSODfp (*Hind*III Schnittstelle) und hSODrp (*Eco*RI Schnittstelle, siehe Tabelle 1) amplifiziert. Ein Hexahistidin-Tag wurde am C-Terminus der hSOD1 durch den Primer hSODrp eingeführt. Das PCR-Produkt und der *high copy* Hefe/*E. coli* Shuttle Vektor pYES2 wurden beide mit *Hind*III und *Eco*RI verdaut und ligiert, wodurch der Vektor pYES2-GAL-hSOD1-6His erhalten wurde. Das Tryptophan-Codon an Position 33 der hSOD1 wurde durch Mutagenese PCR mit den Primern SODmutf und SODmutr zu dem Amber-Stop-Codon ATG mutiert. Des Weiteren wurde der induzierbare *GAL1*-Promotor auf dem pYES2-GAL-hSOD1(W33TAG)-6His Vektor über homologe Rekombination in Hefe gegen den stärkeren, konstitutiven *PGK1*-Promotor ausgetauscht. Um dies zu erreichen, wurde der *GAL1*-Promotor aus pYES2-GAL-hSOD1(W33TAG)-6His mit *Spe*I und *Pvu*II ausgeschnitten. Die DNA-Sequenz des *PGK1*-Promotors wurde durch PCR mit Primern PGK1fp und PGK1rp unter Verwendung von genomischer *S. cerevisiae* DNA als *Template* amplifiziert. Um eine effiziente homologe Rekombination zu ermöglichen, enthielten die Primer PGK1fp und PGK1rp 5'-flankierende Sequenzen von 43 nt bzw. 35 nt Länge. Diese Sequenzen waren homolog zu den geschnittenen Enden des pYES2 Vektors. Das *PGK1* PCR-Produkt mit den flankierenden Homologie-Regionen und der *Spe*I/*Pvu*II verdaute pYES2-GAL-hSOD1(W33TAG)-6His Vektor wurden zusammen in den *S. cerevisiae* Stamm InvSc1 (vergl. 2.4) transformiert und Klone, die das erfolgreich rekombinierte Plasmide pYES2-hSOD1(W33TAG)-6His enthielten wurden auf synthetisch kompletten Minimalmedium ohne Uracil (SC-Ura, vergl. 2.15.2.3) selektioniert. In ähnlicher Weise wurde der Hexahistidin-Tag gegen den *Strep*-Tag II ausgetauscht. Der pYES2-hSOD1(W33TAG)-6His Vektor wurde mit *Eco*RI linearisiert und die *Strep*-Tag II codierende Sequenz mit den entsprechenden homologen Enden wurde durch PCR mit Primern hSOD1_Strep_fp und hSOD1_Strep_rp generiert. Die Homologe Rekombination und die Selektion der positiven, den pYES2-hSOD1(W33TAG)-Strep Vektor enthaltenden Klone, wurde

wie oben für den Promotor-Austausch beschrieben durchgeführt. Die Plasmidkarte des pYES2-hSOD1(W33TAG)-Strep Vektors ist in Abb. 12 dargestellt.

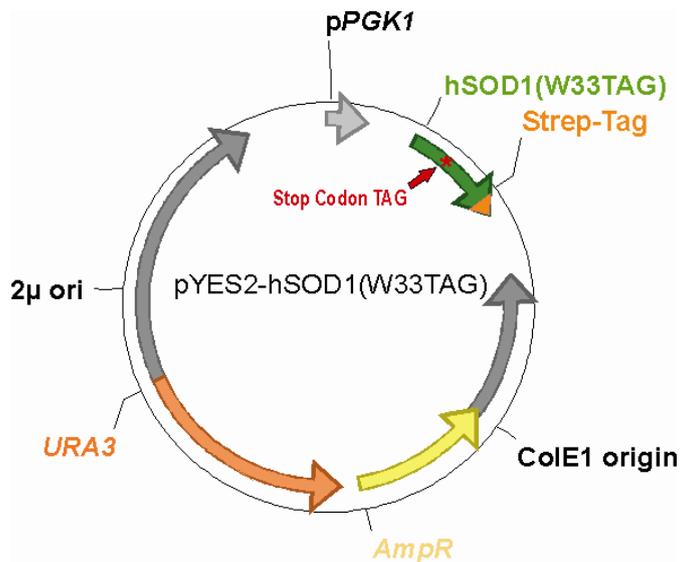


Abb. 12 Der hSOD1 Expressionsvektor.

Der *PGK1*-Promotor erlaubt die konstitutive Expression von hSOD1 mit einem *in frame* Amber-Stop-Codon (TAG) an Position 33 und einem N-terminalen *Strep-Tag* II. Der Hefe/*E. coli* Shuttle-Vektor enthält ein Ampicillin Resistenzgen (*AmpR*) und den ColE1 Replikationsursprung für die Selektion und Vermehrung in *E. coli*. Der *URA3* Auxotrophiemarker und der 2 μ Replikationsursprung gewährleisten die Erhaltung des Plasmids in Hefe.

DNA- und Aminosäure-Sequenz des hSOD1(W33TAG)-Strep Konstrukts sind in Abb. 13 wiedergegeben.

```

1 ATG GCG ACG AAG GGC GTG TGC GTG CTG AAG GGC GAC GGC CCA GTG CAG GGC ATC ATC AAT 60
1 Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Glu Gly Ile Ile Asn 20
61 TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG AAG GTG TAG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT 120
21 Phe Glu Glu Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val X Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr 40
121 GAA GGC CTG CAT GGA TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT 180
41 Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser 60
181 GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCI CTA TCC AGA AAA CAC GGT GGG CCA AAG GAT GAA GAG AGG 240
61 Ala Gly Pro His Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg 80
241 CAT GTT GGA GAC TTG GGC AAT GTG ACT GCT GAC AAA GAT GGT GTG GGC GAT GTG TCT ATT 300
81 His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala Asp Val Ser Ile 100
301 GAA GAT TCT GTG ATC TCA CTC TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT GGC CGC ACA CIG GTG GTC 360
101 Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val 120
361 CAT GAA AAA GCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT GGA AAT GAA GAA AGT ACA AAG ACA GGA AAC 420
121 His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn 140
421 GCT GGA AGT CGT TTG GCT TGT GGT GTA ATT GGG ATC GGC CAA agc gct TGG AGC CAC CCG 480
141 Ala Gly Ser Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Glu Ser Ala Trp Ser His Pro 160
481 CAG TTC GAA AAA 492
161 Glu Phe Glu Lys 164

```

Abb. 13 DNA- und Protein-Sequenz der codierenden Sequenz für hSOD1(W33TAG) mit einem N-terminalen Strep-Tag II.

Die Position des Amber-Stop-Codons (eingerahmt) ist in der Proteinsequenz mit X dargestellt. Die hSOD1 Sequenz ist grün und der *Strep-Tag* II ist orange hervorgehoben.

4.1.3 Expression und Analyse der hSOD1 Varianten

Analog zur Originalstudie^[63] wurden alle Einbauexperimente mit den Tyr-Analoga in dem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm InvSc1 durchgeführt (siehe 3.2.6 für experimentelle Details). InvSc1 wurde jeweils mit einem der orthogonalen Vektoren aus Tabelle 3 und dem hSOD1(W33TAG) Expressionskonstrukt co-transformiert. Als Kontrolle für eine effiziente Suppression des Amber-Stop-Codons wurde Wildtyp *E. coli* TyrRS zusammen mit ihrer Amber-Suppressor-tRNA, d. h. das orthogonale TyrRS/tRNA_{CUA} Paar, in Gegenwart von Tyrosin exprimiert. Um die Orthogonalität der entwickelten TyrRS Mutanten gegenüber Tyr zu beurteilen, wurde das AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA} Paar zusammen mit einem Überschuss an Tyr verwendet. Darüber hinaus wurde hSOD1(W33TAG) in Gegenwart von AzF und den drei orthogonalen Paaren mit entsprechender Substratspezifität (vergl. Tabelle 3), AzRS1/tRNA_{CUA}, AzRS6/tRNA_{CUA} oder AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA} exprimiert, um die Einbaueffizienzen zu vergleichen. Wie oben dargelegt, können Arylazide wie AzF von Hefe enzymatisch zu den Amino-Derivaten umgewandelt werden. Daher sollte eine mögliche Toleranz von AzRS1, AzRS3 und AzRS6 der drei zuvor erwähnten orthogonalen Paare gegenüber AmF beurteilt werden. Es wurde auch beabsichtigt, PxF mit den orthogonalen Paaren AzRS6/tRNA_{CUA}^[63] oder PxRS/tRNA_{CUA}^[37] in hSOD1(W33TAG) einzubauen. Und schließlich wurde auch Bpa und das entsprechende BpaRS/tRNA_{CUA} Paar in diese Studie mit einbezogen.

Volllängen hSOD1(W33TAG) wird nur exprimiert, wenn das *in frame* Amber-Stop-Codon effizient supprimiert wird. Im Gegensatz zu *E. coli* ist die Expression fremder Proteine in *S. cerevisiae*, trotz *high copy* Expressionsvektoren sehr oft nicht auf SDS-Gelen nachweisbar. Allerdings war es nicht möglich, volllängen hSOD1(W33TAG) in Gesamt-Zelllysaten auf einem Immunoblot (siehe 3.3.2.3 für Details) mit einem Anti-*Strep*-Tag II-Antikörper zu detektieren. Deshalb wurden die hSOD1-Varianten aus den Zelllysaten mit *Strep*-Tactin-Säulen extrahiert und nach der Reinigung konzentriert (siehe 3.3.1.5). Vermutlich aufgrund extrem niedriger Proteinausbeuten, konnten Banden von volllängen hSOD1 nur in den Konzentraten und erst nach Immunoblot mit Anti-*Strep*-Tag II-Antikörper beobachtet werden (siehe Abb. 14).

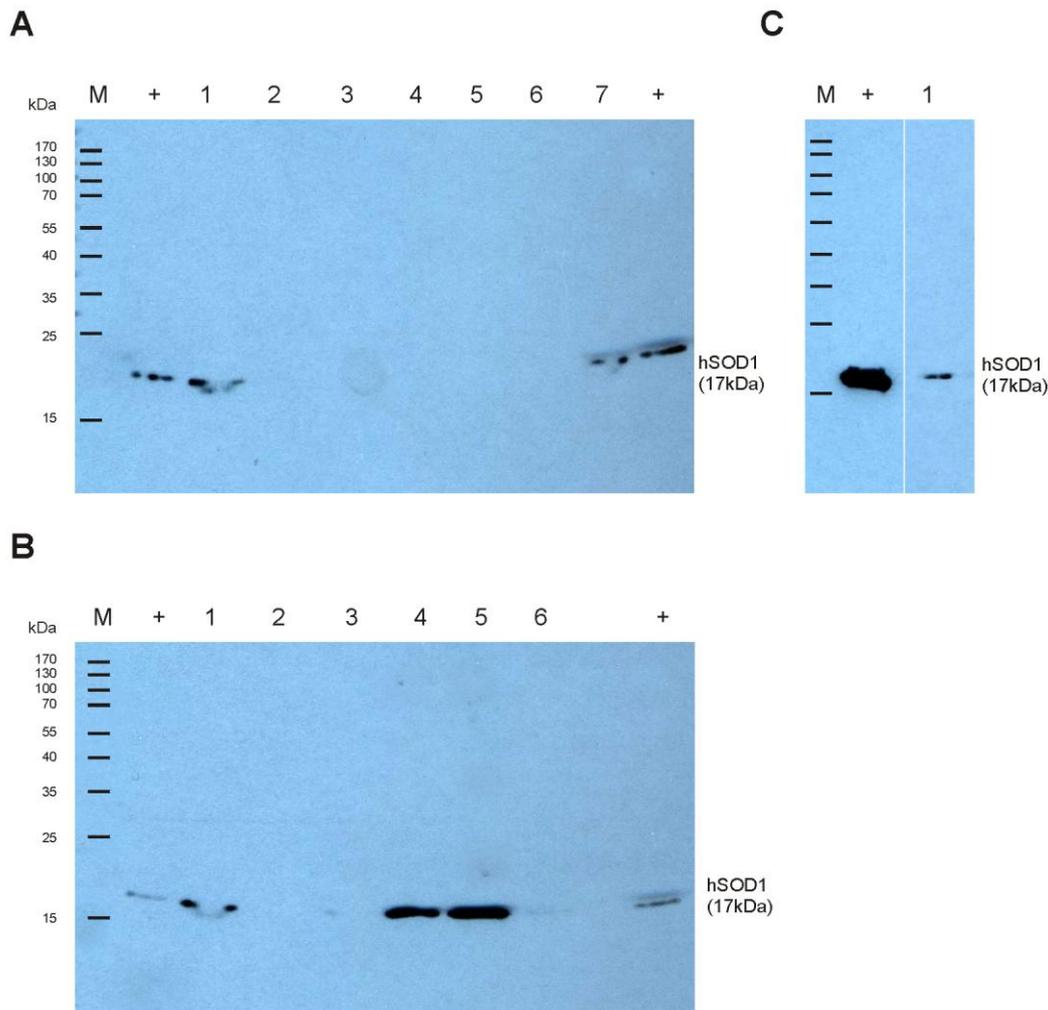


Abb. 14 In vivo Einbau von Tyr und dessen Analoga.

hSOD1 wurde in Anwesenheit eines orthogonalen Paares und eines der in Abb. 9 gezeigten Analoga, wie nachstehend angegeben exprimiert. Die exprimierten Proteinvarianten wurden durch *Strep*-Tag II Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Elutionsfraktionen durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Je 20 μ l der Proteinpräparationen wurden auf Immunoblots unter Verwendung eines monoklonalen Anti-*Strep*-Tag II-Antikörpers, für den Nachweis der erfolgreichen Suppression des *in frame* Amber-Stop-Codons in hSOD1(W33TAG), analysiert. Das durchschnittliche, berechnete Molekulargewicht von hSOD1(W33X) beträgt 17 kDa; X steht hierbei für Tyr oder eines seiner Analoga.

(A) 1, TyrRS/tRNA_{CUA}, Tyr (1. Wiederholung); 2, AzRS1/tRNA_{CUA}, AzF; 3, AzRS1/tRNA_{CUA}, AmF; 4, AzRS6/tRNA_{CUA}, AzF; 5, AzRS6/tRNA_{CUA}, PxF; 6, AzRS6/tRNA_{CUA}, AmF; 7, PxRS1/3SUP-tRNA_{CUA}, PxF; M; Molekulargewichtsmarker; +, Wildtyp hSOD1 mit C-terminalen *Strep*-Tag II

(B) 1, TyrRS/tRNA_{CUA}, Tyr (2. Wiederholung); 2, AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA}, AzF; 3, AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA}, Tyr; 4, AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA}, AmF (1. Wiederholung); 5, AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA}, AmF (2. Wiederholung); 6, AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA}, AmF (3. Wiederholung); M und + wie in (A) beschrieben.

(C) Für den Einbau von Bpa wurde das Orthogonale Paar BpaRS/tRNA_{CUA} verwendet (1); M und + wie in (A) beschrieben.

Auf dem Immunoblot wurde ein hSOD1(W33X) Signal bei der Expression in Gegenwart des orthogonalen TyrRS/tRNA_{CUA} Paares zusammen mit Tyr gefunden,

was eine erfolgreiche Amber-Stop-Codon Suppression belegt (Abb. 14 A und B, jeweils Spur 1). AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA} in Kombination mit einem Überschuss an Tyr führte zu einer kaum nachweisbaren Expression von hSOD1(W33TAG) (Abb. 14 B, Spur 3), was auf eine hohe Spezifität des orthogonalen Paares hindeutet. Allerdings schlugen alle Versuche, AzF mit einem der orthogonalen Paaren mit AzRS in hSOD1(W33TAG) einzubauen, fehl (AzRS1/tRNA_{CUA}, Abb. 14 A, Spur 2; AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA} Abb. 14 B, Spur 2; AzRS6/tRNA_{CUA}, Abb. 14 A, Spur 4). Bei zwei von drei hSOD1 Expressionen mit dem AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA} Paar und AmF konnten starke Signale auf dem Immunoblot beobachtet werden. Die dritte Wiederholung ergab merkwürdigerweise nur eine schwache Bande (Abb. 14 B, Spuren 4-6), während keine Banden mit den orthogonalen Paaren mit AzRS1 und AzRS6 detektiert wurden (Abb. 14 A, Spuren 3 und 6). Entgegen der ursprünglichen Studie, in der eine doppelte Spezifität der AzRS6 für AzF und PxF berichtet wurde,^[64] war auf dem Immunoblot nur bei PxF zusammen mit PxRS1 (Abb. 14 A, Spur 7), aber nicht mit AzRS6 (Abb. 14 A, Spur 5) ein hSOD1(W33X) Signal zu sehen. Diese Beobachtung kann auf die verbesserte Expression der Suppressor-tRNA von dem p PR1/3SUP-tRNA_{CUA} Vektor zurückgeführt werden. In diesem Konstrukt ist die Suppressor-tRNA zwischen kurzen *upstream* und *downstream* Bereichen des Hefe *SUP4* Gens eingefügt. Drei Kopien dieser Kasette werden in Tandem von dem starken *PGK1*-Promotor exprimiert.^[37] Die gleiche Anordnung von mehreren SUP-tRNA_{CUA} Kopien befindet sich auch auf dem pAz3/3SUP-tRNA_{CUA} Vektor, was die starke Expression von hSOD1 in Gegenwart von AmF mit AzRS3, aber nicht mit AzRS1 oder AzRS6 erklären könnte. Die orthogonalen Paare mit diesen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen enthalten nur eine einzelne Kopie der tRNA_{CUA} (Tabelle 3).

Wie erwartet, wurde ein klares Signal für hSOD1 Expression in der Gegenwart von Bpa und dem orthogonalen BpaRS/tRNA_{CUA} Paar beobachtet (Abb. 14 C, Spur 1).

Alle hSOD1 Varianten, die Signale auf dem Immunoblot lieferten, wurden durch LC-ESI-MS weiter analysiert (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: ESI-MS-Analysen der auf dem Immunoblot in Abb. 14 detektierten hSOD1 Varianten.

Die zugehörigen ESI-MS-Spektren sind in Abb. 15 gezeigt. Alle hSOD1 Varianten wurden, wie auch in der Literatur berichtet ^[125], mit abgespaltenem N-terminalen Methionin und Acetylierung des Alanin an Position 2 gefunden. In manchen Fällen wurden Massen beobachtet, die dem Protein mit einem gebundene Natrium-Ion (+22,99 Da) entsprechen. Dies stammt sehr wahrscheinlich vom *Strep*-Tactin Elutionspuffer, der 150 mM NaCl enthält und in dem die Massen der Proteine analysiert wurden. Um Protein Verluste zu vermeiden, wurde der Puffer während der Probenkonzentration nicht ausgetauscht. In einem Fall (Tyr 2. Wiederholung) wurde eine bekannte Disulfidbrücke (-2 Da; zwischen C57 und C146^[126]) gefunden.

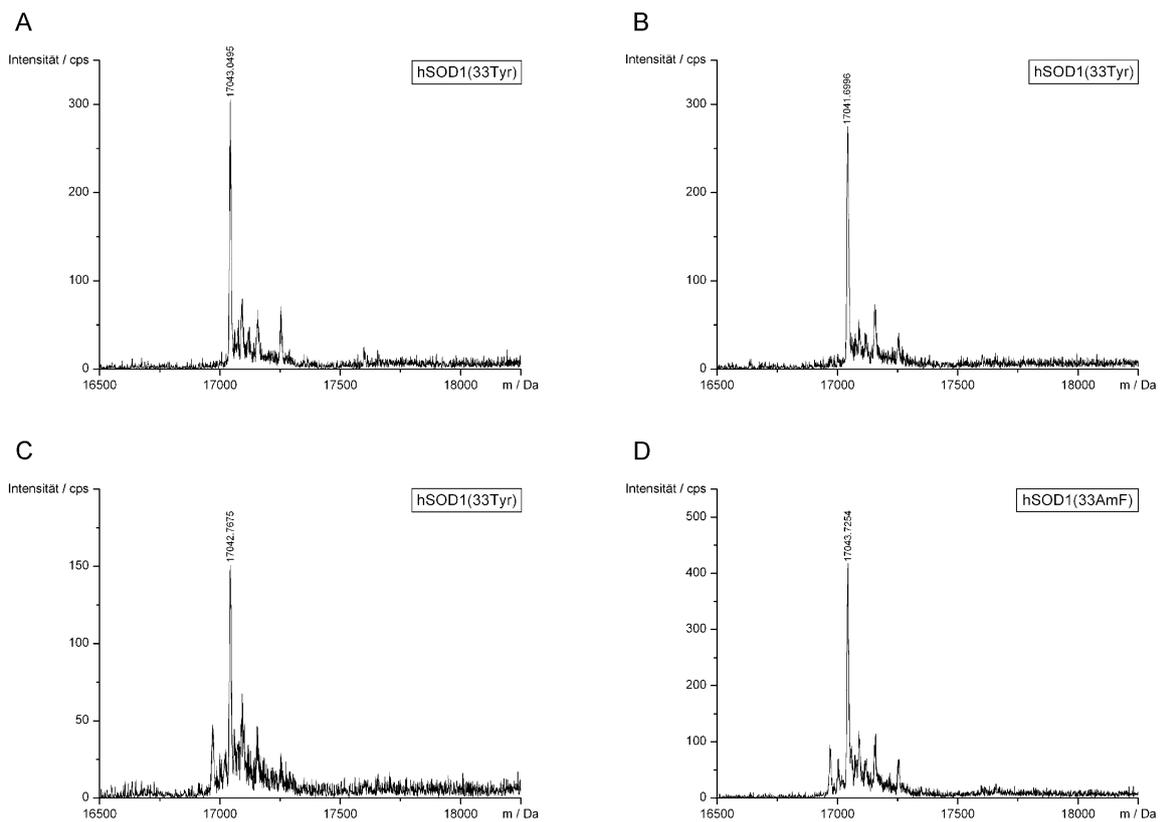
* Alle Massen wurden für ein hSOD1 Protein ohne N-terminales Methionin, mit acetyliertem Alanin an Position 2 und mit vollständig reduzierten Cysteinen berechnet.

Analog	Orthogonales Paar	Berechnete Masse (Da)*	Gefundene Masse (Da)	Δm (Da)	Interpretation	Protein Ausbeute (pro l)
Tyr 1. Wiederholung	TyrRS/tRNA _{CUA}	17020,6863	17043,0495	+22,3632	+Na ⁺	60 µg
Tyr 2. Wiederholung	TyrRS/tRNA _{CUA}	17020,6863	17041,6996	+21,0133	+Na ⁺ , S-S	120 µg
Tyr	AzRS3/3SUP-tRNA _{CUA}	17020,6863	17042,7675	+22,0812	+Na ⁺	42 µg
AmF 1. Wiederholung	AzRS3/3SUP-tRNA _{CUA}	17019,7016	17043,7254	+24,0238	+Na ⁺	78 µg
AmF 2. Wiederholung	AzRS3/3SUP-tRNA _{CUA}	17019,7016	17042,3620	+22,6604	+Na ⁺	114 µg
AmF 3. Wiederholung	AzRS3/3SUP-tRNA _{CUA}	17019,7016	17043,0344	+23,3328	+Na ⁺	90 µg
PxF	PxRS1/3SUP-tRNA _{CUA}	17058,7344	17057,7976	-0,9368		96 µg
Bpa	BpaRS /tRNA _{CUA}	17108,7933	17108,9558	+0,1625		80 µg

Die gefundene Masse der Tyrosin-Variante entspricht einem hSOD1(W33Y)-Protein, bei dem das N-terminale Met abgespalten und die zweite Aminosäure, Ala, acetyliert wurde. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den veröffentlichten post-translationalen Modifikationen von hSOD1 in *S. cerevisiae*^[125]. Dementsprechend wurden diese post-translationalen Modifikationen bei der Berechnung der Protein Massen der Varianten berücksichtigt. Neben hSOD1(W33Y) wurde auch die Bildung von hSOD1(W33PxF) und hSOD1(W33Bpa) eindeutig bestätigt (vergl. Tabelle 4). Obwohl keine klare Bande mit dem AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA} Paar und

überschüssigem Tyr auf dem Immunoblot (Abb. 14 B, Spur 3) nachgewiesen werden konnte, bestätigte die massenspektrometrische Analyse das Vorhandensein von hSOD1(W33Y) auch in dieser Probe. Allerdings konnte aus der durchgeführten massenspektrometrischen Analyse nicht eindeutig abgeleitet werden, ob AmF oder Tyr (Massendifferenz nur 1 Da) in hSOD1(W33TAG) mit Hilfe des AzRS3/3SUP-tRNA_{CUA} Paares in Kombination mit AmF eingebaut wurde, da die Auflösung zu niedrig war. Leider lieferten die sehr geringen Mengen an Protein, die für die Analyse zur Verfügung standen, ESI-MS-Spektren mit relativ geringem Signal/Rausch-Verhältnis (Abb. 15).

Die erhaltenen Proteinausbeuten waren äußerst gering und lagen lediglich zwischen 42 und 120 µg pro Liter Kulturvolumen für die in der Massenanalyse bestätigten hSOD1(W33X) Varianten (siehe Tabelle 4). Diese Mengen sind deutlich geringer, als die zuvor veröffentlichten Werte von 8-15 mg/l. [37, 63, 70]



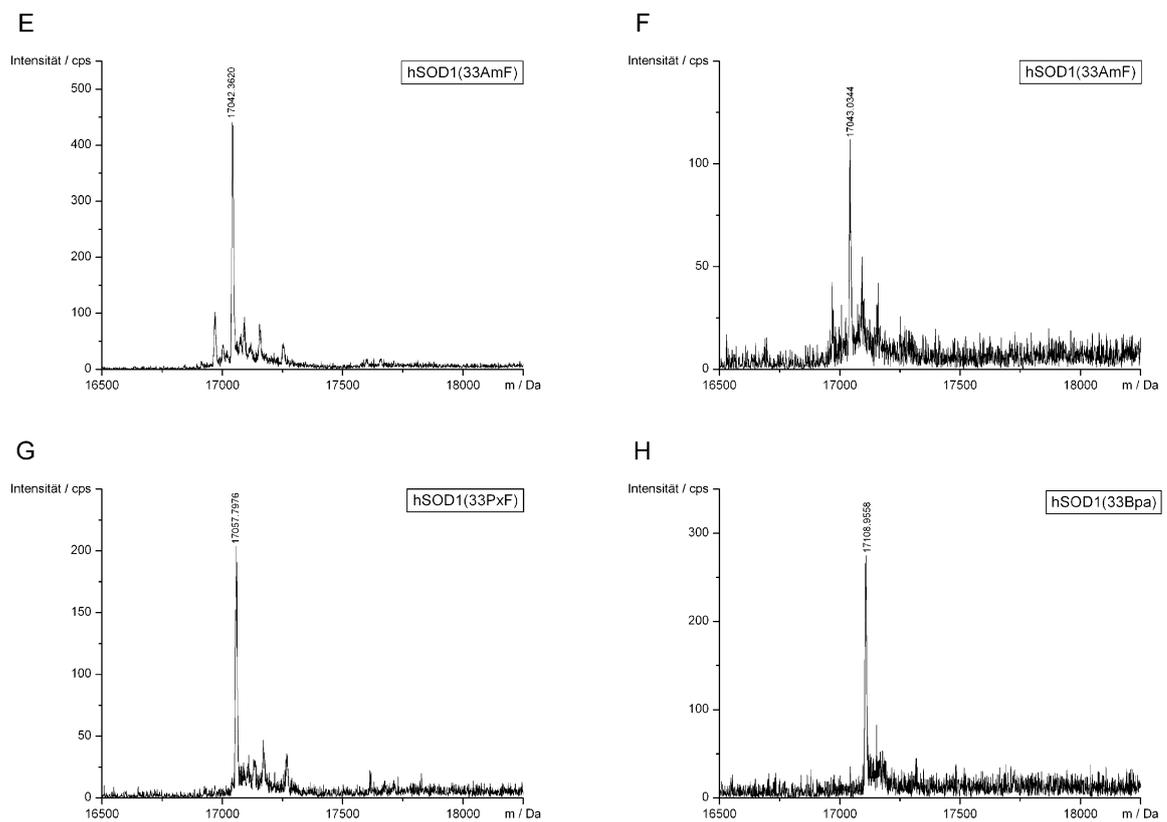


Abb. 15 ESI-MS-Spektren der auf dem Immunoblot in Abb. 14 detektierten hSOD1 Varianten.

Die TyrRS Mutante, die für den Aminosäureeinbau verwendet wurde, ist in Klammern angegeben. hSOD1(W33Y) (TyrRS), 1. Wiederholung (**A**); hSOD1(W33Y) (TyrRS), 2. Wiederholung (**B**); hSOD1(W33Y) (AzRS3) (**C**); hSOD1(W33AmF) (AzRS3), 1. Wiederholung (**D**); hSOD1(W33AmF) (AzRS3), 2. Wiederholung (**E**); hSOD1(W33AmF) (AzRS3), 3. Wiederholung (**F**); hSOD1(W33PxF) (PxRS1) (**G**); hSOD1(W33Bpa) (BpaRS1) (**H**).

Bei den hier durchgeführten Versuchen, hSOD1 mit AzF, AmF, PxF und Bpa in Hefe zu exprimieren, wurde AzF von keiner der erwarteten aaRSs (AzRS1, AzRS6 und AzRS3) eingebaut. So war es nicht möglich, im Gegensatz zu Daten die von P. G. Schultz^[37] veröffentlicht wurden, hSOD1(W33AzF) auf Immunoblots oder durch ESI-MS-Analyse, trotz mehrmaliger Wiederholung der Experimente, nachzuweisen. Vielleicht ist AzF instabil in Hefezellen und wird während der Zielprotein Expression zu AmF reduziert, das dann anstelle von AzF eingebaut wird. Dies könnte möglich sein, da in der Literatur beschrieben wird, dass Arylazide enzymatisch mit Hefe als Biokatalysator zu Arylaminen reduziert werden.^[120] Und es ist auch bekannt, dass AzF durch Licht zu AmF reduziert werden kann.^[127] Problematisch bei der Beantwortung dieser Frage ist die Tatsache, dass P. G. Schultz und Kollegen in ihren Publikationen bei den MS-Analysen nur die reduzierte hSOD1(W33AmF) Form zeigen. Sie geben an, dass dies von der Probenvorbereitung für Maldi-MS Analyse herrührt.^[119] Doch

konnten wir in unseren Proben, wenn wir AzF zum Medium hinzufügten hSOD1(W33AmF) nicht finden, wohingegen zu unserer Überraschung AmF mit AzRS3 scheinbar eingebaut wurde, wenn dieses direkt zugegeben wurde. So könnte es auch der Fall sein, dass AzF bereits während der aaRS Evolution reduziert wurde und so die AzRSs gegen AmF und nicht wie erwartet gegen AzF gescreent wurden.

Es war auch auffällig, dass AmF und PxF nur mit den Tandem-Vektoren, bei denen die tRNA_{CUA} Expression optimiert wurde, eingebaut werden konnten (vergl. Tabelle 3). Dies deutet darauf hin, dass 3 Kopien der tRNA_{CUA} zusammen mit einem optimierten Promotor zu einer verbesserten Stop-Codon Suppression zu führen scheinen, wie dies publiziert wurde.^[37]

Die Suppression mit Bpa funktionierte, auch ohne das optimierte Plasmid, mit der BpaRS problemlos, was die Funktionstüchtigkeit unseres Versuchsaufbaus bestätigte. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das Scheitern AzF mit den anderen orthogonalen Paaren einzubauen, aus einem falschen experimentellen Aufbau herrührte. Die Funktion der BpaRS konnte bis jetzt auch schon mehrmals von anderen Gruppen unabhängig reproduziert werden.^[74, 116, 117]

4.1.4 Intrazelluläre Expression von TyrRS Mutanten

Aufgrund der ineffizienten Suppressions- und Einbau-Ergebnisse, wurde die Expression der TyrRS Mutanten AzRS1, AzRS3 und PxRS von den Tandem-Expressionsvektoren in Hefe überprüft. Dafür wurde ein C-terminaler 6×His-Tag an AzRS1 in pAz1/tRNA_{CUA} über homologe Rekombination eingefügt. Das den Hexahistidin-Tag tragende DNA-Fragment wurde durch PCR mit den Primern azPheRS1-(6×His)_fp und azPheRS1-(6×His)_rp erzeugt (Primer-Sequenzen siehe Tabelle 1) und dann in den mit *NotI* linearisierten pAz1/tRNA_{CUA} Vektor eingeführt. AzRS3 und PxRS der Konstrukte pAz3/3SUP-tRNA_{CUA} und pPR1/3SUP-tRNA_{CUA} tragen bereits einen C-terminalen 6×His-Tag (siehe Tabelle 3).

Anschließend wurde der InvSc1 *S. cerevisiae* Expressions Stamm mit dem pAz1(His)/tRNA_{CUA} Vektor, oder einem der Vektoren pAz3/3SUP-tRNA_{CUA} bzw. pPR1/3SUP-tRNA_{CUA} transformiert. Die Expression der TyrRS Mutanten wurde mit einem Klon für AzRS1 und je drei Expressionsklonen für AzRS3 und PxRS1 in 5 ml SC-ura-trp Medium bei 30°C für 24 Stunden durchgeführt. Die Hefezellen wurden wie unter 3.3.1.3 beschrieben für das Immunoblotting (vergl. 3.3.2.3)

vorbereitet. Die Detektion erfolgte dabei mit einem Anti-6xHis-Antikörper (siehe Abb. 16).



Abb. 16 Intrazelluläre Expression der TyrRS Mutanten von verschiedenen orthogonalen Paaren.

Die Hefezellen wurden für das Immunoblotting wie unter 3.3.1.3 beschrieben hergestellt. Die Proteine wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und mit einem monoklonalen Anti-Hexahistidin Antikörper analysiert. Ein C-terminaler Hexahistidin-Tag musste für Immundetektion an AzRS1 in pAz1/tRNA_{CUA} (Spur 1) angefügt werden. AzRS3 und PxRS1 auf pAz3/3SUP-tRNA_{CUA} und pPR1/3SUP-tRNA_{CUA} enthielten bereits einen C-terminalen Hexahistidin-Tag^[37]. Drei verschiedene Expressionsklone wurden jeweils analysiert (Spuren 2-4 und 5-6). M; Molekulargewichtsmarker; +, Wildtyp hSOD1 mit C-terminalen Hexahistidin-Tag als positive Kontrolle.

Obwohl die Expression von AzRS1 mit pAz1/tRNA_{CUA} deutlich nachweisbar war (Abb. 16, Spur 1), gab es eine vergleichsweise niedrigere Expression von AzRS3 und PxRS mit pAz3/3SUP-tRNA_{CUA} bzw. pPR1/3SUP-tRNA_{CUA}, mit jeweils allen 3 verschiedenen getesteten Expressionsklonen (Abb. 16, Spuren 2-3 und Spuren 4-6).

Vermutlich sind die beobachteten, sehr geringen Expressionsniveaus der TyrRS Mutanten von den Expressionsvektoren der orthogonalen Paare in Hefe mit ein Grund für die schlechten Ausbeuten in den Einbau-Experimenten.

4.2 *In vitro* Aktivierung von Tyrosinanaloga durch die verschiedenen TyrRS-Mutanten

Um die Aminoacylierungseigenschaften der aaRS, die für den *in vivo* Einbau der Tyr-Analoga in hSOD1(W33TAG) verwendet wurden, genauer zu analysieren, wurden *in vitro* ATP-PPi-Austausch-Assays^[107, 128] durchgeführt (technische Details sind in 3.3.3.1 beschrieben). Die Aminoacylierung ist ein zweistufiger Prozess, bei dem die Aminosäure zuerst aktiviert und dann auf eine entsprechende tRNA geladen wird. Während der Aktivierung wird ein Molekül ATP verbraucht und Pyrophosphat freigesetzt. Da diese Reaktion reversibel ist, ist die Menge an radioaktivem ATP, die aus [³²P]-Pyrophosphat in der Rückreaktion gebildet wird, ein Maß für die Aktivierung einer Aminosäure durch eine aaRS.

4.2.1 Klonierung und Expression von Wildtyp TyrRS und TyrRS Mutanten für den ATP-PPi Assay.

Für die Expression in *E. coli* und anschließender Reinigung über Ni-Chelat-Chromatographie wurden His-*tagged* Fusionsproteine von TyrRS, AzRS1, AzRS6, AzRS3 und BpaRS konstruiert. Dafür wurden die Sequenzen der Wildtyp TyrRS und aller TyrRS Mutanten mit den Primern pESCTrp1 und pESCTrp2 und den entsprechenden Expressionsvektoren der orthogonalen Paare als *Templates* mittels PCR amplifiziert. Der Primer pESCTrp1 enthält eine *EcoRI* und der Primer pESCTrp2 enthält eine *NotI* Schnittstelle, die zusätzlichen Nukleotiden an ihren 5'-Enden sorgen für eine effiziente Restriktion. Die PCR-Fragmente wurden mit *EcoRI* und *NotI* verdaut und in den mit den gleichen Enzymen geschnitten pET28a Vektor (vergl. 2.1) ligiert, so dass der Hexahistidin-Tag des pET28a Vektors mit dem N-Terminus der aaRSs fusioniert wurde. Die daraus resultierenden Expressionsplasmide pET28a-H6-aaRS wurden durch Sequenzierung verifiziert.

Der B834(DE3) *E. coli*-Stamm (vergl. 2.1) wurde mit den pET28a-H6-aaRS Expressionsvektoren transformiert und die einzelnen aaRS wurden wie unter 3.2.4.2 beschrieben exprimiert. Anschließend wurden die aaRS über Ni-Chelat-Chromatographie (vergl. 3.3.1.2) aufgereinigt und gegen aaRS-Puffer (vergl. 2.12.8) dialysiert. Die aufkonzentrierten Proteinpräparationen wurden dann über SDS-PAGE (3.3.2.2) und ESI-MS-Analyse (3.3.4) auf ihre Reinheit hin untersucht (siehe Abb. 17, Tabelle 5 und Abb. 18).

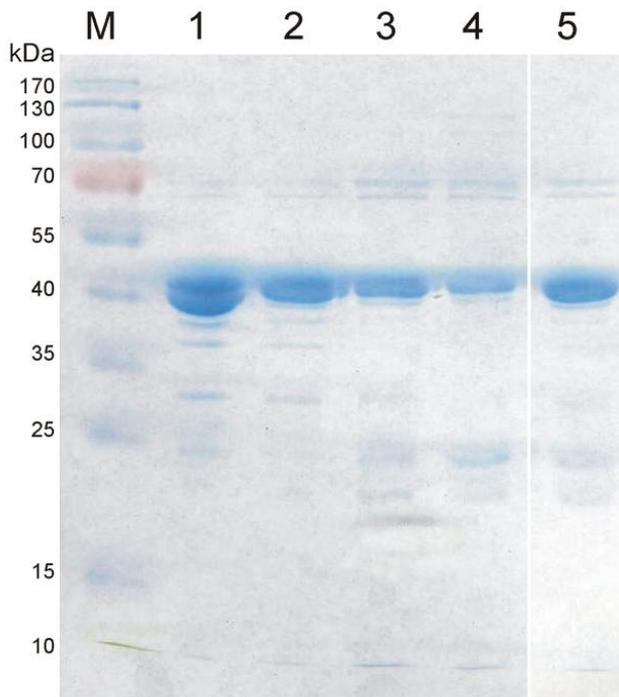


Abb. 17 SDS-Page der gereinigten *E. coli* Wildtyp TyrRS und der TyrRS Mutanten.

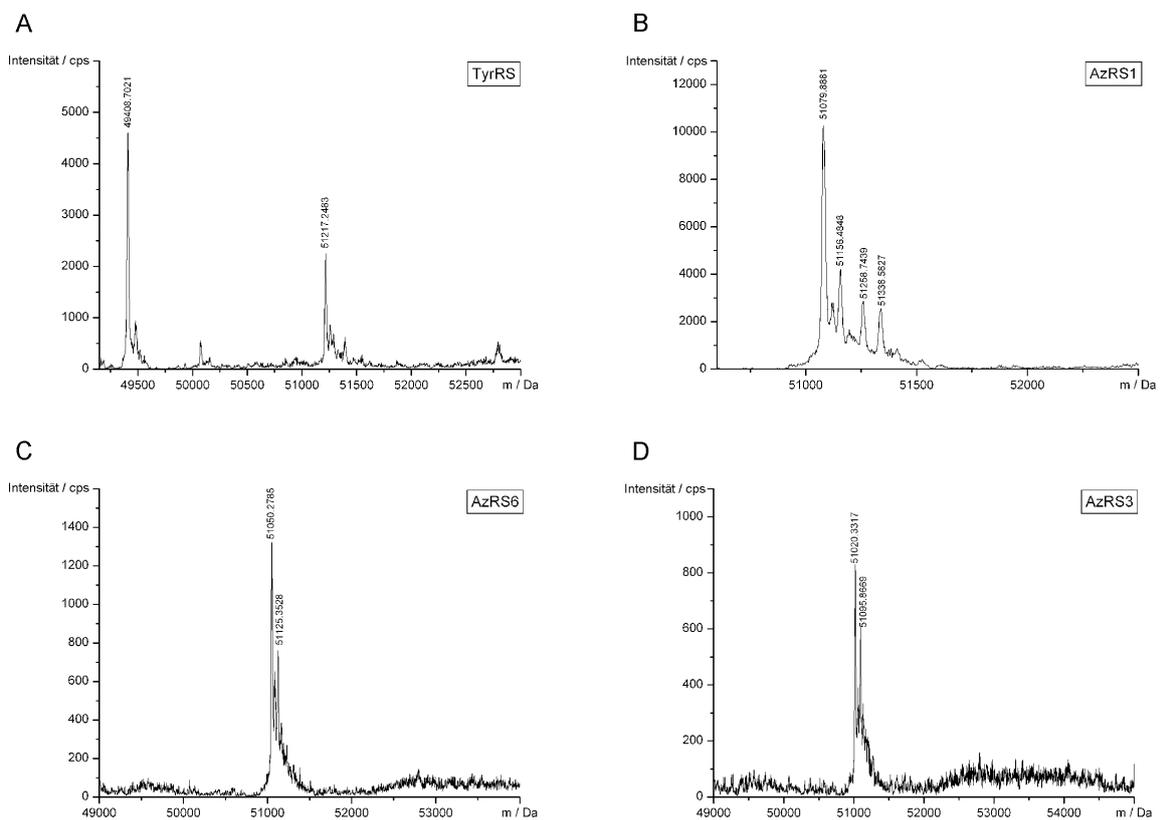
Die aaRSs wurden in *E. coli* exprimiert und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proteine wurden durch Ultrafiltration konzentriert und über SDS-PAGE analysiert. Das berechnete Molekulargewicht von TyrRS und ihren Mutanten beträgt 51 kDa. 1, TyrRS; 2, AzRS1; 3, AzRS6; 4, AzRS3; 5, BpaRS; M, Molekulargewichtsmarker. Das Gel wurde zwischen den Spuren 4 und 5 zugeschnitten, um irrelevante Spuren zu entfernen.

Alle aaRS wurden in guter Ausbeute und in einer Reinheit von über 95 % erhalten (Abb. 17). Diese Reinheit war für den ATP-PPi-Austausch-Assay vollkommen ausreichend, da geringe Mengen an Verunreinigungen mit unspezifischen Proteinen keinen negativen Einfluss auf den Assay haben. Lediglich die exakte Bestimmung der Konzentration an eingesetzter aaRS ist für eine spätere genaue Berechnung der Aktivität wichtig.

Tabelle 5: Massen Analyse von *E. coli* Wildtyp TyrRS und den aaRSs Mutanten

Alle Massen wurden ohne N-terminalens Met berechnet (entsprechend der N-terminalen Methioninabspaltung (NME) wurde Met abgespaltenen, weil sich an Position 2 ein Gly befindet^[129]). Für TyrRS wurde eine Variante gefunden, in der der N-Terminus an der Thrombin-Spaltstelle zwischen dem Hexahistidin-Tag und der TyrRS abgespaltenen war.

Protein	Berechnete Masse (Da)	Gefundene Masse (Da)	Δm (Da)
TyrRS	51216.509	51217.248	+0.739
TyrRS -N-Terminus (Thrombin geschnitten)	49408.616	49408.702	+0.086
AzRS1	51080.426	51079.888	-0.538
AzRS6	51050.333	51050.279	-0.055
AzRS3	51020.307	51020.332	+0.025
BpaRS	51086.389	51086.333	-0.056



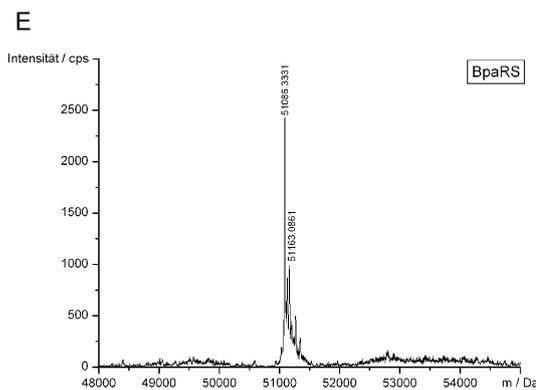


Abb. 18 ESI-MS-Spektren von E. coli Wildtyp TyrRS und den aaRS Mutanten, die in Abb. 17 und Tabelle 5 dargestellt sind. TyrRS (A); AzRS1 (B); AzRS6 (C); AzRS3 (D); BpaRS (E).

Auch die ESI-MS-Analyse bestätigte die hohe Reinheit der aaRS-Präparationen. Die gefundenen Massen stimmten hierbei sehr gut mit den zuvor berechneten überein (Tabelle 5). Alle aaRS wurden ohne das N-terminale Met gefunden. Dieses wurde abgespalten, weil sich in der Aminosäuresequenz an der 2. Position ein Gly befindet (entsprechend den Regeln der N-terminalen Methioninabspaltung (NME)^[129]). Für TyrRS wurde zusätzlich eine Variante gefunden, in der der N-Terminus an der Thrombin-Spaltstelle zwischen dem Hexahistidin-Tag und der codierenden Sequenz abgespalten war (Tabelle 5 und Abb. 18 A). Dies erklärt auch, warum auf dem SDS-Gel TyrRS als Doppelbande zu sehen ist (Abb. 17, Spur 1).

4.2.2 Charakterisierung der TyrRS Mutanten mit dem ATP-PPI-Austausch-Assay

In einem ersten Schritt wurde der optimale Konzentrationsbereich für die eingesetzte Aminosäure bestimmt. Um dies zu erreichen, wurden die nmol an radioaktivem ATP, die durch 1 μ M TyrRS während einer Reaktionszeit von 15 Minuten mit einer Reihe von verschiedenen Tyr-Konzentrationen gebildet wurden, gemessen (siehe Abb. 19).

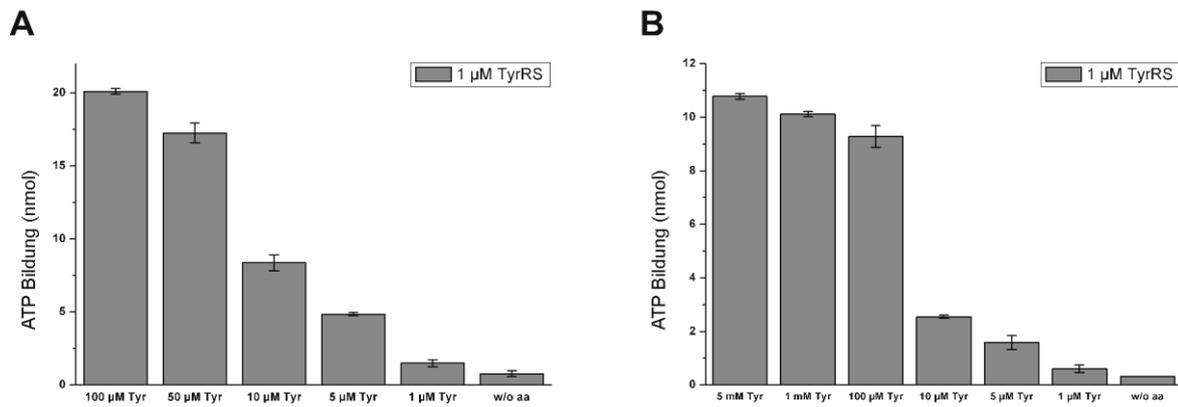


Abb. 19 ATP-PPi Aktivierungs Assay von TyrRS mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tyr.

Unterschiedliche Konzentrationen von Tyr wurden verwendet, um den Substrat Bereich für einen linearen Anstieg der Enzymaktivität **(A)** und für Substratsättigung **(B)** zu ermitteln. In der Negativ-Kontrolle wurde dem Reaktion Mix keine Aminosäure zugegeben (w/o aa). TyrRS wurde in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt. Die Daten in **(A)** und **(B)** wurden je in einer zusammenhängenden Reihe von Experimenten gesammelt und die ATP-Bildung mit jeder Tyrosin-Konzentration wurde jeweils in zweifacher Wiederholung bestimmt.

Hierbei wurde ein linearer Anstieg der ATP-Bildung und damit der Aminosäure-Aktivierung für Tyr-Konzentrationen zwischen 5 µM und 100 µM gefunden (Abb. 19 A). Tyr-Konzentrationen oberhalb von 100 µM führten zu einer Sättigung des Enzyms und zu keiner weiteren Erhöhung der ATP-Bildung (Abb. 19 B).

Als nächstes wurde untersucht, ob Tyr und die Analoga AzF und AmF von TyrRS und den Mutanten AzRS1, AzRS6, AzRS3 und BpaRS aktiviert werden (Abb. 20 und Abb. 21). Mit letzterem Enzym wurde zusätzlich ein Aktivierungs-Assay mit Bpa durchgeführt. Da anzunehmen war, dass die Tyr-Analoga schlechtere Substrate für ihre zugehörigen aaRSs sind als es Tyr für TyrRS ist, wurden die Aminosäuren im Überschuss, mit einer Endkonzentration von je 5 mM zugegeben. In den Tests wurden 1 µM TyrRS, 5 µM der AzRS Proteine und 3 µM BpaRS eingesetzt. Tyr und seine Analoga sind kaum wasserlöslich, weshalb die Substanzen in 0,01 M HCl gelöst wurden. Dementsprechend enthielt die negative Kontrolle keine Aminosäure, aber die entsprechende Menge an 0,01 M HCl (Abb. 20 und Abb. 21, w/o aa).

Die Aktivierung von PxF konnte nicht gemessen werden, da die Präparation mit 1 – 2 % Tyr verunreinigt war (dies entspricht einer Menge von Tyr, die im Bereich der K_m liegt). Das Massenspektrum der PxF-Präparation ist im Anhang in Abb. 35 gezeigt. PxF wurde hierbei wie in Chin, 2003^[62] beschrieben hergestellt.

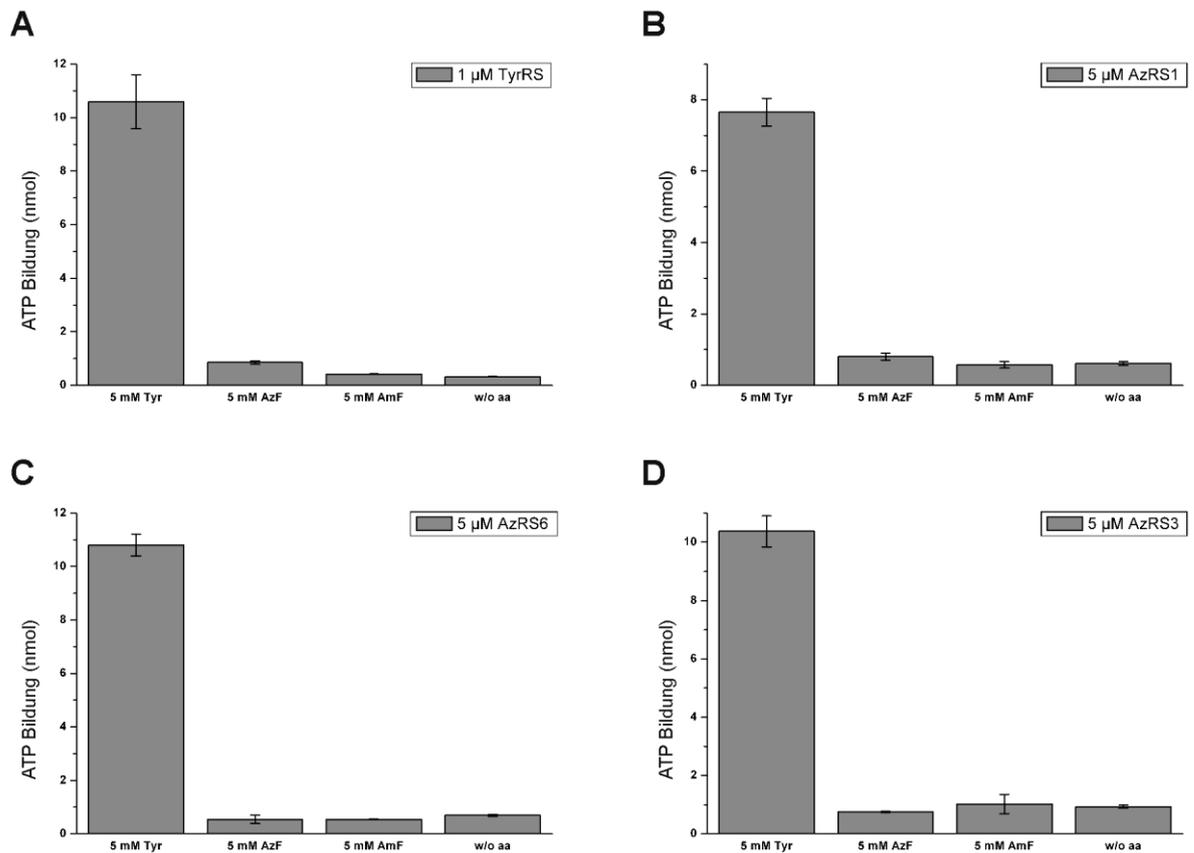


Abb. 20 Aktivierung von Tyr, AzF und AmF durch TyrRS und die AzRSs.

Tyr, AzF und AmF wurden in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. In der Negativ-Kontrolle wurde keine Aminosäure zugegeben (w/o aa). TyrRS (**A**) wurde zu 1 μM und AzRS1 (**B**), AzRS6 (**C**), und AzRS3 (**D**) in einer Konzentration von 5 μM verwendet. Die Daten für jede aaRS wurden in einer zusammenhängenden Serie von Experimenten gesammelt und jeder Wert wurde doppelt bestimmt.

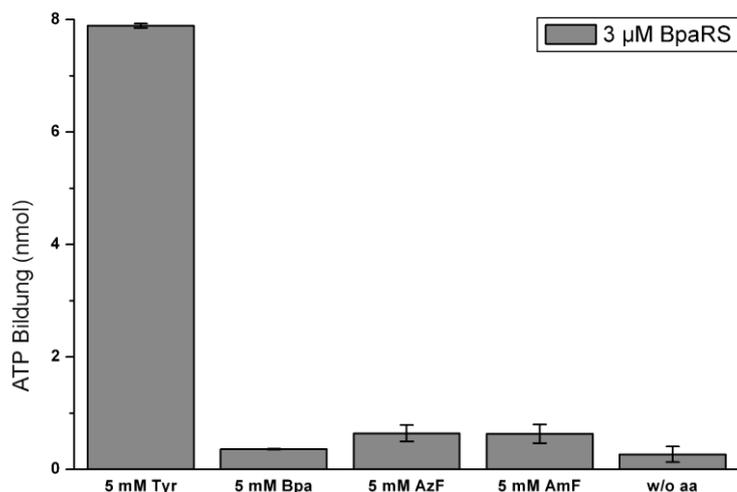


Abb. 21 Aktivierung von Tyr, Bpa, AzF und AmF durch BpaRS.

Tyr, Bpa, AzF und AmF wurden in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. In der Negativ-Kontrolle wurde die Aminosäure weggelassen (w/o aa). BpaRS wurde bei einer Konzentration von 3 μM zugegeben. Die Daten wurden alle in einer zusammenhängenden Serie von Experimenten gemessen und jeder Wert wurde doppelt bestimmt.

Wie erwartet wurde Tyr gut von TyrRS aktiviert (Abb. 20 A). Die Aktivierungsdaten sind in guter Übereinstimmung mit dem erfolgreichen Einbau von Tyr *in vivo* (Abb. 14 A und B, Spuren 1). TyrRS aktiviert weder AzF noch AmF (Abb. 20 A), was das Fehlen einer natürlichen Toleranz für diese Substrate bestätigt. Allerdings wurde keine Aktivierung sowohl von AzF als auch von AmF durch AzRS1, AzRS3 oder AzRS6 gefunden (Abb. 20 B-D). Im Gegenteil, alle AzRSs aktivierten Tyr (Abb. 20 B-D). Ebenso hat BpaRS nicht Bpa, aber Tyr aktiviert (Abb. 21). Die Inaktivität von AzF im ATP-PPi-Austausch-Assay mit den AzRSs deckt sich mit der Beobachtung, dass diese Analoga *in vivo* nicht in hSOD1(W33TAG) eingebaut wurden (Abb. 14). Im Gegensatz dazu wurden AmF (Abb. 14 A, Spuren 3 und 6; Abb. 14 B, Spuren 4-6) und Bpa (Abb. 14 C, Spur 1) *in vivo* eingebaut, obwohl sie *in vitro* nicht aktiviert wurden.

Die überraschendsten Ergebnisse in unseren ATP-PPi-Austausch-Assays waren, dass keine der TyrRS Mutanten irgendeine der erwarteten nicht-kanonischen Tyr-Analoga besser aktivierte als Tyr selbst (Abb. 20 und Abb. 21). Darüber hinaus aktivierten die TyrRS Mutanten die Tyr-Analoga sogar nur geringfügig über dem Hintergrundniveau oder die Aktivierung war überhaupt nicht messbar. Aufgrund dieses schlechten katalytischen Verhaltens der aaRSs war es auch nicht möglich K_m -Werte zu messen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die gerichtete Evolution und positive/negative Selektionszyklen^[62], die verwendet wurden um die TyrRS Mutanten zu entwickeln, die natürliche K_m eliminieren, aber nicht zur Entstehung einer besseren K_m für die Analoga führen. Auch war die „Evolution“ der Bindungstasche nicht effizient, da Tyr immer bevorzugt von allen TyrRS Mutanten aktiviert wurde.

Um auszuschließen, dass die hohe Konzentration (5 mM) der Tyr-Analoga eine Hemmung der aaRS Mutanten verursacht, wurde die Aktivierung von Tyr, AzF, und AmF auch im niedrigeren Konzentrationsbereich (500, 50, 5 und 1 μ M; Abb. 22 A-C) untersucht. Jedoch wurde Tyr wieder in einer konzentrationsabhängigen Weise aktiviert, während keine Aktivierung von AzF oder AmF zu erkennen war.

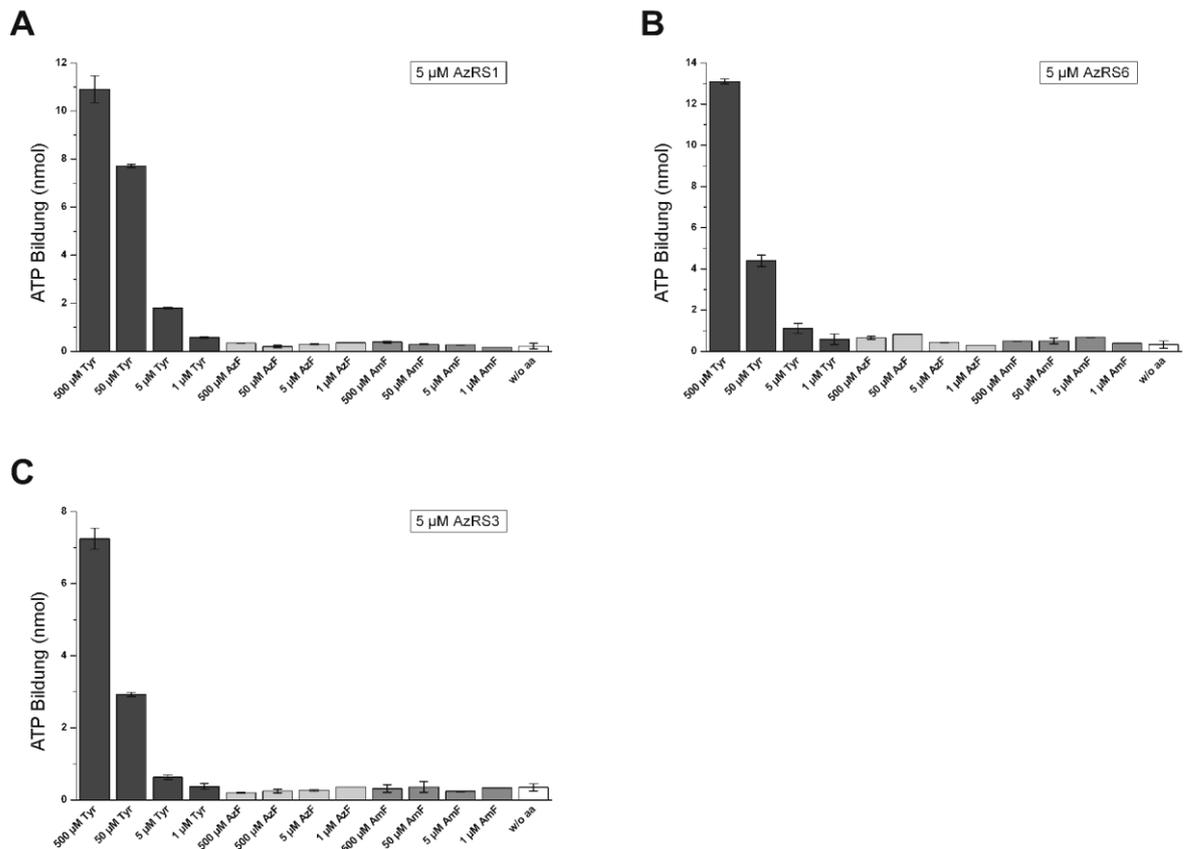


Abb. 22 Aktivierung von Tyr, AzF und AmF bei niedrigen Konzentrationen durch die AzRSs.

Um Auswirkungen von Substrathemmung im ATP-PPI Assay auszuschließen, wurden jeweils 5 µM AzRS1 (**A**), AzRS6 (**B**) und AzRS3 (**C**) mit Tyr, AzF und AmF bei Konzentrationen, die eine lineare Aktivierung von Tyr durch TyrRS verursachten (vergl. Abb. 19), inkubiert. In der Negativ-Kontrolle wurde keine Aminosäure zugegeben (w/o aa). Die Daten wurden alle in einer zusammenhängenden Reihe von Experimenten gemessen und jeder Wert wurde doppelt bestimmt.

Was bei den erhaltenen Ergebnissen die größte Frage aufwirft ist die Tatsache, dass Bpa und AmF in die hSOD1 eingebaut werden, obwohl ihre Aktivierung durch die entsprechenden TyrRS Mutanten nicht messbar war. Die intrazellulären Konzentrationen dieser Analoga sind nicht bekannt, aber eine Erklärung für den Einbau könnte sein, dass sie aufgrund der extrem hohen Analog-Konzentration im Medium in den Zellen akkumulieren, wo sie wahrscheinlich nicht metabolisch aktiv sind. Bei diesem großen Überschuss des Analogs in den Zellen könnte es sein, dass es durch die TyrRS Mutante aktiviert wird, auch wenn die Aktivierungsraten so extrem niedrig sind, dass sie nicht in dem ATP-PPI Assay gemessen werden können.

Unklar ist auch, warum Tyr *in vivo* nicht durch die TyrRS Mutanten eingebaut wird (Abb. 14 A, Spuren 2-6 und B, Spur 2), obwohl es im ATP-PPI Assay von den Mutanten in vergleichbarem Ausmaß wie durch wt-TyrRS aktiviert wird (Abb. 20

und Abb. 21). Möglicherweise wird die natürliche Spezifität für Tyrosin während der gerichteten Evolution zwar größtenteils eliminiert, ist aber immer noch ausreichend um Tyr in den Konzentrationen im Assay zu aktivieren. Die intrazelluläre Tyr-Konzentration dürfte weitaus niedriger sein, und damit vermutlich viel niedriger als die K_m (Michaeliskonstante; entspricht der Substratkonzentration, bei der die Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist) der mutierten Enzyme für Tyr. Dies könnte die Ursache für den fehlenden Einbau von Tyr durch die TyrRS Mutanten sein. Diese Annahme wird durch die Beobachtung bestätigt, dass Tyr auch von der Mutante AzRS3 in hSOD1W33TAG eingebaut werden konnte, wenn die kanonische Aminosäure in der vergleichsweise sehr hohen Konzentration von 1 mM zum Medium zugegeben wurde (Abb. 14 B, Spur 3).

Um die Fähigkeit einer aaRS, eine bestimmte Aminosäure auf die entsprechende tRNA laden zu können, zu untersuchen, müsste ein Beladungs-Assay mit radioaktiv markierten Tyr-Analoga durchgeführt werden. Diese sind allerdings nicht kommerziell verfügbar.

Um sicher zu stellen, dass die im ATP-PPi Assay ermittelten Daten das tatsächliche Verhalten der aaRS gegenüber den verschiedenen Substraten widerspiegeln, wurde eine alternative aaRS mit bekannter Substrattoleranz^[130] analysiert. Die *E. coli* PheRS Gly294Phe Mutante von D. A. Tirrell und Mitarbeitern^[130] wurde nur durch eine einzelne Punktmutation (Gly294 zu Phe) und nicht durch „gerichtete Evolution“ erzeugt und aktiviert eine große Anzahl an verschiedenen NCAAs wie in Abb. 23 dargestellt ist. Dies verdeutlicht, dass der verwendete Assay funktioniert und es durchaus mit überschaubarem Aufwand möglich ist, aaRSs mit veränderter Substratspezifität zu generieren.

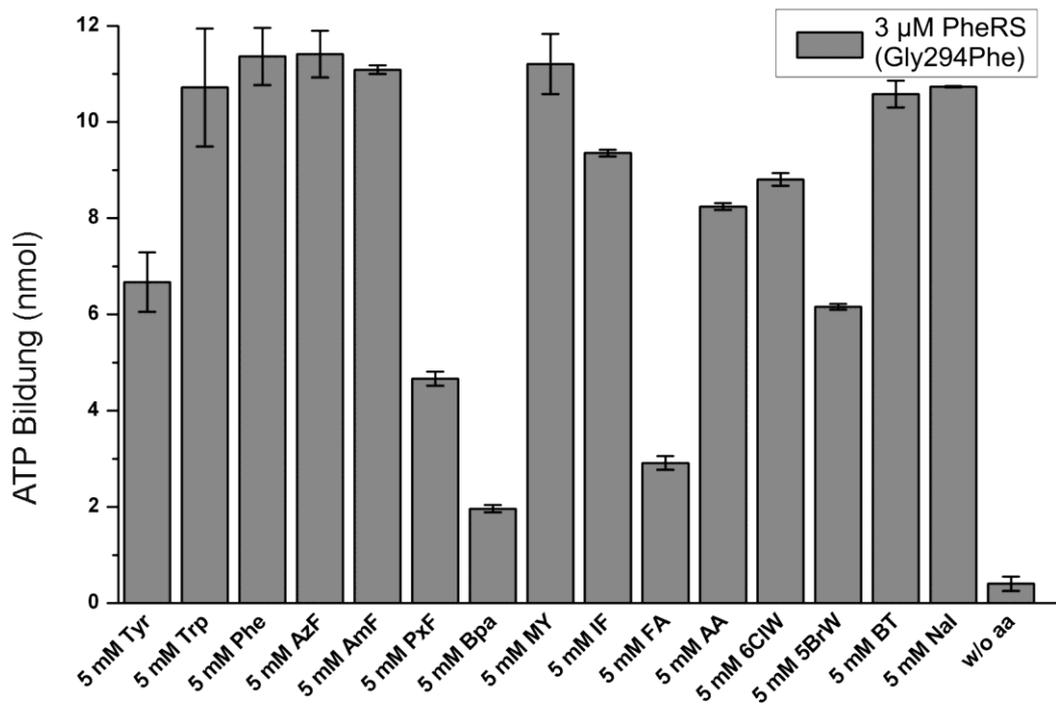


Abb. 23 Aktivierung von verschiedenen Aminosäuren und deren Analoga durch *E. coli* PheRS (Gly294Phe) ^[130].

Die Negativ-Kontrolle enthielt keine Aminosäure (w/o aa). PheRS (Gly294Phe) wurde mit einer Konzentration von 3 μ M und die Aminosäureanaloga mit 5 mM zugegeben. Jeder Wert wurde doppelt bestimmt. Neben den bereits definierten Aminosäuren wurden hier noch folgende Analoga verwendet: MY (O-Methyl-L-tyrosin), IF (*p*-Iodo-L-phenylalanin), FA (L-(2-Furyl)-alanin), AA (Azulenyl-L-alanin), 6ClW (6-Chloro-DL-tryptophan), 5BrW (5-Bromo-DL-tryptophan), BT (Benzothieryl-L-alanin), NaI (Naphtyl-L-alanin).

4.3 Lipase-Kongenere

Für den proteinweiten Austausch aller Phenylalanine, Proline und Tyrosine gegen entsprechende fluorierte oder hydroxylierte nicht-kanonische Aminosäureanaloge wurde die Lipase aus dem thermophilen, anaeroben Bakterium *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (TTL)^[131] gewählt (siehe Anhang, Abb. 36 für Proteinsequenz). Das Enzym zeichnet sich durch eine gute Expression in *E. coli*, eine hohe Thermostabilität und eine hohe Substrattoleranz aus. Darüber hinaus ist es relativ unempfindlich gegenüber diversen organischen Lösungsmitteln, Metallionen und Detergenzien, was die Lipase zu einem interessanten Enzym für die industrielle Biotechnologie macht.^[90, 131, 132] Gerade deshalb ist es ein attraktives Ziel, um die Auswirkungen von Fluorierungen oder Hydroxylierungen verschiedener Aminosäuren auf die Enzymaktivität und -stabilität zu untersuchen.

Für die Herstellung der Lipase-Kongenere wurden die synthetischen Prolinanaloga *trans*-4-Hydroxyprolin (tHP) und *cis*-4-Hydroxyprolin (cHP) verwendet. Des Weiteren wurden die fluorierten Analoga *meta*-Fluorphenylalanin (mFF), *para*-Fluorphenylalanin (pFF), *trans*-4-Fluorprolin (tFP), *cis*-4-Fluorprolin (cFP), *meta*-Fluortyrosin (mFY), und *ortho*-Fluortyrosin (oFY) gewählt, da frühere Berichte darauf hindeuten, dass die Fluorierung stabilisierende Effekte auf Proteine hat.^[82, 133, 134] Alle genannten Analoga sowie die entsprechenden kanonischen Aminosäuren werden in Abb. 24 gezeigt.

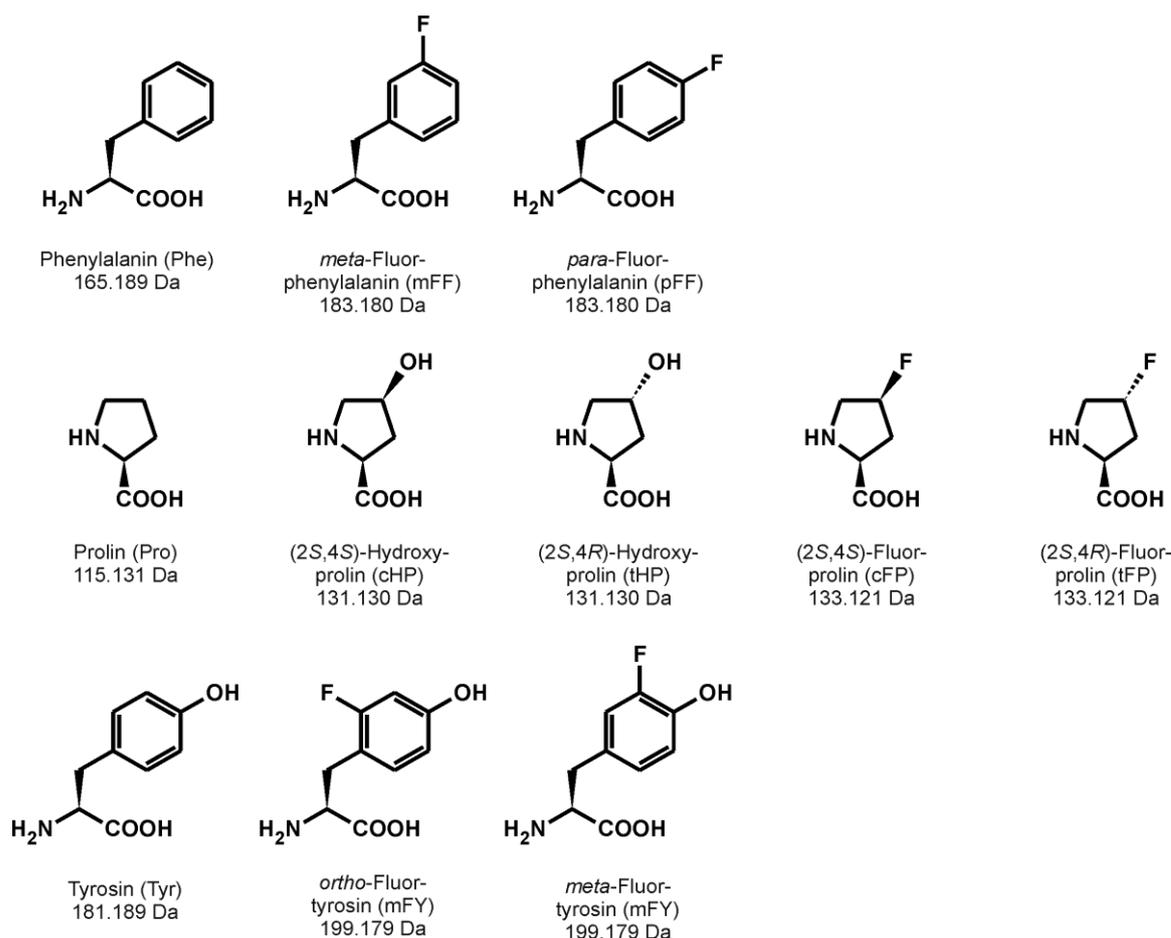


Abb. 24 Strukturen und Molekulargewichte der verwendeten Analoga von Phenylalanin, Prolin und Tyrosin, sowie der entsprechenden kanonischen Aminosäuren.

4.3.1 Dreidimensionales Modell der *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* Lipase (TTL)

Da eine hochauflösende Proteinstruktur der TTL nicht verfügbar ist, wurde ein *homology modeling* durchgeführt (Martin Turk, unveröffentlichte Daten), um einen grundlegenden Einblick in den dreidimensionalen molekularen Aufbau der TTL zu gewinnen (siehe 3.4). Dies sollte Informationen über die strukturelle Verteilung der zu substituierenden Aminosäuren in der Lipase verschaffen. Dazu wurde die primäre Aminosäuresequenz der TTL mit bekannten 3D-Strukturen aus anderen Lipasen, Esterasen und Serin-Proteasen aus der gesamten PDB-Datenbank^[135] mit Hilfe der Software HHpred^[110] verglichen. Trotz deutlichen Unterschieden in der Primärsequenz von mehreren Lipasen, zeigte das Homologie-Modell eine typische Lipase 3D-Struktur. D. h. eine kanonische α/β Hydrolase-Faltung^[98] und eine katalytische Triade, bestehend aus einem Nukleophil (Ser113), einem streng konservierten Histidin (His233) und einer

sauren Aminosäure (Asp203) (vergl. 1.4.2). Neben dem aktiven Zentrum liefert das Modell auch grobe räumliche Informationen über die *lid*-Domäne (Deckel), die die Spalte in der das aktive Zentrum des Enzyms liegt, bedeckt (vergl. Abb. 8 und Abb. 25).

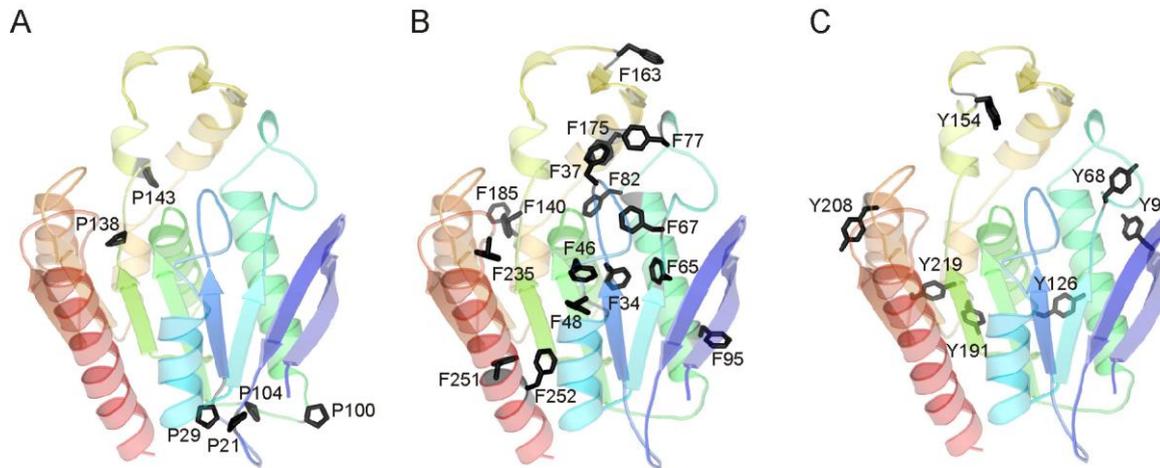


Abb. 25 Homologie-Modell der TTL mit hervorgehobenen Seitenketten der zu substituierenden Aminosäuren.

Die 3D-Struktur der Lipase aus *T. thermohydrosulfuricus* (TTL) wurde durch „homology modeling“ (siehe 3.4 für Details) von Martin Turk generiert. Die Seitenketten von Prolin (A), Phenylalanin (B), und Tyrosin (C) sind in den jeweiligen Abbildungen hervorgehoben, um ihre Lage zu verdeutlichen. Sie sollten global gegen ihre entsprechenden Analoga (siehe Abb. 24) ausgetauscht werden. Die Seitenketten Pro143, Tyr154, Phe163 und Phe175 gehören der *lid*-Domäne der TTL an.

Ein auffälliges Merkmal, das in vielen Lipasen gefunden wurde, ist das Phänomen der Grenzflächenaktivierung, d. h. einem starken Anstieg der Aktivität in Gegenwart von Lipid-Aggregaten.^[96] Darüber hinaus zeigen einige Lipasen eine Eigenschaft, die als thermische Aktivierung bekannt ist (vergl. 1.4.2). Sowohl nach Grenzflächen-, als auch nach thermischer Aktivierung findet Katalyse statt. Auf struktureller Ebene betrachtet, beginnt dieser Prozess mit einer Bewegung (Öffnen) der helikalen *lid*-Domäne, die die Substrat-Bindungsstelle in Abwesenheit von Substrat-Aggregaten bedeckt.^[100] In der strukturell gut untersuchten Lipase aus *Candida rugosa*,^[136] umfasst die Umlagerung zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation eine *cis/trans*-Prolyl-Isomerisierung.^[137] Dies deutet darauf hin, dass die Prolin (Pro) Reste eine entscheidende Rolle beim Öffnen und Schließen des Deckels spielen könnten. Da Pro Reste generell die Proteinfaltung und -stabilität durch *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidbindungen beeinflussen, kann diese Eigenschaft chemisch, durch die richtige Wahl des Ring-Substituenten, wie z. B. C-Fluorierung oder Hydroxylierung, manipuliert werden.^[138] Abb. 25, A zeigt die

6 Pro Reste in der TTL, die durch entsprechende synthetische Analoga ersetzt werden sollen.

Die Substrat-Bindungsstelle von vielen bakteriellen, Hefe- und Säugetier-Lipasen ist eine hydrophobe Bindungstasche, die eine "hydrolytische-" und eine „Oxyanion“-Stelle enthält.^[95] Die Form und die Aminosäurezusammensetzung der Bindungstasche ist abhängig von der Kettenlänge der Fettsäure des entsprechenden Substrates.^[139] Da die Wände der Bindungstasche größtenteils mit hydrophoben und aromatischen Seitenketten ausgekleidet sind,^[140] wird angenommen, dass die Inkorporation von sperrigen, aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin (Phe) oder Tyrosin (Tyr) an verschiedenen Positionen innerhalb der Tasche zu einer Beschränkung der Substratspezifität gegenüber Fettsäuren führt.^[141, 142] Phe-Reste gehören in der TTL zu den am häufigsten vorkommenden (16 Positionen; 6,18 %) und sind ungleich in der Struktur verteilt, wobei die Mehrheit von ihnen erwartungsgemäß im hydrophoben Inneren des Proteins gebündelt ist (siehe Abb. 25, B). Auf der anderen Seite enthält TTL 7 Tyr-Reste, die gleichmäßig über das ganze Enzym verteilt sind und zwar verdeckt im hydrophoben Kern, exponiert an der Oberfläche in der Bindungstasche und in der α -Helix der *lid*-Domäne (Abb. 25, C). Deshalb sollte analysiert werden, inwieweit die Fluorierung von Tyr- und Phe-Resten der TTL geeignet ist, die Aktivitätsprofile, optimale Temperatur (T_{opt}), optimalen pH (pH_{opt}) und Substrat Toleranz der Lipase zu beeinflussen.

4.3.2 Klonierung der TTL, Expression und Aufreinigung

Die DNA-Sequenz der *T. thermohydrosulfuricus* Lipase (TTL)^[131] wurde mittels PCR und den Primern TTLpf und TTLpr amplifiziert (siehe Tabelle 1). TTLpf und TTLpr enthalten eine *EcoRI* bzw. eine *PstI* Schnittstelle an ihrem 5'-Ende, ergänzt durch zusätzliche Nukleotide für ein effizientes Schneiden der Restriktionsenzyme. Der Primer TTLpr war so konstruiert, dass ein Hexahistidin-Tag zusammen mit einem kurzen Gly-Ser-Spacer an das C-terminale Ende der TTL fusioniert wurde. Das PCR Fragment wurde mit *EcoRI* and *PstI* verdaut, mittels PCR Purification Kit gereinigt und in den, mit den gleichen Enzymen geschnittenen, pQE80L Vektor kloniert. Das erhaltene Expressionsplasmid pQE80L-TTL-H6 wurde anschließend durch Sequenzierung verifiziert.

Die Herstellung der Lipase-Kongenere erfolgte durch SPI der Aminosäureanaloga unter Verwendung jeweils geeigneter auxotropher, mit dem pQE80L-TTL-H6

Plasmid transformierter *E. coli* Expressionsstämme (siehe 2.3), wie unter 3.2.4.3 beschrieben. Hierbei wurde zuerst das Wachstum der Kulturen unter nicht-induzierenden Bedingungen mit einer limitierenden Konzentration der auszutauschenden kanonischen Aminosäure ermöglicht. Nachdem diese aufgebraucht war, was an einer Stagnation des Zellwachstums zu erkennen war, wurden die Zellen mit dem nicht-kanonischen Analog supplementiert und die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert.

Anschließend wurden die einzelnen Lipasen durch Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt (siehe 3.3.1.2 für Details) und ihre Reinheit mittels SDS-Page sowie ESI-MS analysiert (siehe Abb. 26 bzw. Abb. 27).

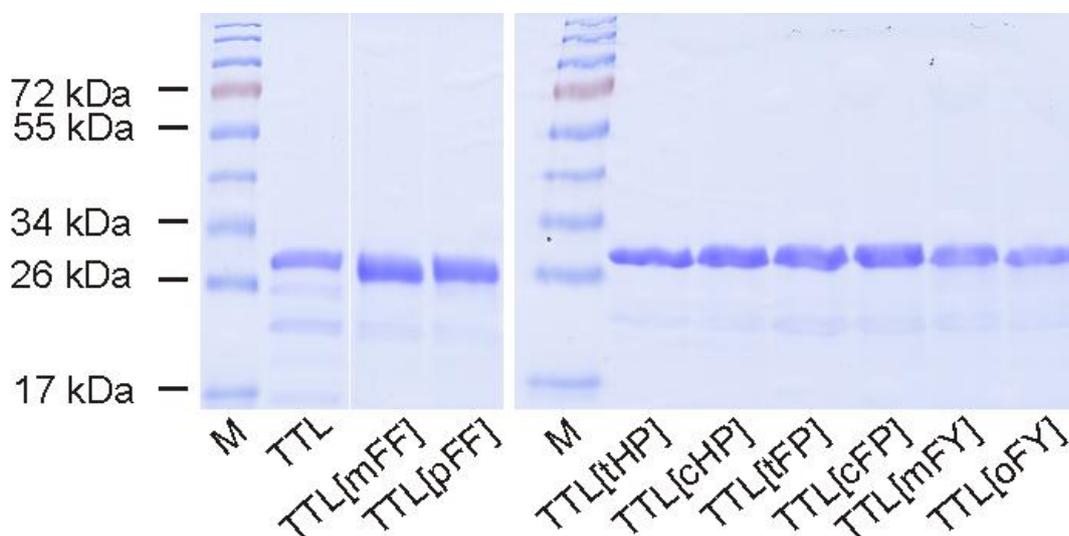


Abb. 26 Gereinigte TTL-Kongenerne, 12 % SDS-Page.

Alle Lipase-Kongenerne konnten in einer Reinheit von bis zu ca. 95 % hergestellt werden. Es wurden jeweils 3 µg Protein auf das Gel geladen. Bei dem linken Gel wurden zwischen der zweiten Spur (TTL) und der dritten (TTL[mFF]) hier nicht relevante Spuren ausgeschnitten.

Das berechnete Molekulargewicht der TTL beträgt 30,1 kDa. Die TTL-Kongenerne unterscheiden sich in ihren Molekulargewichten um weniger als 300 Da von der TTL, eine Differenz die auf einem 12%igen SDS-Gel nicht aufgelöst werden kann. Dementsprechend zeigen alle Kongenerne in Abb. 26 eine ähnliche Laufweite, die ca. 30 kDa entspricht. Außerdem ist in Abb. 26 erkennbar, dass alle Proteine in einer Reinheit von über 95 % hergestellt wurden. Bei der Bande, die etwas unterhalb der TTL-Bande schwach erkennbar ist, handelt es höchstwahrscheinlich um das durch proteolytischen Abbau entstandene TTL-Fragment von Aminosäure 81 bis 267, das zusammen mit dem Vollängenprotein aufgereinigt wurde. Dies geht aus der Massenanalyse der TTL hervor, in der das Fragment als deutlicher Peak bei 21183 Da zu erkennen ist (siehe Anhang, Abb. 37). Diese Masse stimmt

mit dem berechneten Molekulargewicht des Fragmentes überein. Die erhaltenen Proteinausbeuten waren in der Gegenwart der Prolinanaloga gleich oder leicht höher als die der TTL (20 mg/l Kultur). Die Verwendung der Phenylalaninanaloga war im Hinblick auf die Ausbeute noch effizienter (50-60 mg/l Kultur), während TTL[mFY] und TTL[oFY] nur in niedrigeren Mengen (7 mg/l Kultur) produziert werden konnten. Die Ausbeuten im Einzelnen sind in nachfolgender Tabelle 6 aufgelistet:

Tabelle 6: Ausbeute der Lipase Varianten

Lipase Variante	TTL	TTL [mFF]	TTL [pFF]	TTL [tHP]	TTL [cHP]	TTL [tFP]	TTL [cFP]	TTL [mFY]	TTL [oFY]
Ausbeute in mg/l Kultur	20	50	67	20	20	29	23	13	7

4.3.3 Einbaueffizienz der nicht-kanonischen Aminosäureanaloga

Die massenspektrometrische Analyse mittels ESI-MS der TTL-Kongenerere zeigte jeweils eine sehr gute Einbaueffizienz der Analoga cFP, mFY, oFY aber nur teilweise modifizierte Proteine wenn mFF, pFF, tHP, cHP, oder tFP verwendet wurden. Aufgrund der statistischen Natur der verwendeten Einbaumethode wurde eine hohe oder niedrige „Totale Einbaueffizienz“ (TEE) basierend auf den erhaltenen massenspektrometrischen Profilen definiert. Hohe TEE wurde erzielt, wenn der Anteil des Kongeners, bei dem alle Reste substituiert waren, in einer Probe über 50 % betrug. Dementsprechend war eine niedrige TEE gegeben, wenn die Menge des vollständig substituierten Kongeneres in der Probe unter 50 % lag (vergleiche Tabelle 7). Diese Werte wurden durch Bestimmung der Intensitäten der Peaks aus Abb. 27 berechnet.

Tabelle 7: Totale Einbau Effizienz (TEE) und Anzahl der maximal ausgetauschten Aminosäure (AS) Reste

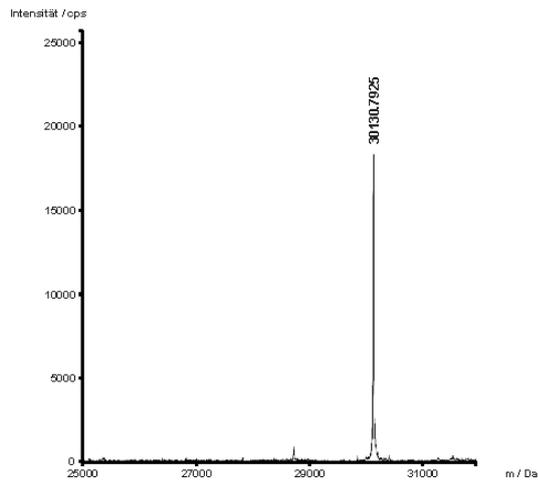
Insgesamt enthält die TTL 16 Phe-, 6 Pro- und 7 Tyr-Reste.

Lipase Variante	TTL	TTL [mFF]	TTL [pFF]	TTL [tHP]	TTL [cHP]	TTL [tFP]	TTL [cFP]	TTL [mFY]	TTL [oFY]
TEE	-	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig	hoch	hoch	hoch
ausgetauschte AS Reste	-	16	15	6	6	6	6	7	7

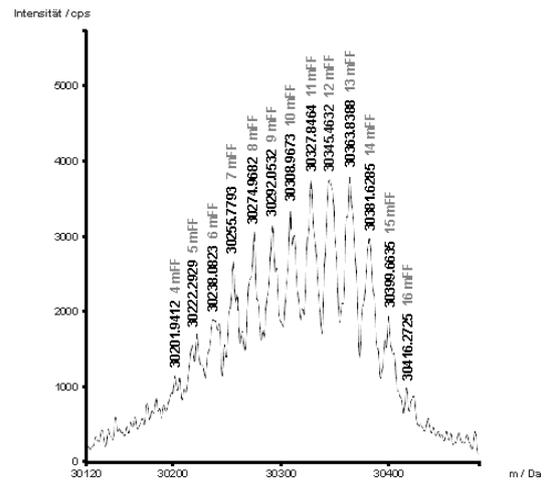
Diese Einteilung war notwendig, da durch die massenspektrometrischen Messungen festgestellt wurde, dass heterogene Proteinproben erhalten wurden.

Leider war es nicht möglich, die partiell modifizierten Proteinspezies durch die mit dem Massenspektrometer gekoppelte Reversed-Phase HPLC präparativ abzutrennen. Dennoch sollte kein Zweifel daran bestehen, dass die Substitutionen in der TTL die Hauptursache für die Unterschiede in den Aktivitätsprofilen der Kongenere sind, die bei einem Vergleich mit der kanonischen TTL beobachtet werden konnten (siehe dazu weiter unten).

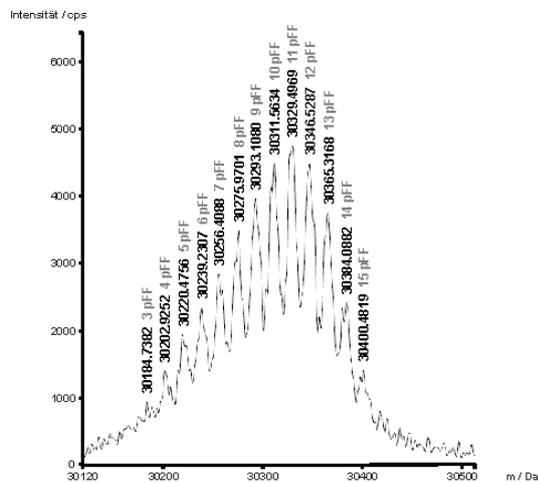
A)



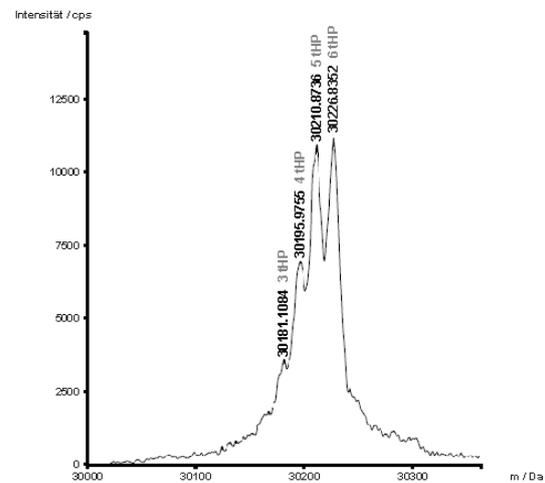
B)



C)



D)



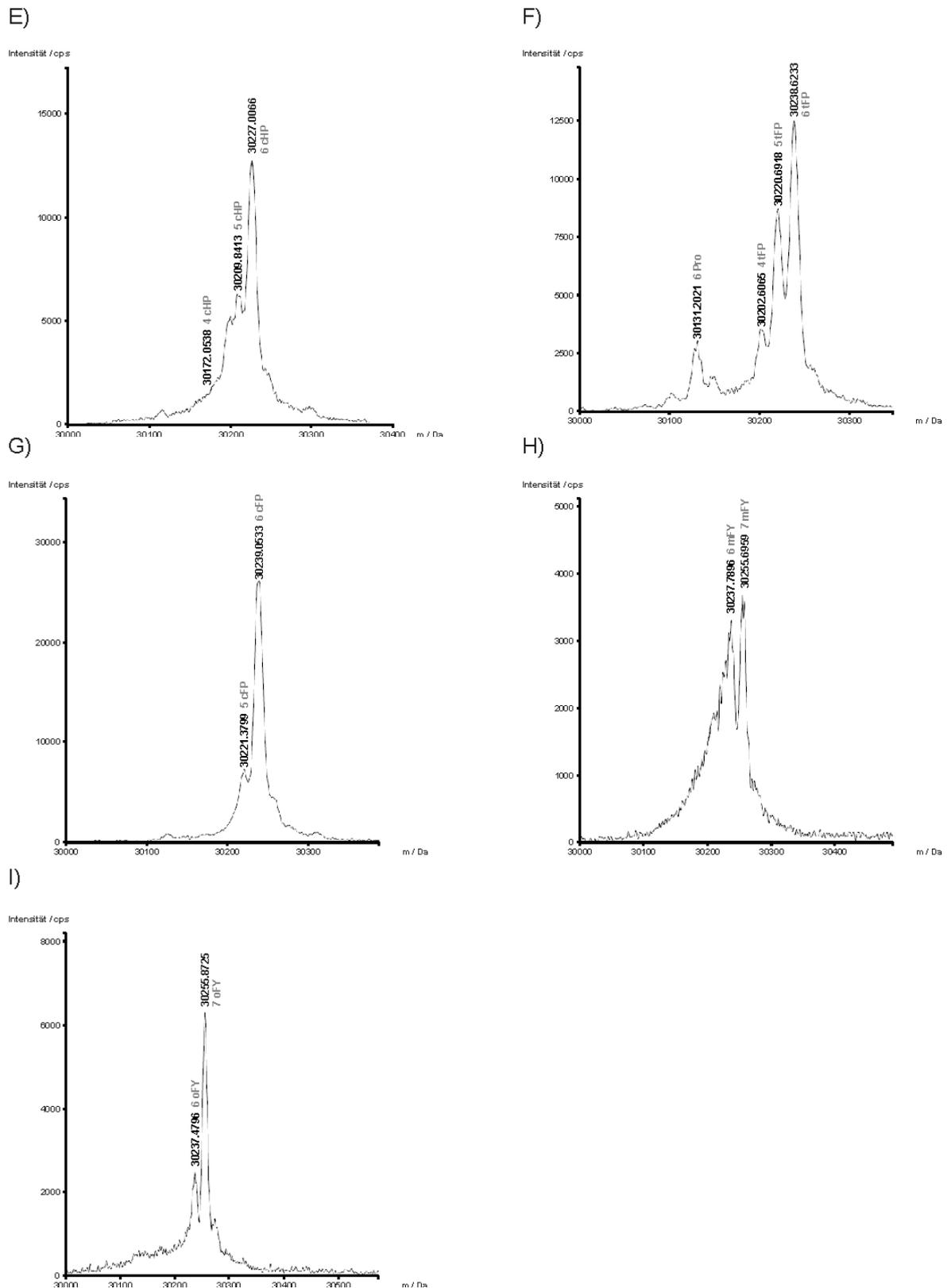


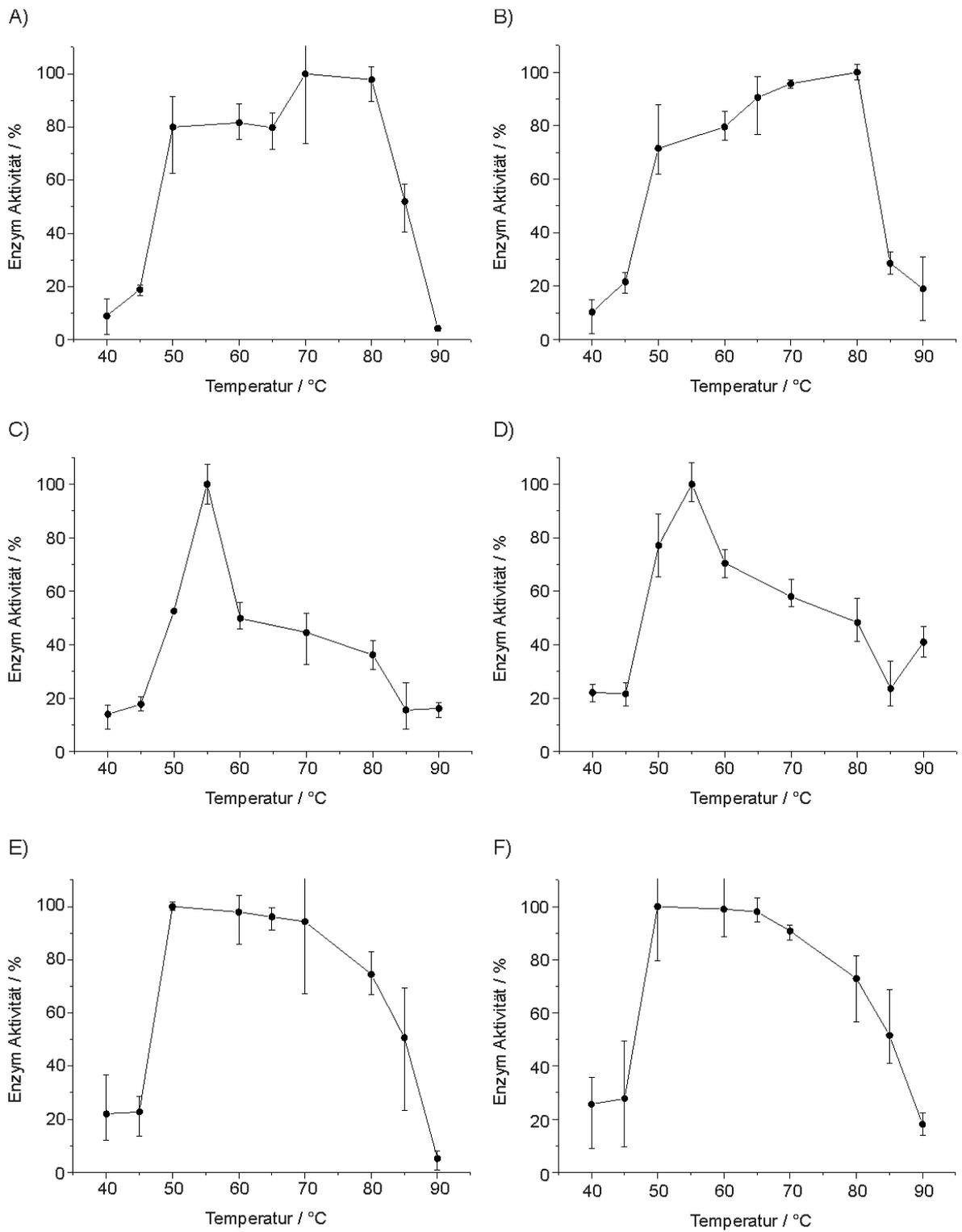
Abb. 27 ESI-MS-Analyse der Lipase-Kongenerne.

Die berechneten Molekulargewichte der vollständig modifizierten Kongenerne sind in Klammern hinter den Namen angegeben. **(A)** TTL (30130.24 Da); **(B)** TTL[mFF] (30418.24 Da); **(C)** TTL[pFF] (30418.24 Da); **(D)** TTL[tHP] (30226.24 Da); **(E)** TTL[cHP] (30226.24 Da); **(F)** TTL[tFP] (30238.24 Da); **(G)** TTL[cFP] (30238.24 Da); **(H)** TTL[mFY] (30256.24 Da); **(I)** TTL[oFY] (30256.24 Da).

In den Präparationen der Kongenere konnten keine Spuren der unmodifizierten TTL gefunden werden (siehe Abb. 27). Die einzige Ausnahme bildet hierbei TTL[tFP], bei der bis zu 11 % unmodifizierte TTL vorhanden war (Abb. 27, F). Dieser Umstand rührt höchstwahrscheinlich von der unterschiedlichen Aufnahme und metabolischen Umsetzung der Analoga durch die auxotrophen Bakterienstämme her. Für TTL[mFF] und TTL[pFF] ergab sich ein stochastisches Einbaumuster, wobei hier die Varianten, bei denen 11 bis 13 von 16 Phenylalaninen ausgetauscht waren, vorherrschten (Abb. 27, B und C). Bei den übrigen Kongeneren waren jeweils die Varianten, bei denen alle 6 Proline (Abb. 27, D – G) bzw. alle 7 Tyrosine (Abb. 27, H und I) substituiert wurden, am stärksten vertreten.

4.3.4 Optimale Temperatur und optimaler pH-Wert

TTL ist eine thermoaktive Lipase, deren höchste Aktivität bei einer Temperatur (T_{opt}) von ~ 70 °C und einem optimalen pH-Wert (pH_{opt}) von 8,0 liegt.^[131] Um festzustellen, ob der Einbau der Aminosäureanaloga einen Einfluss auf T_{opt} und pH_{opt} hat, wurde die Lipase-Aktivität der Kongenere zwischen 40 und 90 °C und zwischen pH 3 – 11 bestimmt. In den folgenden Diagrammen (Abb. 28) ist die Lipase-Aktivität der einzelnen Kongenere in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt. Hierfür wurde der Lipase-Assay mit pNPP als Substrat verwendet (vergl. 3.3.3.2.1).



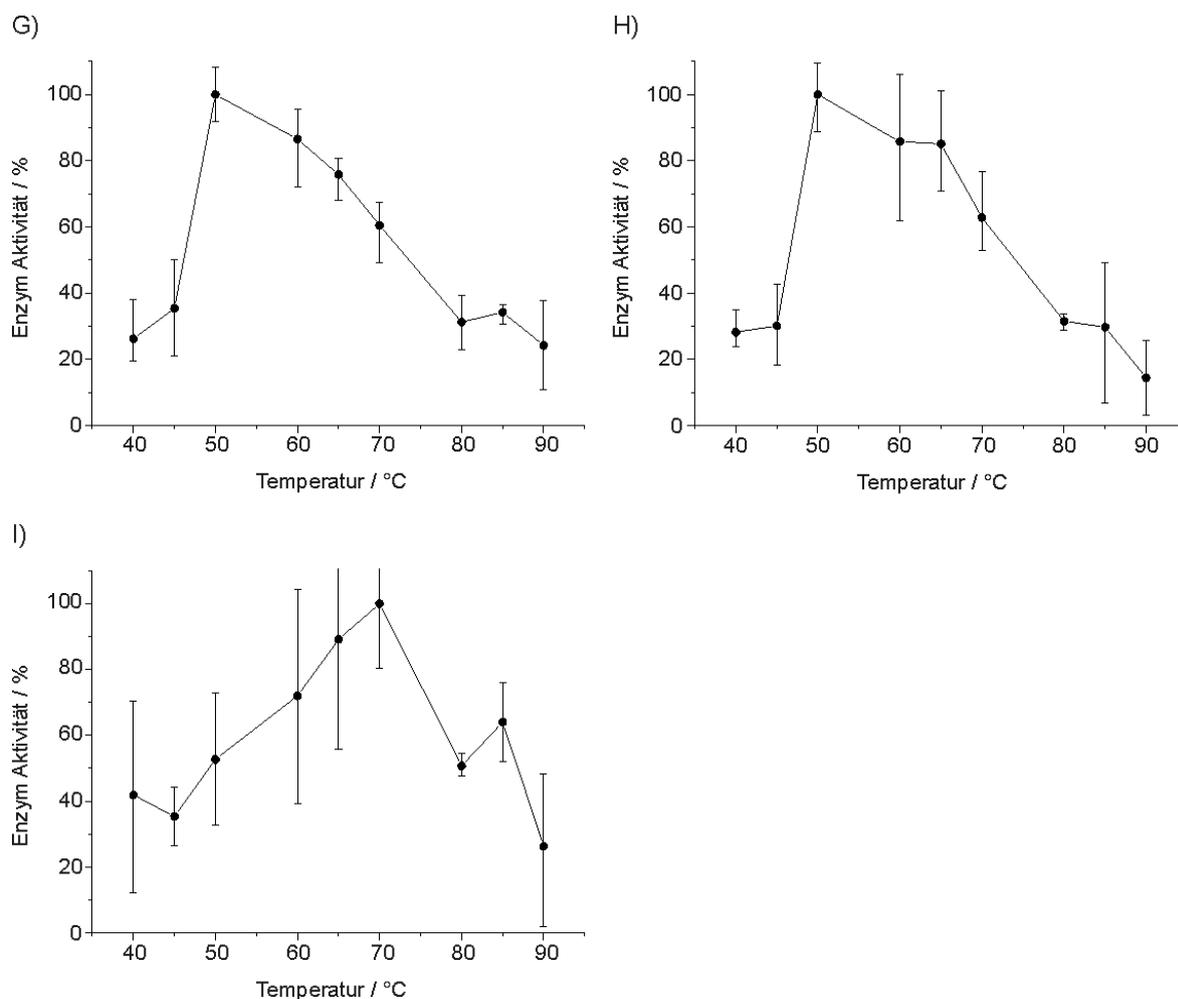


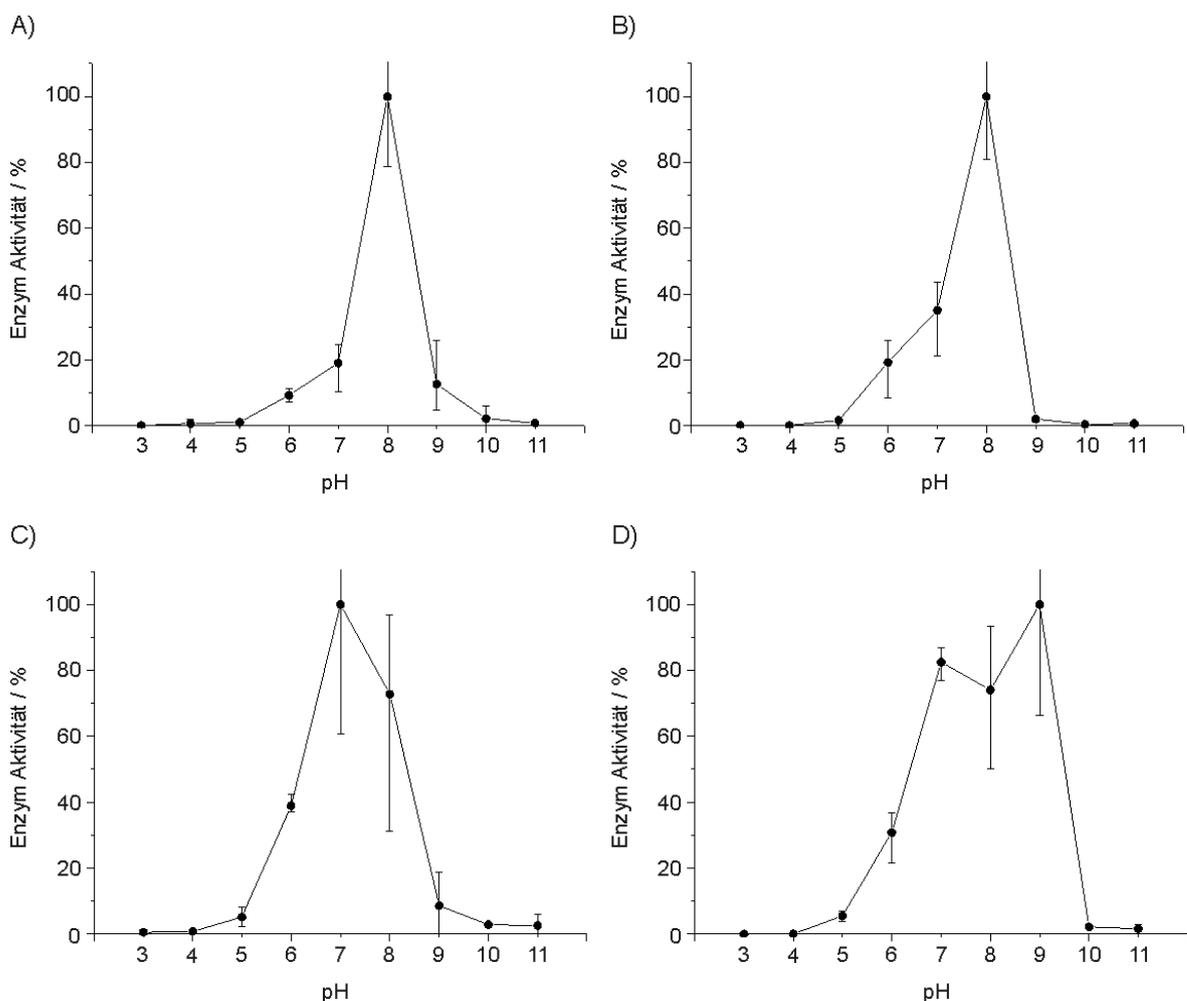
Abb. 28 Einfluss der Temperatur auf die enzymatische Aktivität der verschiedenen TTL-Kongenerere.

Die optimale Temperatur (T_{opt}) ist jeweils in Klammern angegeben. (A) TTL (70 °C); (B) TTL[mFF] (70 °C); (C) TTL[pFF] (55 °C); (D) TTL[tHP] (55 °C); (E) TTL[cHP] (50 °C); (F) TTL[tFP] (50 °C); (G) TTL[cFP] (50 °C) (H) TTL[mFY] (50 °C); (I) TTL[oFY] (70 °C). Die Fehlerbalken geben jeweils den maximalen und minimalen gemessenen Wert an.

Alle Enzyme waren in einem Bereich zwischen 40 und 90 °C aktiv, aber ihre Aktivität und Temperaturprofile unterschieden sich klar voneinander (Abb. 28). Keine der TTL-Kongenerere zeigte eine höhere T_{opt} als die kanonische TTL, aber die Kongenerere, die eine hohe Aktivität zeigten (TTL[mFF] und TTL[oFY], siehe dazu Abb. 31 weiter unten), behielten die T_{opt} der TTL von 70 °C bei (Abb. 28, B und I). Umgekehrt zeigten alle anderen Lipasen eine beträchtliche Senkung der T_{opt} in einem Bereich von 5 bis 20 °C, wobei TTL[pFF] und TTL[mFY] (Abb. 28, C und H) mit einer T_{opt} von je ca. 50 °C die auffälligsten Kongenerere waren. Interessanterweise zeigten regioisomere Analoga, deren Substituenten sich nur in der Ring-Position unterscheiden, ganz entgegengesetzte Wirkungen auf die optimale Temperatur. Zum Beispiel hatten TTL[pFF] und TTL[mFY] eine T_{opt} von etwa 50 °C, während die T_{opt} von TTL[mFF] und TTL[oFY] jeweils 70 °C betrug

(Abb. 28, C und H bzw. B und I). Auch wenn die einzelnen Werte an manchen Messpunkten zum Teil großen Schwankungen unterlagen, was durch die technischen Gegebenheiten des Lipase-Assays mit *p*NPP bedingt ist, ist die Tendenz des Kurvenverlaufes doch eindeutig erkennbar.

Nachdem die optimalen Temperaturen aller Lipase-Kongeneren bekannt waren, konnten die pH-Werte ermittelt werden, bei denen sie die höchste Aktivität zeigen. Dazu wurden sie bei ihrer T_{opt} und bei verschiedenen pH-Werten in einem Bereich von pH 3 – 11 inkubiert und mit Hilfe des Tricaprylin-Assays (vergl. 3.3.3.2.5) auf ihre Lipase-Aktivität untersucht. Die Verwendung des Standard-Lipase-Assays mit *p*NPP als Substrat war hier nicht möglich, da er nur im Bereich von pH 6 – 9 zuverlässige Daten liefert. Bei stark basischen Bedingungen autohydrolysiert *p*NPP und die Absorption des Reaktionsprodukts *p*-Nitrophenol ist unter sauren Bedingungen nicht messbar.^[109]



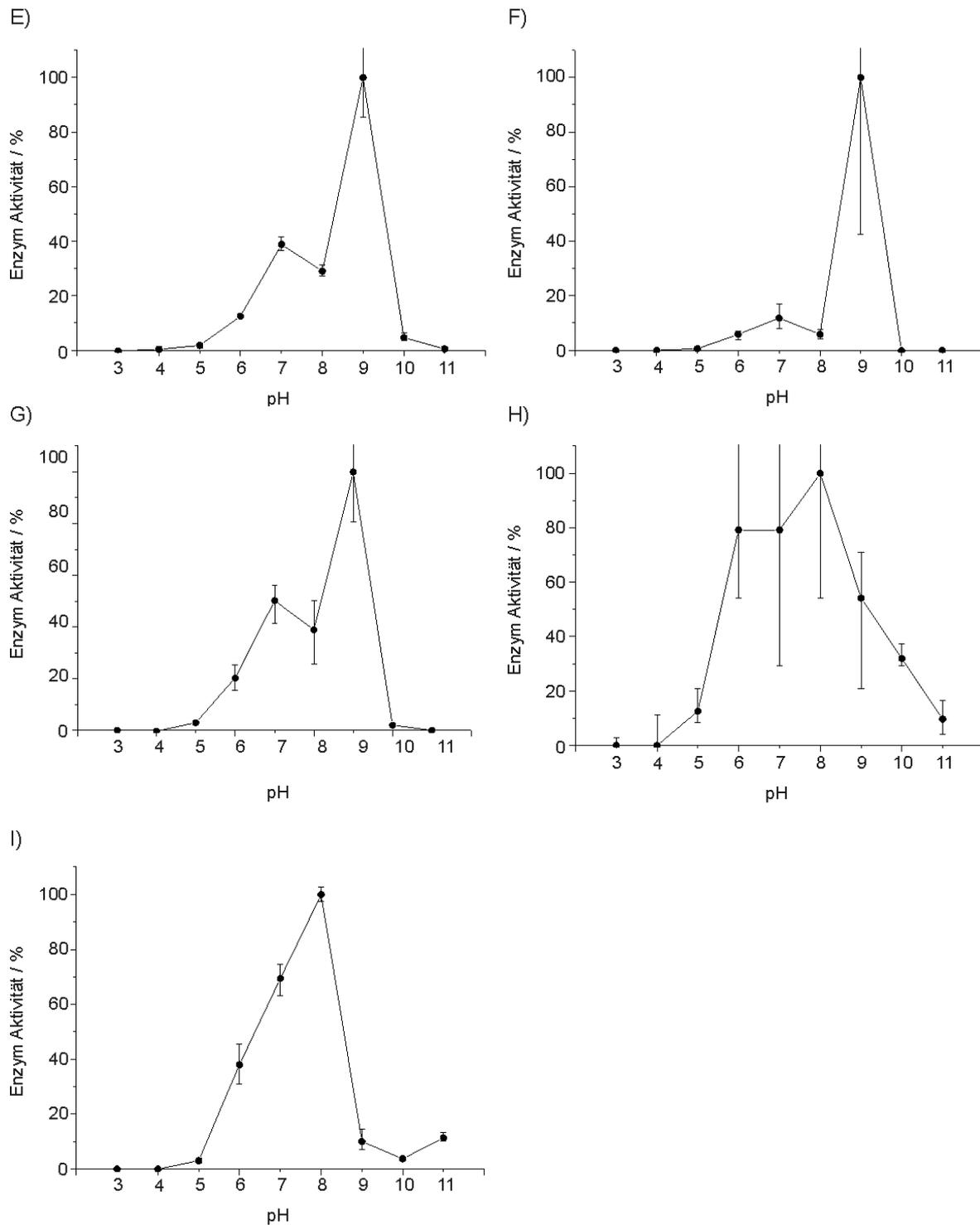


Abb. 29 Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische Aktivität der verschiedenen TTL-Kongenerer.

Der optimale pH-Wert (pH_{opt}) ist jeweils in Klammern angegeben. **(A)** TTL (8); **(B)** TTL[mFF] (8); **(C)** TTL[pFF] (7); **(D)** TTL[tHP] (9); **(E)** TTL[cHP] (9); **(F)** TTL[tFP] (9); **(G)** TTL[cFP] (9); **(H)** TTL[mFY] (8); **(I)** TTL[oFY] (8). Die Fehlerbalken geben jeweils den maximalen und minimalen gemessenen Wert an.

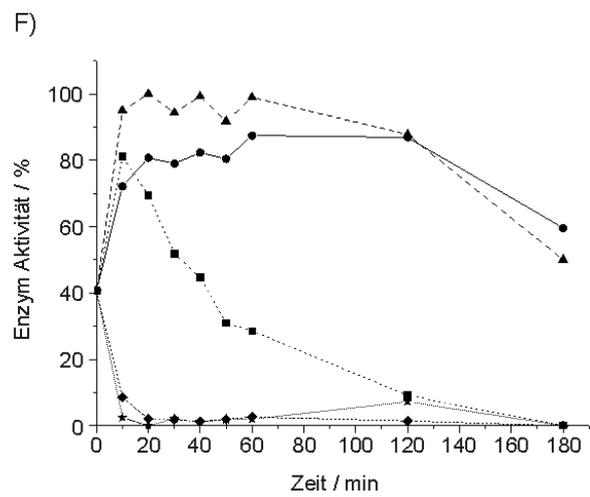
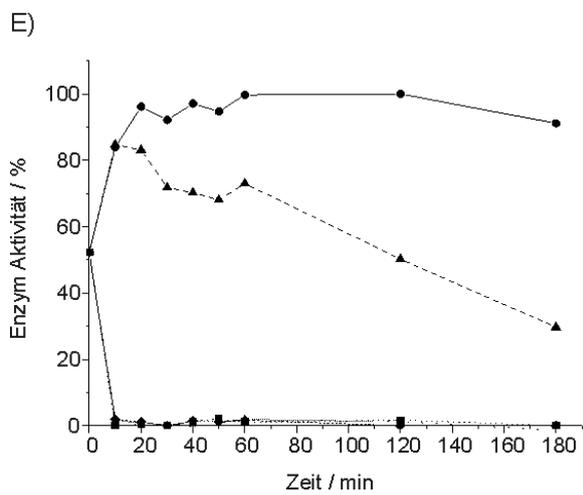
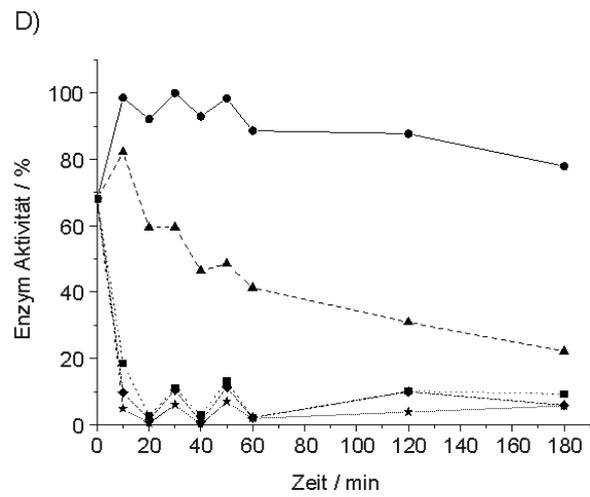
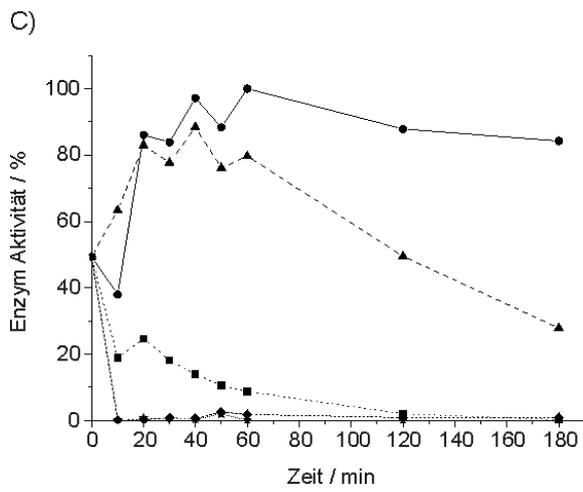
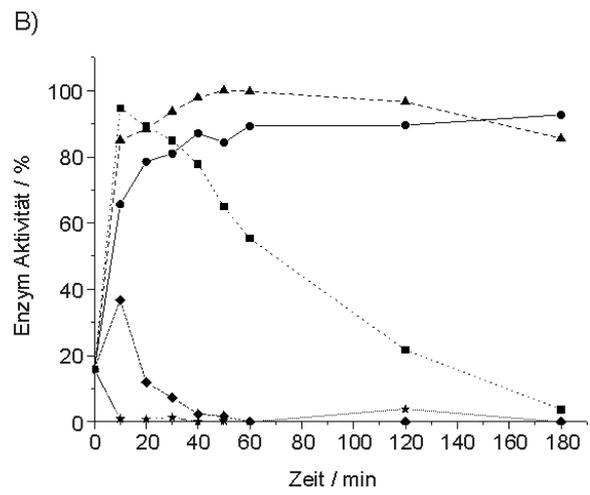
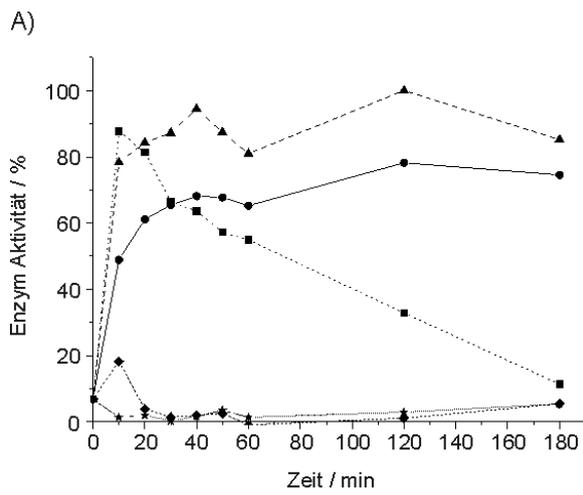
Die Bestimmung der optimalen pH-Werte ergab, dass die TTL und die TTL-Kongenerer in einem pH-Bereich von 7 bis 9 aktiv sind (siehe Abb. 29), mit einem pH_{opt} von 8 für die TTL (Abb. 29 A).^[131] Wie die TTL sind die Lipase-Kongenerer

am aktivsten unter neutralen bis leicht basischen Bedingungen und werden bei pH-Werten oberhalb von 10 inaktiviert. Im Falle der Kongenere mit Pro-Analoga war der pH_{opt} zum basischen Bereich hin verschoben (Abb. 29, D – G), während TTL[pFF] bei neutralem pH optimal aktiv war (Abb. 29 C). Es ist bekannt, dass die Fluorierung von Tyr den pKa-Wert eines Proteins um fast eine pH-Einheit absenken kann.^[83] Aber obwohl es 7 Tyr-Reste in der TTL gibt und einige von ihnen in der Umgebung des Substrat-Kanals lokalisiert sind, hatte ihre Fluorierung weder in *ortho*- noch in *meta*-Position einen Einfluss auf das pH-Optimum der entsprechenden Lipase-Kongenere (Abb. 29, H und I).

Eine kritische Analyse der pH-Profile in Abb. 29 zeigt, dass alle TTL-Kongenere zwischen pH 7 und 9 aktiv waren, jedoch waren die Werte der maximalen Aktivität unverhältnismäßig hoch. Hierbei handelt es sich um ein intrinsisches Artefakt des Tricaprylin-Assays, der gut dokumentiert ist.^[96] Vergleichbar den Messwerten für die T_{opt} mit dem *p*NPP-Assay kam es auch hier zu teilweise großen Streuungen der Messwerte, bedingt durch die technischen Gegebenheiten des Assays. Eine qualitative Analyse des pH_{opt} war aber dennoch möglich. Allerdings war die Übertragung des pH_{opt} vom Tricaprylin-Assay zum *p*NPP-Assay leider nicht erfolgreich, da keine verwertbaren Daten produziert werden konnten. Aus diesem Grund wurden alle nachfolgenden Messungen bei optimaler Temperatur und pH = 8,0 anstatt bei pH_{opt} durchgeführt.

4.3.5 Abhängigkeit der Lipase-Aktivität von der Temperaturexposition und Thermische Aktivierung

Um zu untersuchen, inwieweit die katalytische Aktivität der Lipasen erhalten bleibt, wenn diese über eine längere Zeit hohen Temperaturen ausgesetzt werden (Thermostabilität), wurden TTL und die Kongenere bei unterschiedlichen Temperaturen für 180 min inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Enzymaktivität bei T_{opt} und pH 8,0 mit dem *p*NPP-Assay ermittelt (siehe Abb. 30 und vergleiche 3.3.3.2.1).



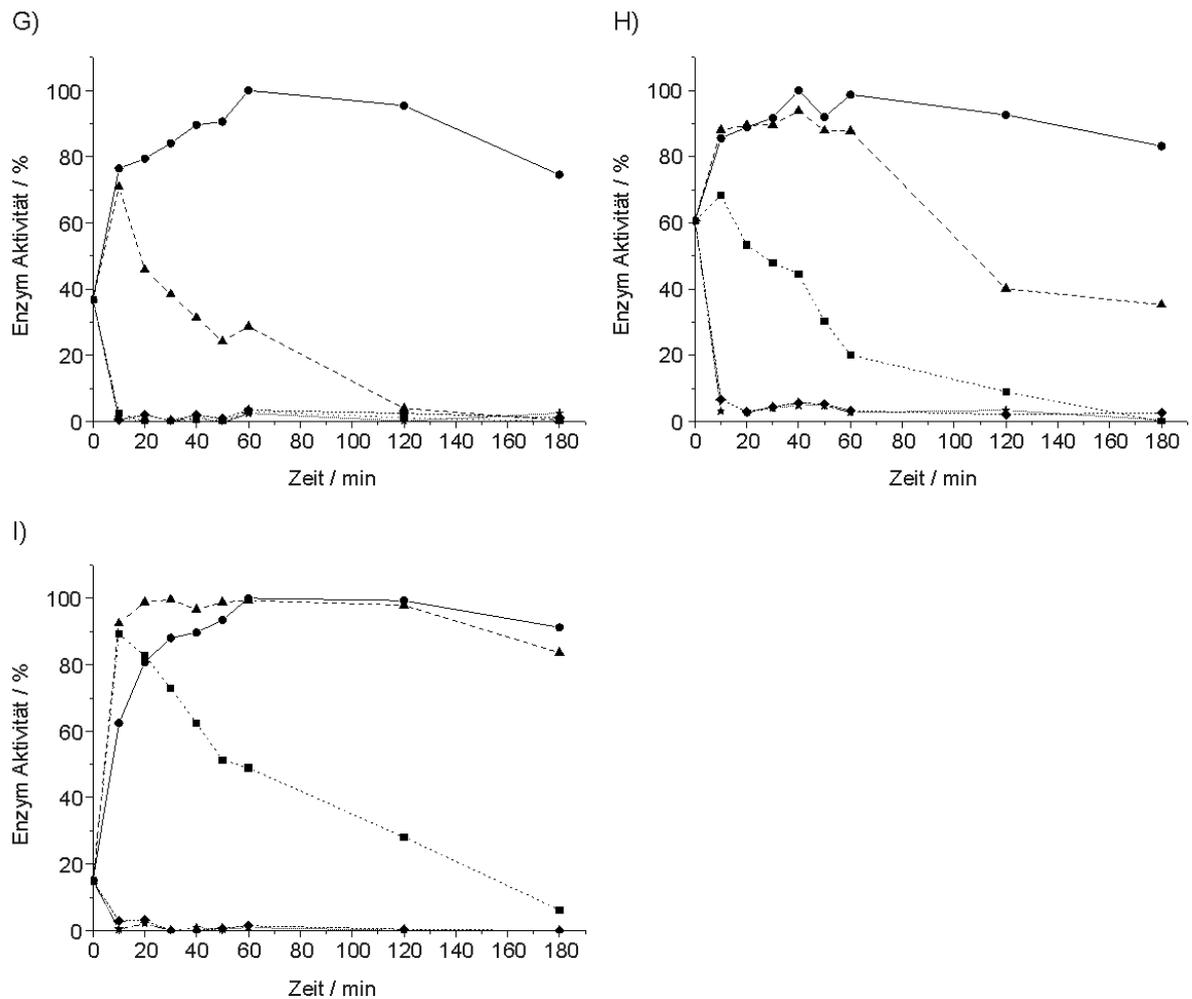


Abb. 30 Enzymatische Aktivität der TTL-Kongenerere nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen für 180 min.

Die Lipase Varianten wurden bei 75 °C (—●—), 80 °C (—▲—), 85 °C (·■·), 90 °C (—◆—) und 95 °C (··★··) inkubiert und jeweils nach den gekennzeichneten Zeitintervallen ihre Aktivität mit dem pNPP-Assay bestimmt. (A) TTL; (B) TTL[mFF]; (C) TTL[pFF]; (D) TTL[tHP]; (E) TTL[cHP]; (F) TTL[tFP]; (G) TTL[cFP]; (H) TTL[mFY]; (I) TTL[oFY]. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung von Fehlerbalken in den Diagrammen verzichtet.

Alle untersuchten Kongenerere außer TTL[tFP] (Abb. 30 F) zeigten eine hohe Stabilität für einen Zeitraum von 180 min bei 75 °C. Darüber hinaus fielen die Kongenerere mit Pro-Analoga (T_{opt} : 50 - 55 °C), aber auch TTL[pFF] und TTL[mFY] (T_{opt} : 55 °C bzw. 50 °C) besonders auf, da sie noch bei Temperaturen, die weit über ihrer T_{opt} lagen, recht stabil waren (Abb. 30 C, D – G und H). Bei 80 °C waren nur noch die Kongenerere, die die fluorinierten aromatischen Aminosäuren mFF, und oFY enthielten so stabil wie die TTL selbst (Abb. 30 A, B und I), während die Thermostabilität der anderen Kongenereren mit der Zeit bei dieser Temperatur deutlich abnahm. Nur noch etwa die Hälfte der Kongenerere zeigte bei 85 °C eine gewisse Thermostabilität (Abb. 30 A, B, F, H und I), während die restlichen nicht oder nahezu nicht mehr aktiv waren (C, D, E und G). Bei 90 °C

waren nur noch bei der TLL und TTL[mFF] nach 10 min eine geringe Restaktivität festzustellen (Abb. 30 A und B) und bei 95 °C war schließlich keines der Enzyme mehr aktiv.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle TTL-Varianten sehr stabil gegenüber Denaturierung durch Hitze waren, da sie auch bei Temperaturen oberhalb ihres T_{opt} Lipase-Aktivität zeigten. Allerdings führte keine der eingebauten nicht-kanonische Aminosäuren zu einem TTL-Kongener, das thermostabiler als TTL selbst war.

Deutlich zu sehen ist auch, dass die Thermostabilitätskurven (Abb. 30) eine thermische Aktivierung der meisten TTL Kongenere zeigen, da sich ihre Aktivität innerhalb der ersten 10 bis 20 min nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen stark erhöht. Dieser Effekt kommt durch das Phänomen der thermischen Aktivierung zustande, die notwendig für eine aktive TTL ist. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde die maximale Hitzeaktivierung als die n-fache Differenz zwischen der Lipase-Aktivität ohne Voraktivierung durch Temperatureinwirkung und der gemessene maximale Aktivität nach einer bestimmten Zeitspanne bei einer bestimmten Temperatur definiert (Tabelle 8 listet die exakten Temperatur-/Zeit-Daten für jedes Protein auf). Für die meisten Enzyme wurde die maximale Enzymaktivität bei 75 oder 80 °C und nach einer Vorinkubationszeit von 60 bis 120 min gefunden. Dabei reichte die Größenordnung der thermischen Aktivierung von vernachlässigbar bis zum ca. 14-fachen.

Tabelle 8: Thermische Aktivierung der Lipase-Kongenere

Die maximale Aktivierung (max. Akt.) wurde für die folgenden Inkubations-Temperaturen (Temp.) und Zeiten erhalten und entsprach der n-fachen Differenz zwischen Aktivität ohne und mit maximaler thermischer Aktivierung.

Lipase Variante	TTL	TTL [mFF]	TTL [pFF]	TTL [tHP]	TTL [cHP]	TTL [tFP]	TTL [cFP]	TTL [mFY]	TTL [oFY]
Temp./ Zeit	80 °C/ 60min	80 °C/ 50min	75 °C/ 60min	75 °C/ 50min	75 °C/ 60min	80 °C/ 60min	75 °C/ 60min	75 °C/ 40min	80 °C/ 60min
max. Akt. n-fach	14	6	2	2	1	2	3	2	7

In der folgenden Abbildung sind die Aktivitäten der einzelnen Lipase-Kongenere vor und nach ihrer maximalen thermischen Aktivierung graphisch dargestellt.

Neben der Stärke der Hitzeaktivierung lassen sich so auch die Aktivitäten der verschiedenen Kongenere miteinander vergleichen.

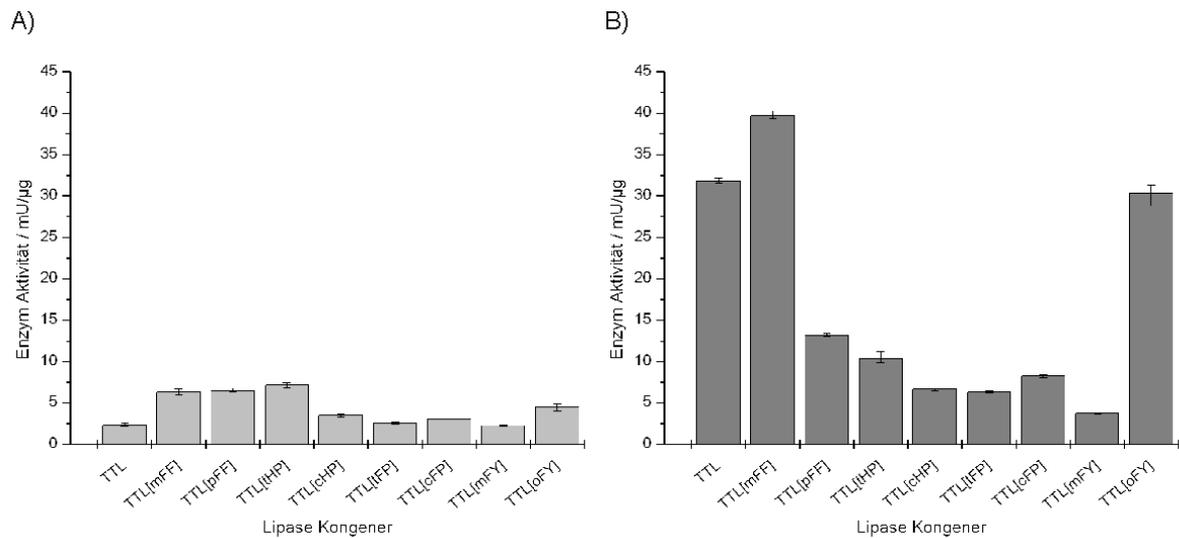


Abb. 31 Effekte der thermischen Aktivierung auf die enzymatische Aktivität der TTL und ihrer Kongenere.

(A): Aktivitäten der Lipase-Kongenere ohne thermische Aktivierung. (B): Aktivitäten nach thermischer Aktivierung

Die TTL zeigt ohne thermische Aktivierung kaum Aktivität. Diese steigt jedoch nach der Aktivierung auf das 14-fache an (Tabelle 8, Abb. 31). In diesem Enzym und den meisten seiner Kongenere muss die thermische Aktivierung also mit erheblichen Konformationsänderungen verbunden sein, um den Zugang für das Substrat zu ermöglichen. Dabei klappt die *lid*-Domäne, die in der inaktiven (geschlossenen) Form der TTL die Substrat-Bindungstasche verdeckt, nach außen.^[104] In der so entstandenen aktiven (offenen) Konformation ist das aktive Zentrum der TTL nun für das Substrat frei zugänglich.^[143]

4.3.5.1 TTL mit Pro-Analoga

Alle TTL-Kongenere, die fluorierte oder hydroxylierte Prolinanaloga enthielten, zeigten nur eine geringfügige Erhöhung der Enzymaktivität nach thermischer Aktivierung (Tabelle 8, Abb. 31). Offensichtlich beeinträchtigte die chemische Modifikation aller Pro-Reste im Enzym die Aktivität deutlich. Die Erklärung für dieses Verhalten könnte in der Lage und der strukturellen Funktion der sechs Pro-Reste, die innerhalb der TTL Struktur vor allem in Loop-Positionen liegen, zu finden sein (Abb. 25). Die interessanteste einzelne Prolyl-Seitenkette könnte Pro143 sein, die im TTL-Modell am Anfang der Struktur liegt, die als Deckel (*lid*) definiert wurde (vergl. Abb. 8 und Abb. 25). Diese Position ist analog mit Pro92 in der *Candida rugosa* Lipase, einem Aminosäurerest der eine entscheidende

Rolle in der Dynamik des Deckels spielt.^[136] Da jedoch der Pro Austausch (d. h. *cis/trans*-Hydroxylierung oder Fluorierung) global war und alle Pro-Reste nach einem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ ersetzt wurden, ist es schwierig eindeutig festzustellen ob dieser oder eben auch andere Pro-Reste für die Öffnung des Deckels bedeutend sind. Ein selektiver, positionsspezifischer Einbau von Pro-Analoga wäre hier nötig, um dieses Thema näher zu untersuchen.

4.3.5.2 TTL mit fluorierten Phe und Tyr Resten

Das auffälligste Merkmal der TTL-Kongenere mit global eingebauten fluorierten Phenylalanin- und Tyrosin-Resten war, dass ihre enzymatischen Aktivitäten stark von der Position ihrer Ringsubstitution abhingen (Abb. 31). Ähnlich wie TTL waren diese Lipasen ohne Hitzeaktivierung in wässriger Lösung nicht sehr aktiv. Jedoch übertraf TTL[mFF] nach thermischer Aktivierung die enzymatische Aktivität der nativen TTL um etwa 25 %, während die TTL[pFF] nur 40 % der enzymatischen Aktivität der TTL zeigte. Es ist bemerkenswert, dass die Fluorierung von aromatischen Phe-Seitenketten in *meta*-Position besonders vorteilhaft für die enzymatische Aktivität war, während Fluor in *para*-Position diese beeinträchtigte. Ebenso inaktivierte die Fluorierung von Tyr-Reste an der *meta*-Position das Enzym erheblich, während TTL[oFY] nach der Hitzeaktivierung voll aktiv war. Leider ist es schwierig, über die Rolle insbesondere der Phe oder Tyr-Reste zu spekulieren, da eine hochauflösende Proteinstruktur der TTL fehlt. Dennoch zeigten vorhandene Strukturen von EGFP mit oFY und mFY, dass die Fluorierung des aromatischen Rings von Tyr nicht nur zahlreiche ungewöhnliche Interaktions-Distanzen generieren kann, sondern auch ein interessantes dynamisches Verhalten.^[83] D. h. *ortho* Fluoratome von Tyrosyl-Seitenketten weisen in EGFP nur einen einzigen Konformationszustand auf, während mit einem Fluoratom in *meta*-Position zwei Zustände gebildet werden.^[83] Die Koexistenz von zwei Rotationskonformeren des *meta*-Fluortyrosins und die Existenz von nur einer festen (und starren) Konformation des *ortho*-Fluortyrosins im kristallinen Zustand wird als Merkmal von global fluorierten Proteinen diskutiert.^[83, 144] Inwieweit sich mit diesen strukturellen Beobachtungen die gefundenen Unterschiede zwischen TTL[oFY] und TTL[mFY] erklären lassen, bleibt jedoch zu prüfen.

4.3.6 Substrat Toleranz

Lipasen katalysieren die Hydrolyse von Triglyceriden in Fettsäuren und Glycerin, und verestern Fettsäuren und Alkohole (vergl. 1.4.2). Die Synthese von spezifischen Verbindungen hängt von der Beschaffenheit der Substrat-Bindungsstelle ab, die durch einen hydrophoben Tunnel in der Nähe der katalytischen Reste gebildet wird. Darüber hinaus hängt es von der Kettenlänge der Fettsäure und von der Form und der Aminosäurezusammensetzung des Tunnels ab, ob die Fettsäure als Substrat verwendet wird.^[139] Es ist daher möglich, dass die Substratspezifität der Lipase-Kongenerie durch den Einbau der Analoga verändert wird. Zur Bestimmung der Substratspezifität der einzelnen TTL-Kongenerie wurde deshalb ihre Lipase-Aktivität unter Verwendung von Triacylglyceriden mit unterschiedlich langen Acyl-Seitenketten gemessen (siehe. 3.3.3.2.6 für Details).

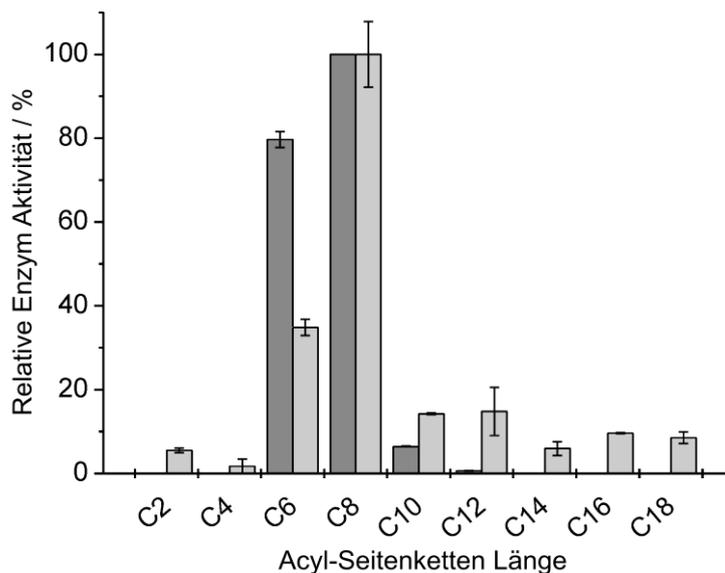


Abb. 32 Bevorzugte Acyl-Seitenkettenlänge von TTL und TTL[mFF].

TTL (dunkelgrau) zeigte eine starke Präferenz für C₆-C₈ Triglyceride. Allerdings zeigte TTL[mFF] (hellgrau) verglichen mit der TTL eine breitere Toleranz gegenüber Triglycerid-Substraten mit kürzeren (Esterase-Verhalten), sowie längeren Acyl-Ketten (Lipase-Verhalten). Die Lipase Spezifität wurde mit den folgenden Triglyceriden getestet: Triacetin (C₂:0), Tributyrin (C₄:0), Tricaproin (C₆:0), Tricaprylin (C₈:0), Tricaprin (C₁₀:0), Trilaurin (C₁₂:0), Trimyristin (C₁₄:0), Tripalmitin (C₁₆:0) und Tristearin (C₁₈:0). Die Fehlerbalken geben jeweils den maximalen und minimalen gemessenen Wert an. Alle anderen Kongenerie verhielten sich ähnlich der TTL selbst und sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Die Daten wurden freundlicherweise von Marina Royter bereit gestellt.

Es zeigte sich, dass TTL die höchste Aktivität gegenüber Tricaproin (C₆) und Tricaprylin (C₈) aufweist, und in geringerem Maß auch für Tricaprin (C₁₀) (Abb. 32). Alle übrigen Kongenerie hatten ähnliche Aktivitätsprofile gegenüber

den Triglycerid-Derivaten (Daten nicht gezeigt). Lediglich die ebenfalls in Abb. 32 aufgeführte TTL[mFF] zeigte eine außergewöhnlich breite Toleranz gegenüber Triglycerid-Substraten mit kürzeren (Esterase-Verhalten), sowie mit längeren Acyl-Ketten (Lipase-Verhalten) (vergl. 1.4.2). Das besondere Verhalten von TTL[mFF] kann durch die Beschaffenheit des aktiven Zentrums der TTL erklärt werden, da die Substrat-Bindungsstelle von hydrophoben Resten (Val, Leu, Ile, Tyr, Phe und Trp) umgeben ist. Wie bereits erwähnt wird angenommen, dass die Anwesenheit von sperrigen aromatischen Aminosäuren wie Trp und Tyr an verschiedenen Positionen der Lipase Bindungsstelle zu Einschränkungen und Änderungen in der Substratspezifität gegenüber verschiedenen Fettsäuren führt.^[140-142] Die strukturelle Grundlage für den positiven Einfluss von in *meta*-Position fluorierten Phe-Resten kann nur mit Hilfe von Strukturinformationen mit hoher Auflösung erklärt werden. Dennoch weist die katalytische Aktivität gegenüber einer Vielzahl von Substraten mit unterschiedlich langen Acyl-Ketten auf eine breitere Substrattoleranz der TTL[mFF] hin.

4.3.7 Einfluss von Additiven auf die Lipase-Aktivität

Um den Einfluss von Additiven auf die Aktivität der Lipase zu untersuchen, wurden die gereinigten TTL-Kongenere mit unterschiedlichen Konzentrationen an organischen Lösungsmitteln, Metallionen, Detergenzien und Inhibitoren bei Raumtemperatur (RT) für eine Stunde ohne Substrat vorinkubiert und anschließend ihre noch vorhandene Lipase-Aktivität gemessen (siehe 3.3.3.2.2 für Details).

Es ist wichtig zu erwähnen, dass hierbei in allen Assays aufgrund der Vorinkubation von Lipase und Additive bei RT keine thermische Aktivierung der Lipase durchgeführt werden konnte. Die gemessenen Aktivitätswerte eines Kongeners wurden jeweils in Relation zu der Aktivität des entsprechenden Lipase-Kongeneres ohne Zusatz eines Additivs (entspricht 100 % Aktivität) gesetzt. D. h., dass Werte unter 100 % eine Verringerung und Werte über 100 % eine Steigerung der Lipase-Aktivität unter Einfluss des Additivs bedeuten. Zur besseren graphischen Darstellung der Aktivitäten wurden die gemessenen Werte in den einzelnen Tabellen farblich hinterlegt (vergleiche Tabelle 9).

Tabelle 9: Farbskala der Lipase-Aktivitäten nach Einfluss von Additiven, als Prozentwert der Aktivität des Kongeneres ohne Einwirkung eines Additivs.

Die Prozentwerte in dieser Tabelle geben den Aktivitätsbereich an, der durch die entsprechende Farbe gekennzeichnet ist.

Aktivität (in % von „ohne Additiv“):	< 25 %	≥ 25 % bis < 75 %	≥ 75 % bis < 125 %	≥ 125 % bis < 200 %	≥ 200 % bis < 300 %	≥ 300 % bis < 400 %	≥ 400 %
---	--------	-------------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------

4.3.7.1 Organische Lösungsmittel

Die Art des organischen Lösungsmittels ist von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Wassergehaltes der Lipase, d. h. der Wasserschicht, die die Oberfläche des Enzyms wie eine schützende Hülle umgibt und die für die katalytische Aktivität extrem wichtig ist (vergl. hierzu 1.4.2). Stärker hydrophobe Lösungsmittel erhalten diese Wasserschicht, was sich positiv auf die katalytische Aktivität auswirken könnte. Auf der anderen Seite neigen hydrophile Lösungsmittel dazu, die essenziellen Wassermoleküle aus der Enzymoberfläche heraus zu lösen, was zu einer Veränderung der katalytischen Konformation der TTL führen kann.^[95, 145]

Zur Bestimmung des Einflusses der verschiedenen organischen Lösungsmittel auf die Lipase-Aktivität wurden die TTL-Kongenerere in 90%igen Lösungen der Lösungsmittel (in 10 % 25 mM Tris/HCl pH 8,0) inkubiert und anschließend die Restenzymaktivität der einzelnen Lipasen gemessen.

Tabelle 10: Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Aktivität der TTL-Kongenerere.

Die gemessenen Werte sind in Relation zu der Aktivität des entsprechenden Kongeneres ohne Einfluss eines Additivs angegeben Die Zuordnung der Farbskala zu den Aktivitätsbereichen ist in Tabelle 9 dargestellt.

Organische Lösungsmittel (90 %)	TTL	TTL [mFF]	TTL [pFF]	TTL [tHP]	TTL [cHP]	TTL [tFP]	TTL [cFP]	TTL [mFY]	TTL [oFY]
ohne	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>tert</i> -Butanol	111%	163%	269%	254%	343%	447%	435%	365%	131%
Ethanol	49%	98%	87%	121%	126%	163%	137%	96%	81%
Isopropanol	84%	173%	163%	177%	256%	302%	275%	210%	60%
Pyridin	3%	2%	5%	9%	6%	13%	13%	36%	0%
DMSO	2%	2%	0%	0%	1%	2%	3%	7%	3%
Aceton	71%	106%	180%	117%	185%	260%	214%	86%	74%
Dimethylformamid	72%	62%	148%	93%	189%	193%	162%	152%	58%
Methanol	14%	41%	47%	0%	1%	0%	23%	9%	47%
Acetonitril	36%	83%	167%	142%	71%	391%	324%	146%	61%
<i>n</i> -Hexan	30%	49%	51%	26%	66%	68%	173%	75%	18%
Hexadecan	133%	144%	207%	151%	170%	202%	208%	162%	171%
Heptan	60%	70%	76%	50%	105%	73%	153%	85%	40%
Isooctan	62%	78%	84%	8%	134%	120%	156%	92%	1%
<i>n</i> -Decylalkohol	40%	38%	32%	0%	35%	33%	119%	97%	39%
Toluol	3%	2%	3%	2%	7%	7%	11%	9%	1%

DMSO = Dimethylsulfoxid

Wie erwartet zeigten die getesteten organischen Lösungsmittel extrem unterschiedliche Effekte auf die Aktivitäten der TTL-Kongenerere. Einige Lösungsmittel löschten die Aktivität der Lipasen fast vollständig aus, wie etwa Pyridin (nur TTL[mFY] zeigte hier noch 36 % Restaktivität), DMSO oder Toluol. Oder sie verringerten sie deutlich, wie dies bei Methanol, *n*-Hexan und *n*-Decylalkohol der Fall war. Bei den beiden letzteren entsprachen jedoch TTL[cFP] mit einer deutlichen Aktivierung (173 % bzw. 119%) und TTL[mFY] mit nur leichter Deaktivierung (75 % bzw. 97 %) nicht dem allgemein beobachteten Trend. Eine auf alle Kongenerere aktivierende Wirkung zeigten nur *tert*-Butanol und Hexadecan, wobei für *tert*-Butanol die mit Abstand höchsten Aktivitätswerte gemessen wurden. Für TTL[cHP] und TTL[mFY] lagen diese bei über 300 % und für TTL[tFP] und TTL[cFP] sogar bei über 400 % der Aktivität der entsprechenden Kongenerere in Abwesenheit des Lösungsmittels. Für die übrigen getesteten Lösungsmittel zeigte sich ein uneinheitliches Bild der Aktivitätsbeeinflussung zwischen den verschiedenen TTL-Kongenereren. Während einige deaktiviert

wurden, wurden andere nur schwach beeinflusst und wieder andere Kongenere deutlich aktiviert. Besonders drastisch war dies bei Acetonitril zu sehen. Hier wies TTL nur noch eine Restaktivität von 36 % auf, wohingegen TTL[tFP] und TTL[cFP] mit Aktivitäten von 391 % und 324 % extrem stark aktiviert wurden.

Die oben erwähnte Vermutung, dass sich hydrophobe Lösungsmittel eher positiv und hydrophile Lösungsmittel eher negativ auf die katalytische Aktivität der TTL-Kongenere auswirken könnten, konnte nicht allgemein bestätigt werden. So hatte zwar das langkettige Hexadecan durchweg aktivierenden Einfluss, bei den mittelkettigen Alkanen *n*-Hexan, Heptan und Isooctan zeigten sich allerdings sehr unterschiedliche Effekte auf die einzelnen TTL-Kongenere. Die schwach hydrophoben mittelkettigen Alkohole Isopropanol und *tert*-Butanol wirkten stark aktivierend und das hydrophile Methanol stark deaktivierend, aber auch Ethanol hatte einen eher positiven oder neutralen Einfluss, wohingegen der sehr hydrophobe *n*-Decylalkohol überwiegend negativen Einfluss hatte. Aceton, Dimethylformamid und Acetonitril, alle eher hydrophil, wirkten vorwiegend aktivierend. Pyridin und DMSO (beide hydrophil) und Toluol (hydrophob) zerstörten die Aktivität der Kongenere fast vollständig, so dass hier andere, enzymschädigende Eigenschaften dieser Lösungsmittel eventuell vorhandene hydrophobe/hydrophile Effekte überlagerten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lösungsmittel auf TTL und TTL[oFY] überwiegend negativen Einfluss hatten, während die Kongenere mit Prolinanaloga durch viele der getesteten Substanzen aktiviert wurden. Insbesondere die beiden Kongenere mit *trans*-4-Fluorprolin (TTL[tFP]) und *cis*-4-Fluorprolin TTL[(cFP)] zeigten eine besonders beeindruckende Toleranz gegenüber vielen Lösungsmitteln. Aber auch die Lipase mit *meta*-Fluortyrosin (TTL[mFY]) wies im Vergleich mit dem Ausgangsenzym deutlich verbesserte Aktivitätswerte auf.

4.3.7.2 Metallionen

Im katalytischen Mechanismus von Lipasen spielen Metallionen zwar keine direkte Rolle und TTL enthält auch keine Metallionen als stabilisierende Co-Faktoren, jedoch können sie in diversen technischen Anwendungen von Lipasen Bestandteil des Reaktionsmilieus sein. Aus diesem Grund ist es bedeutsam, die Widerstandsfähigkeit der einzelnen TTL-Kongenere gegenüber verschiedenen Metallionen zu kennen.

Auch werden Lipasen häufig in enantioselektiven Reaktionen verwendet. Das Fehlen von Enantioselektivität einiger Lipasen ist daher ein großes Problem in der organischen Chemie. Verschiedene Strategien wurden bisher bereits getestet, um dieses Problem zu lösen, wie etwa die Optimierung des Lösungsmittels oder des Wassergehalts, Änderungen in der Proteinstruktur der Lipase und Effekte von Additiven.^[145] Die Zugabe von Metallionen ist aufgrund der Einfachheit und des Potentials die attraktivste Wahl. Die Enantioselektivität einer durch eine Lipase katalysierte Reaktion wird so zum Beispiel durch Zugabe einer kleinen Menge LiCl um das hundertfache gesteigert.^[146] Darüber hinaus konnte eine nahezu enantiomerenreine Umsetzung erreicht werden, wenn die Reaktionstemperatur abgesenkt wurde. Wegen dieser Bedeutung von Metallionen in enantioselektiven, Lipase-katalysierten Reaktionen, wurde in einem ersten Schritt mit Hilfe verschiedener Salzlösungen die Wirkung von Metallionen auf die Lipase-Aktivität der TTL-Kongenere untersucht (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Einfluss von Metallionen auf die Aktivität der TTL-Kongenere.

Die gemessenen Werte sind in Relation zu der Aktivität des entsprechenden Kongeneres ohne Einfluss eines Additivs angegeben. Die Zuordnung der Farbskala zu den Aktivitätsbereichen ist in Tabelle 9 dargestellt.

Metallionen (10 mM)	TTL	TTL [mFF]	TTL [pFF]	TTL [tHP]	TTL [cHP]	TTL [tFP]	TTL [cFP]	TTL [mFY]	TTL [oFY]
ohne	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Ag ⁺	74%	57%	83%	63%	68%	78%	69%	90%	63%
Ni ²⁺	0%	2%	5%	8%	12%	6%	3%	0%	0%
Cu ²⁺	27%	32%	3%	17%	15%	32%	22%	51%	13%
Co ²⁺	14%	47%	35%	39%	45%	55%	33%	22%	14%
Rb ²⁺	91%	63%	72%	77%	82%	78%	72%	92%	69%
Zn ²⁺	0%	0%	0%	0%	1%	8%	5%	5%	8%
Sr ²⁺	61%	3%	12%	9%	15%	32%	54%	73%	7%
Mn ²⁺	24%	37%	22%	33%	35%	65%	37%	35%	32%
Mg ²⁺	66%	29%	36%	37%	33%	42%	50%	73%	23%
Fe ²⁺	0%	21%	15%	7%	8%	10%	5%	6%	0%
Fe ³⁺	10%	41%	23%	34%	27%	59%	31%	23%	24%
Ca ²⁺	59%	32%	32%	31%	28%	47%	43%	62%	18%
K ⁺	93%	127%	88%	93%	86%	98%	97%	95%	87%
Na ⁺	117%	124%	92%	102%	92%	97%	101%	96%	84%
Cr ³⁺	6%	21%	8%	17%	5%	9%	7%	18%	17%
Al ³⁺	29%	51%	11%	15%	14%	63%	44%	15%	13%

Die einzigen beiden Kationen, deren Gegenwart die Aktivitäten der TTL-Kongenere nur geringfügig beeinträchtigten, waren K⁺ und Na⁺. Bei TTL[mFF] konnte sogar eine leichte Steigerung der Aktivität beobachtet werden (127 bzw. 124 %). Abgesehen von Ag⁺, bei dem eine Aktivitätsabnahme von 10 bis 43 %

auftrat, legen diese Ergebnisse nahe, dass die einwertigen Kationen die Lipase-Aktivität nicht wesentlich ändern. Auch nach der Behandlung mit Rb^{2+} wurden die TTL-Kongenere nur wenig (8 %) bis mittelstark (37 %) gehemmt. Bei allen andere Metallionen betrug die hemmende Wirkung auf die Aktivitäten der Lipasen stets über 25 %. Der hemmende Effekt von Calcium-Ionen auf die Lipase-Aktivität ist hierbei gut dokumentiert.^[147] Die stärksten negativen Effekte waren bei Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} und Cr^{3+} zu detektieren. Hier wurde die Aktivität der TTL und ihrer Kongenere vollständig ausgelöscht, oder es waren nur noch geringe Restaktivitäten bis maximal 21 % vorhanden.

Diese teils starken Auswirkungen machen deutlich, dass für eine technische Anwendung der Lipase-Kongenere eine genaue Kenntnis über Art und Konzentration der im Reaktionsmilieu vorkommenden Metallionen notwendig ist und deren Einflüsse auf das verwendete Kongener jeweils kritisch geprüft werden sollten. Darüber hinaus sind vor allem die einwertigen Kationen, durch ihre eher geringen Auswirkungen auf die Lipase-Aktivität, viel versprechende Kandidaten bezüglich weitergehender Untersuchungen bei der Verwendung der TTL-Kongenere in enantioselektiven Reaktionen.

4.3.7.3 Detergenzien

Lipasen sind an der Lipid-Wasser-Grenzfläche von emulgierten Substraten aktiv. Allerdings sind Emulsionen von Natur aus instabil, wobei der Grad der Stabilität von der Art und Konzentration des verwendeten Detergenzes (Tensides) beeinflusst wird. Ein Detergenz besteht sowohl aus hydrophoben und hydrophilen Gruppen, so dass es sowohl in polaren als auch in unpolaren Substanzen begrenzt löslich ist. Diese Detergenzien oder Emulgatoren helfen die Grenzflächenspannung zwischen den Phasen zu senken, oder umgeben die Emulsionströpfchen mit einem dünnen, geladenen Film. Aus diesem Grund ist es möglich, dass die Lipase-Aktivität an der Lipid-Wasser-Grenzfläche durch die Anwesenheit dieser Substanzen verändert wird. Um die Wirkung von grenzflächenaktiven Stoffen auf die Aktivität der TTL zu charakterisieren, wurden die Lipase-Kongenere mit unterschiedlichen Detergenzien und weiteren Additiven inkubiert (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Einfluss von Detergenzien auf die Aktivität der TTL-Kongenere.

Die gemessenen Werte sind in Relation zu der Aktivität des entsprechenden Kongeneres ohne Einfluss eines Additivs angegeben. Die Zuordnung der Farbskala zu den Aktivitätsbereichen ist in Tabelle 9 dargestellt.

Detergenzien (10 %)	TTL	TTL [mFF]	TTL [pFF]	TTL [tHP]	TTL [cHP]	TTL [tFP]	TTL [cFP]	TTL [mFY]	TTL [oFY]
ohne	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
SDS	8%	6%	15%	15%	0%	20%	13%	0%	0%
Triton X-100	86%	5%	16%	10%	61%	0%	16%	43%	12%
Tween20	26%	26%	0%	21%	132%	0%	71%	0%	0%
Tween80	7%	2%	0%	4%	5%	1%	36%	14%	5%
EDTA	259%	98%	151%	52%	112%	33%	48%	114%	47%
PVA	336%	185%	278%	165%	458%	186%	157%	165%	47%
CHAPS	171%	190%	373%	211%	1627%	989%	714%	1167%	516%

SDS = Natriumdodecylsulfat; Triton X-100 = Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl]-ether; Tween 20 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat; Tween 80 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat; EDTA = Ethylendiamintetraacetat; PVA = Polyvinylalkohol; CHAPS = 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate.

CHAPS hatte den mit Abstand größten, positiven Einfluss auf die Lipase-Aktivität der TTL-Kongenere. Während bei TTL (171 %), TTL[mFF] (190 %) und TTL[tHP] (211 %) die Zunahme der Aktivität schon deutlich erkennbar aber noch moderat war, zeigten TTL[cHP] mit 1627 %, TTL[mFY] mit 1167 % und TTL[tFP] mit 989 %, aber auch TTL[cFP] (714 %) und TTL[oFY] (516 %) extrem hohe Aktivitätssteigerungen. Inwieweit diese Absolutwerte real sind, oder ein Artefakt des Assays darstellen, ist hierbei nicht eindeutig zu beantworten. Unverkennbar ist jedoch die starke Steigerung der Aktivität mancher Kongenere im Verhältnis zur TTL. Eine ähnliche, wenn auch bedeutend schwächere Verbesserung der Aktivität konnte in Anwesenheit von PVA für alle Kongenere, mit Ausnahme von TTL[oFY], beobachtet werden. Hier fielen besonders TTL mit 336 % und TTL[cHP] mit 458 % Aktivität auf. Diese beobachteten Veränderungen lassen sich wahrscheinlich auf die chemische Natur dieser Substanzen zurückführen. CHAPS ist ein zwitterionisches, nichtdenaturierendes Detergenz, wogegen PVA ein synthetisches, wasserlösliches Polymer ist. Beide enthalten zahlreiche polare Hydroxyl-Gruppen (siehe Abb. 33). Daher könnten diese Stoffe sowohl gut mit den exponierten OH-Gruppen der Hydroxyproline als auch mit den polaren Fluoratomen der übrigen Analoge interagieren. Auffällig war jedoch, dass die Hydroxyl-Gruppen in *cis*-Position (TTL[cHP]) einen wesentlich größeren aktivierenden Effekt hatten. Eine Steigerung der Lipase-Aktivität nach Behandlung mit CHAPS wurde auch zuvor schon in der Literatur^[148-150] berichtet.

Da EDTA (vergl. Abb. 33) mit den meisten Metallionen Chelate bilden kann, wird es als Zusatz in Wasch- und Reinigungsmitteln genutzt, um im Wasser enthaltene Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zu binden (Enthärtung). Darüber hinaus wird es auf vielerlei Weise in der Chemie-, Papier-, Lebensmittel-, medizinischen und kosmetischen Industrie eingesetzt. Auch findet es Anwendung in der Inaktivierung von Metall-abhängigen Enzymen. Während die Aktivität der TTL in Gegenwart von EDTA um mehr als 150 % gesteigert wurde, hatte es auf die anderen Kongenere eine eher neutrale oder sogar deutlich inhibierende Wirkung. Was genau die Ursache für diese unterschiedliche Wirkung auf die einzelnen Kongenere ist, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht beurteilen, auch weil, wie im Fall von TTL[tHP] (52 %) und TTL[cHP] (112 %) oder von TTL[mFY] (114 %) und TTL[oFY] (47 %) lediglich die *cis-trans*-Isomerie bzw. die Position der Ringsubstitution darüber entschied, ob der Kongener inhibiert wird oder nicht. Allerdings wurde auch schon für anderen Lipasen eine hemmende Wirkung von EDTA berichtet.^[147]

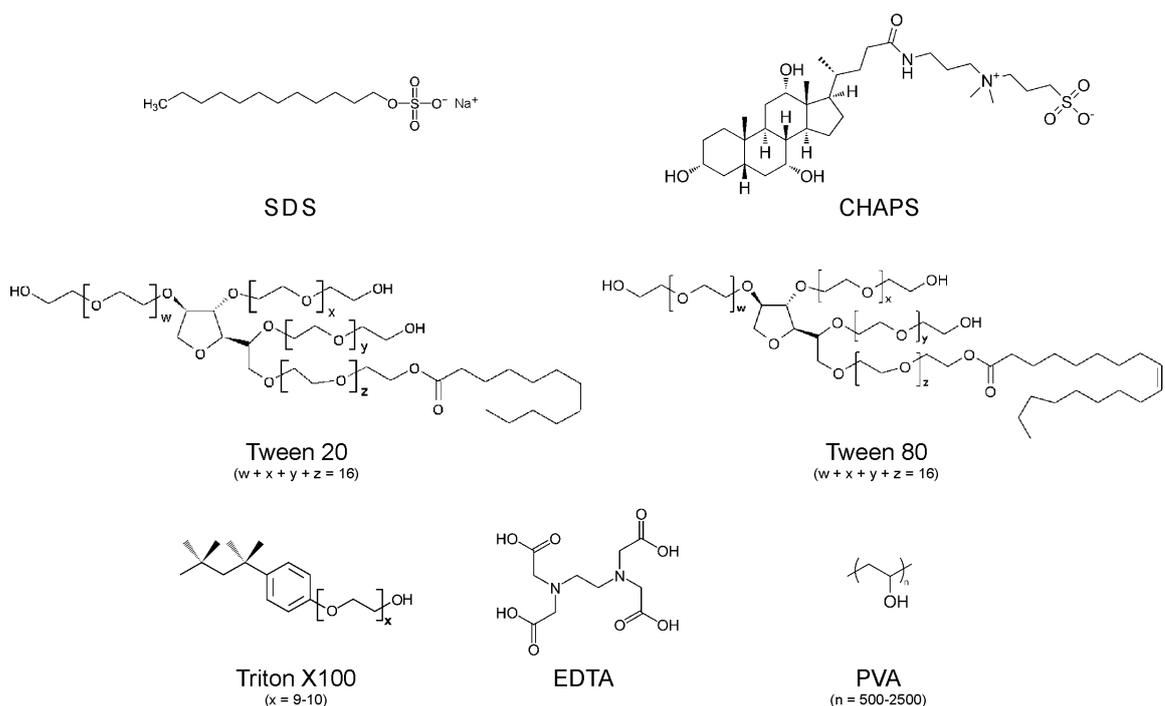


Abb. 33 Strukturen der verwendeten Detergenzien.

SDS = Natriumdodecylsulfat; CHAPS = 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate; Tween 20 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat; Tween 80 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat; Triton X-100 = Polyethylen glycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl]-ether; EDTA = Ethylendiamintetraacetat; PVA = Polyvinylalkohol.

Triton X-100 ist nichtionisch und enthält sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche, aber keine Nettoladung (siehe Abb. 33). Der hydrophile Teil besteht

aus einer Polyethylenglykol-Gruppe, die sich aus 9 bis 10 Ethylenoxid-Einheiten zusammensetzt. Tween 20 ist ein Polyoxyethylenderivat von Sorbitanmonolaurat, Tween 80 ein nichtionisches Tensid und Emulgator aus polyethoxyliertem Sorbitan und Ölsäure, das in Wasser sehr gut löslich ist und oft in der Lebensmittelindustrie verwendet wird. SDS ist eines der am häufigsten verwendeten anionischen Tenside in Reinigungsmitteln und Hygiene-Produkten einschließlich Zahnpasten, Shampoos und Duschgelen. Nach der Inkubation mit SDS, Triton X-100, Tween 20 oder Tween 80 wurde eine generelle, in den meisten Fällen sogar eine extrem hohe Abnahme der Aktivitäten aller Lipase-Kongenere beobachtet. Die einzige Ausnahme stellte TTL[cHP] da, das unter dem Einfluss von Tween 20 eine Aktivitätssteigerung von 32 % zeigte. Für die TTL selbst wurde lediglich bei Triton X-100 eine nur schwache Abnahme von 14 % gemessen.

Diese Messungen geben einen ersten Einblick in die Auswirkungen von Detergenzien auf die verschiedenen Kongenere. Um die Effekte auf die Lipase-Aktivitäten jedoch besser verstehen zu können, wären umfassendere Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den Detergenzien, dem Substrat und den TTL-Kongenere notwendig.

4.3.7.4 Inhibitoren

Durch die Wirkung von verschiedenen Inhibitoren auf Lipasen lassen sich Aussagen über ihre katalytischen Mechanismen treffen. Die Effekte auf das Enzym können reversibel oder irreversibel sein, wobei reversible Inhibitoren die Aktivität der Lipase durch Veränderung der Konformation oder der Grenzflächeneigenschaften hemmen, aber nicht direkt auf das aktive Zentrum wirken. Irreversible Inhibitoren binden häufig kovalent und wirken im Gegensatz dazu direkt auf das aktive Zentrum von Lipasen.^[4] Zur weiteren Charakterisierung der TTL-Kongenere wurden diese mit den irreversiblen Inhibitoren Pefabloc und PMSF sowie mit verschiedenen, denaturierend wirkenden Substanzen inkubiert (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Einfluss von Inhibitoren auf die Aktivität der TTL-Kongenerere.

Die gemessenen Werte sind in Relation zu der Aktivität des entsprechenden Kongeneres ohne Einfluss eines Additivs angegeben Die Zuordnung der Farbskala zu den Aktivitätsbereichen ist in Tabelle 9 dargestellt.

Inhibitoren	TTL	TTL [mFF]	TTL [pFF]	TTL [tHP]	TTL [cHP]	TTL [tFP]	TTL [cFP]	TTL [mFY]	TTL [oFY]
ohne	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
10 mM BME	77%	86%	105%	141%	85%	92%	78%	19%	66%
10 mM DTT	82%	97%	98%	105%	103%	120%	100%	95%	112%
10 mM 2-Iodoac	84%	105%	101%	119%	119%	139%	121%	98%	103%
0.5 M GdnCl	4%	66%	0%	0%	0%	0%	29%	42%	35%
2 M Urea	90%	105%	125%	142%	132%	135%	151%	154%	145%
0.1 mM PMSF	83%	101%	91%	85%	103%	116%	142%	123%	103%
0.1 mM Pefabloc	0%	0%	2%	9%	0%	0%	36%	41%	0%

BME = β -Mercaptoethanol; DTT = Dithiotreitol; 2-Iodoac = 2-Iodoacetat; GdnCl = Guanidinhydrochlorid; PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid; Pefabloc = 4-(2-Aminoethyl)-benzylsulfonylfluoridhydrochlorid.

Guanidinhydrochlorid (GdnCl) ist in hohen Konzentrationen von 6 bis 8 M eines der stärksten und gebräuchlichsten Denaturierungsmittel für Proteine.^[4] Die hier verwendete Konzentration war mit 0,5 M zwar deutlich geringer, dennoch hatte sie eine starke Wirkung auf die meisten TTL-Kongenerere, die vermutlich auf einer leichten Denaturierung beruht. Lediglich TTL[mFF] mit 66 %, aber auch TTL[cFP] (29 %), TTL[mFY] (42 %) und TTL[oFY] (35 %) zeigten hier noch deutliche Restaktivität. Der wasserlösliche, Serin-spezifische Inhibitor Pefabloc führte bei fast allen Kongeneren zu einer vollständigen Inhibierung. Nur TTL[cFP] (36 %) und TTL[mFY] (41 %) wurden nicht gänzlich gehemmt. Die Inaktivierung von Lipasen durch Pefabloc wird durch eine spezifische Modifikation des für den katalytischen Mechanismus aller bekannten Lipasen essentiellen Serin-Restes erreicht.^[151] Umso beachtlicher war es daher, dass zwei der Kongenerere nicht vollständig inhibiert werden konnten. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, das cFP und mFY die Räumliche Struktur des aktiven Zentrums der TTL in einer Art und Weise verändern, das Pefabloc nicht mehr effektiv an den Serin-Rest der katalytischen Triade binden kann.

Demgegenüber beeinflusste der Protease-Inhibitor PMSF, der einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie Pefabloc hat, die Aktivität der Kongenerere kaum. Bei einigen wie TTL[cFP] (142 %) und TTL[mFY] (123 %) wurde sogar eine leichte Aktivitätssteigerung gemessen. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass PMSF

bei dem in dem Assay verwendeten pH-Wert von 8,0 nur eine Halbwertszeit von unter einer Stunde hat.

Die meisten Lipasen enthalten keine freien SH-Gruppen oder S-S-Disulfidbrücken, die eine wichtige Rolle für die katalytische Aktivität spielen. Daher wurde erwartet, dass die Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol, DTT und 2-Iodoacetat keine starken Auswirkungen auf die Aktivität der TTL-Kongeneren haben werden. Dies wurde durch die durchgeführten Messungen auch größtenteils bestätigt. Lediglich TTL[tHP] zeigte eine leichte Aktivierung um 41 % unter dem Einfluss von β -Mercaptoethanol, wogegen TTL[mFY] hier um 81 % deaktiviert wurde. Darüber hinaus konnte nach der Inkubation mit 2-Iodoacetat auch für TTL[tFP] eine schwache Aktivitätssteigerung von 39 % beobachtet werden.

Interessanterweise zeigten die Lipase-Kongeneren eine erstaunlich hohe Stabilität gegenüber 2 M des Denaturierungsmittels Harnstoff (Urea). Zwar wurde die Aktivität der TTL leicht gesenkt (um 10 %), alle anderen Kongeneren wurden dagegen zum Teil bis über 50 % aktiviert (z. B. TTL[cFP] und TTL[mFY]).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der proteinweite Austausch aller Phenylalanine, Proline und Tyrosine in TTL gegen entsprechende, hydroxylierte oder fluorierte nicht-kanonische Aminosäureanaloge zum Teil zu erstaunlichen Effekten bei den erhaltenen TTL-Kongeneren führte. So konnten sowohl die optimale Temperatur und der optimale pH-Wert gehoben oder gesenkt, als auch die Thermostabilität und die Substrat-Spezifität verändert werden. Darüber hinaus zeigten einzelne Kongeneren eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenen organischen Lösungsmitteln, Metallionen, Detergenzien oder Inhibitoren. Dies verdeutlicht das Potenzial der verwendeten *Supplementation Based Incorporation* (SPI) Methode bei der Entwicklung von verbesserten bzw. für spezielle Anwendungen optimierten Enzymen.

4.3.8 Toleranz der TTL-Struktur gegenüber Austausch von Aminosäuren

Das *Engineering* des genetischen Codes beruht auf einer Neuordnung von *Sense Codons*, die meistens an mehreren Stellen in einem Protein vorkommen, was zu einer großen Anzahl von Sequenzmodifikationen führt.^[23] Frühere Arbeiten zeigten aber, dass der Einbau von einfach fluorierten Aminosäuren von

vielen Proteinstrukturen gut toleriert wird.^[13, 27] Zusätzlich zeigten kristallographische Studien, dass der Einbau von oFY und mFY in mehrere Proteine deren 3D-Strukturen nicht störte.^[83] Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass die Struktur der TTL durch die in dieser Studie verwendeten nicht-kanonischen Aminosäuren nicht beeinträchtigt wird. In der Tat zeigten Messungen des Circular dichroismus (CD, für Details siehe 3.3.5), dass die Sekundärstrukturen durch den jeweiligen Austausch nur minimal verändert wurden, d. h. es wurden ausschließlich vernachlässigbare Unterschiede in den CD-Profilen der TTL-Kongeneren im Vergleich zum Ausgangs-Protein detektiert (siehe Abb. 34).

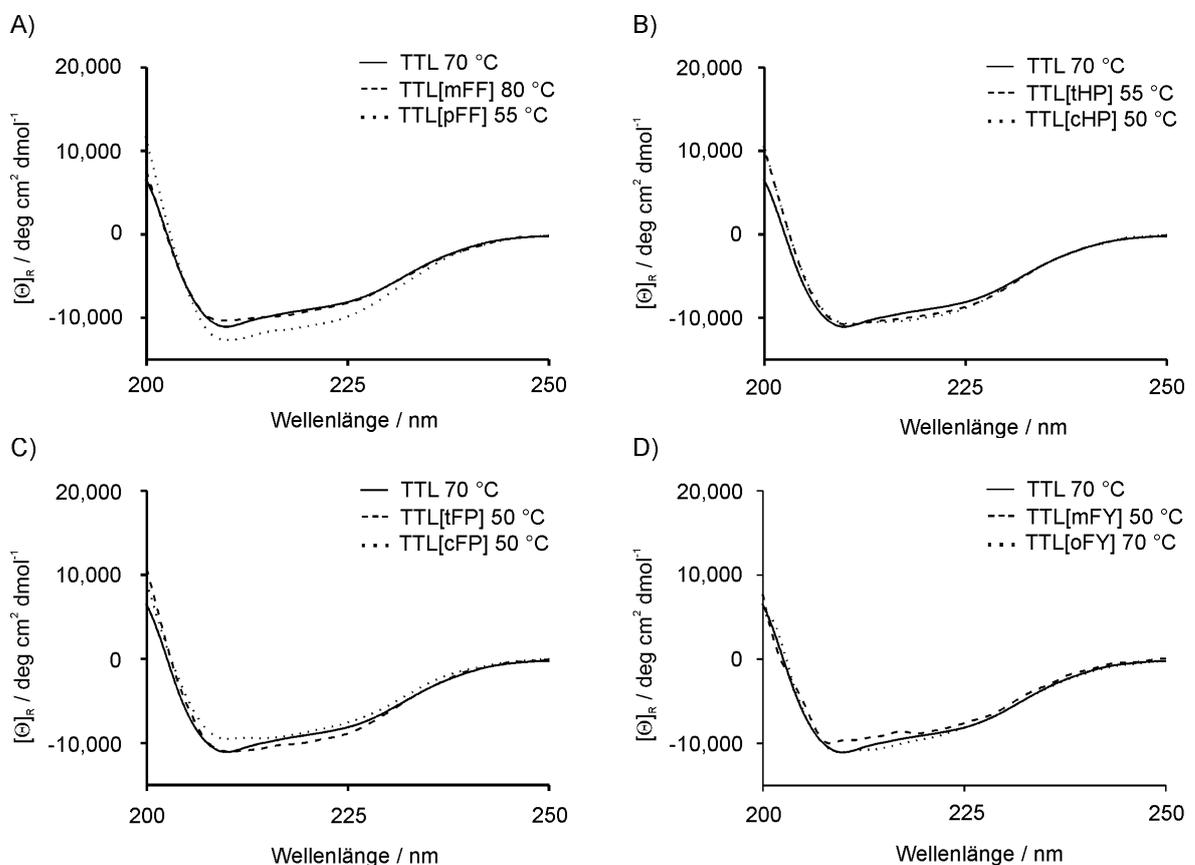


Abb. 34 Circular dichroismus Spektren der TTL und der TTL-Kongeneren.

Die Spektren wurden jeweils bei der optimalen Temperatur des jeweiligen Kongeneres aufgezeichnet. **(A)** TTL, TTL[mFF] und TTL[pFF]; **(B)** TTL, TTL[tHP] und TTL[cHP]; **(C)** TTL, TTL[tFP] und TTL[cFP]; **(D)** TTL, TTL[mFY] und TTL[oFY]

Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die CD-Spektroskopie nur zum Detektieren von maßgeblichen Veränderungen in der Sekundärstruktur eines Proteins geeignet ist und keine Auskunft über mögliche Konformationsänderungen oder Bewegungen von Domänen geben kann. Allerdings deuten die physikalisch-chemischen Eigenschaften der erzeugten Kongeneren daraufhin, dass die eingebauten Aminosäureanaloge lokale

Konformationsänderungen in der Enzym Struktur und damit Unterschiede in T_{opt} , pH_{opt} , und der spezifischen Aktivität ausgelöst haben. Im Allgemeinen ist TTL tolerant gegenüber einer großen Anzahl von Aminosäure-Substitutionen, d. h. ihre Struktur ist plastisch genug um globale Substitutionen, die zu neuartigen Eigenschaften führen, ohne weitreichende strukturelle Veränderungen zu tolerieren.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Welches Potential hat die Stop-Codon-Suppressions Methode (SCS) in Hefe?

Versuche, die in *E. coli* routinemäßig verwendete *Supplementation Based Incorporation* (SPI) Methode zur Erweiterung des genetischen Codes auch auf Hefe zu übertragen gelangen relativ gut. Zwar lagen die Proteinausbeuten, wie es für *S. cerevisiae* auch zu erwarten war, deutlich unter denen für *E. coli*, waren aber immer noch annehmbar. Dagegen betrug die Einbaueffizienz der nicht-kanonischen Aminosäure nur etwa 40 %.^[26]

Auch konnte die Stop-Codon-Suppressions Methode (SCS) zum ortsspezifischen Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren in *E. coli* recht erfolgreich etabliert werden.^[45, 152] Durch stetige Verbesserung und der Entwicklung immer neuer orthogonaler Paare konnte der genetische Code in *E. coli* bis jetzt um mehr als 50 NCAAs erweitert werden.^[48]

Eine Expression von Eukaryotischen Proteinen, die posttranslational modifiziert werden müssen, ist in *E. coli* allerdings nicht möglich. Die Übertragung dieser Methode auf eukaryotische Expressionssysteme war also der nächste logische Schritt.

Motiviert von den vielversprechenden Arbeiten über die Adaption der SCS Methode in *S. cerevisiae*^[37, 62-64], habe ich angestrebt, diese auch in unserem Labor zu etablieren. Allerdings war es nicht möglich den Einbau des Tyr-Analogs AzF, weder mit einem selbst rekonstruierten, noch mit den von P. G. Schultz zu Verfügung gestellten originalen Tandem-Plasmiden für die orthogonalen Paare, zu reproduzieren. Die beiden Analoga PxF und Bpa ließen sich zwar in die hSOD1 einbauen, was auch eindeutig über Immunoblot- und ESI-MS Analyse nachgewiesen werden konnte. Die dabei erhaltenen Proteinmengen waren aber derart gering, dass sie nur wenig über der Nachweisgrenze lagen. Der Einbau von Bpa ist bisher auch der einzige, der von anderen Gruppen unabhängig bestätigt wurde,^[74, 116, 117] in keinem der Fälle wurde jedoch das substituiertere Protein aufgereinigt, so dass keine Aussagen über Ausbeute und Effizienz der Methode getroffen werden können.

Im Falle von AzF wurde vermutet, dass dieses in Hefezellen nicht stabil ist und zu AmF reduziert wird, weshalb die Einbauversuche mit den AzRSs auch mit AmF

wiederholt wurden. Die dabei erhaltenen Ergebnisse deuten zwar darauf hin, dass die entsprechenden TyrRS Mutanten, die eigentlich für AzF spezifisch sein sollten, AmF einbauen. Aufgrund der geringen Massendifferenz von nur 1 Da zwischen AmF und Tyr lässt sich dies aber nicht mit Sicherheit bestätigen.

Überraschend waren auch die Ergebnisse, die bei der Charakterisierung der TyrRS Mutanten mit dem ATP-Pi-Austausch-Assay erhalten wurden. Hier zeigte sich, dass alle für spezielle Tyr-Analoga entwickelten aaRSs nach wie vor Tyr stark aktivieren. Hingegen war in keinem einzigen Fall eine Aktivierung des Analogs messbar.

Dass mit solch schlechten, katalytisch nahezu „inaktiven“ Enzymen kein effizienter Einbau der Analoga möglich ist, liegt auf der Hand. Auch verdeutlicht dies, dass das größte Problem der SCS Methode die Entwicklung von möglichst spezifischen und katalytisch aktiven aaRSs für die NCAs liegt.

Viele kritische Punkte der Methode wurden zwischenzeitlich optimiert. So konnte die Expression des Zielgens durch die Verwendung starker konstitutiver Promotoren und eine Erhöhung der Plasmidzahl in den Hefezellen gesteigert werden. Auch wurde die Expression der Suppressor-tRNA_{CUA} durch verbesserte Promotoren und den Einsatz von drei Kopien des tRNA-Gens hintereinander erhöht.^[37] Das Problem des *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) lässt sich durch die Verwendung von entsprechend defizienten *S. cerevisiae* Stämmen umgehen.^[73] Doch bleibt immer noch die Konkurrenz von *Release* Faktoren und Suppressor-tRNAs, die die Effizienz der Stop-Codon-Suppression beeinträchtigt.

Der Schwerpunkt weiterer Forschungen sollte also auf der Generierung besserer Aminoacyl-tRNA-Synthetasen für die NCAs liegen. Zusammen mit katalytisch aktiveren Enzymen würde die SCS in *S. cerevisiae* viel Potential für Anwendungen sowohl in der Forschung als auch in der Industrie bieten. Bevor diese Hindernisse allerdings nicht überwunden sind, ist eine lohnende Anwendung der Methode in Hefe fraglich.

5.2 Perspektiven für das Design von Biokatalysatoren mit synthetischen Aminosäureanaloga

Die Erzeugung von Sequenzvielfalt im Rahmen der 20 kanonischen Aminosäuren mit Hilfe des klassischen *Protein Engineerings* hat in den letzten Jahrzehnten große Beachtung gefunden. Jedoch kann dieser durch den universellen

genetischen Code festgelegte Satz von Bausteinen nicht die gesamte chemische Variabilität mit ihren potentiellen Vorteilen für die Optimierung der katalytischen Leistung von Enzymen umspannen. Somit stellt die Verwendung von synthetischen, nicht-kanonischen Aminosäuren ein attraktives Werkzeug dar, um Proteine mit neuen und verbesserten Eigenschaften für spezifische Anwendungen herzustellen.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine globale Substitution von kanonischen Aminosäuren gegen verschiedene isostrukturelle Analoga nur zu minimalen strukturellen Störungen, aber zu dramatischen Veränderungen in thermodynamischen^[84, 134] oder spektralen Eigenschaften^[83, 153] führte. In dieser Arbeit wurden jetzt diese Bemühungen weiter ausgebaut, um zu analysieren, inwieweit diese Methode geeignet ist, die enzymatische Aktivität von industriell relevanten Biokatalysatoren positiv zu beeinflussen.

Der proteinweite Austausch von Pro-, Phe- und Tyr-Resten in TTL gegen entsprechende Analoga erlaubte es nicht nur, das Substratspektrum der TTL zu erhöhen, sondern auch ihre katalytische Aktivität zu verbessern. Insbesondere durch den Einbau der beiden Analoga mFF und oFY konnte die T_{opt} des Ausgangsproteins erhalten und gleichzeitig die Enzymaktivität verbessert werden. Mit TTL[mFF] wurde so ein Kongener mit 25 % mehr Aktivität und einer breiteren Substratspezifität erzeugt. Der Einbau weiterer Analoga führte zu einer Absenkung der optimalen Temperatur um bis zu 20 °C, von 70 °C bei der TTL auf 50 °C für TTL[cHP], TTL[tFP], TTL[cFP] und TTL[mFY]. Auch war es möglich den optimalen pH-Wert von TTL von 8,0 um eine Einheit nach oben bzw. unten zu variieren. Des Weiteren konnten Kongenere erzeugt werden, die eine teils erstaunlich hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenen organischen Lösungsmitteln, Metallionen, Detergenzien oder Inhibitoren hatten.

Diese Ergebnisse verdeutlichen das Potential der SPI Methode bei der Erzeugung von Biokatalysatoren mit neuen und verbesserten Eigenschaften. Mit überschaubarem Aufwand lässt sich ein ganzes Set von Enzym-Kongeneren, die eine Vielzahl verschiedener NCAAs enthalten, generieren. Mit entsprechenden Screening-Verfahren können dann die Kongenere identifiziert werden, die für eine spezifische Anwendung am besten geeignet sind. Neue Versuche über den gleichzeitigen Einbau mehrerer verschiedener NCAAs in ein Enzym^[27] werden die Möglichkeiten dieser Methode noch deutlich steigern und das Design von hoch spezifizierten Biokatalysatoren ermöglichen.

6. Anhang

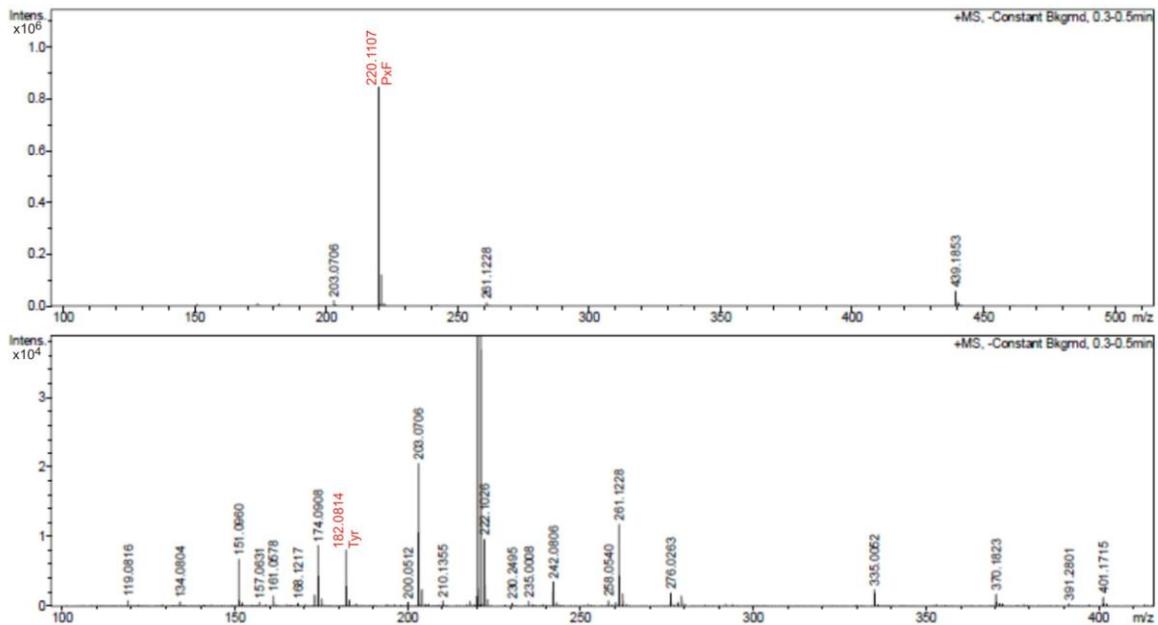


Abb. 35 ESI-MS-Analyse der PxF Präparation.

Neben anderen, nicht identifizierten Verunreinigungen sind 1-2 % Tyr vorhanden, die ihren Ursprung höchst wahrscheinlich in der chemischen Synthese haben.^[64 4]

10	20	30	40	50	60
MQKAVEITYN	GKTLRGMMHL	PDDVKGKVP	VIMFHGFTGN	KVESHFIFVK	MSRALEKVGI
70	80	90	100	110	120
GSVRFDFYGS	GESDGFSEM	TFSSELEDAR	QILKFVKEQP	TTDPERIGLL	GLSMGGAIAI
130	140	150	160	170	180
IVAREYKDEI	KALVLWAPAF	NMPELIMNES	VKQYGAIMEQ	LGFVDIGGHK	LSKDFVEDIS
190	200	210	220	230	240
KLNIFELSKG	YDKKVLIVHG	TNDEAVEYKV	SDRILKEVYG	DNATRVTIEN	ADHTFKSLEW
250	260				
EKKAIEESVE	FFKKELLKGG	SHHHHHH			

Abb. 36 Aminosäuresequenz der TTL.

Das TTL-H6 Fusionskonstrukt, das in dieser Studie verwendet wurde, enthält das GSHHHHHH Motiv am C-Terminus. Dies entspricht dem Hexahistidin-Tag mit einem GS-Linker.

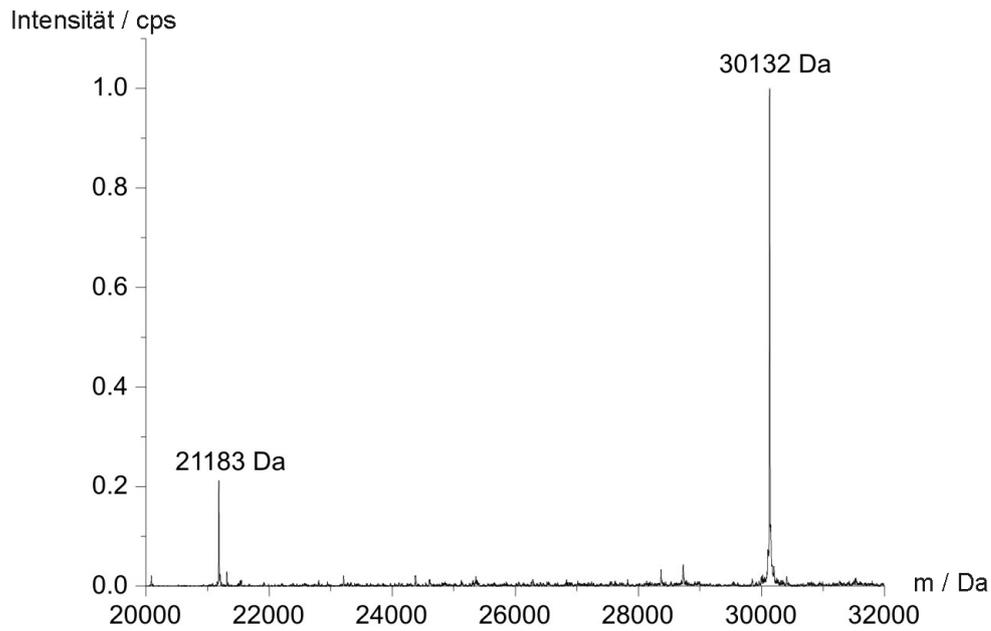


Abb. 37 Massenanalyse der TTL.

Der Peak bei einer Masse von 30132 Da entspricht der TTL. Der kleinere Peak von 21183 Da entspricht einem TTL-Fragment von Aminosäure 81 bis 267, das über hydrophobe Wechselwirkungen am Vollängenprotein haftet und zusammen mit diesem aufgereinigt wurde.

7. Referenzen

- [1] F. H. Crick, *Symp Soc Exp Biol* **1958**, *12*, 138.
- [2] R. Knippers, *Molekulare Genetik*, 9. Auflage ed., Thieme, Stuttgart, **2006**.
- [3] F. H. Crick, *J Mol Biol* **1966**, *19*, 548.
- [4] L. B. Stryer, J. M.; Tymoczko, J. L., *Biochemistry*, 5th edition ed., W H Freeman, New York, **2002**.
- [5] S. H. Kim, J. L. Sussman, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, A. H. J. Wang, N. C. Seeman, A. Rich, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**, *71*, 4970.
- [6] A. Klug, J. D. Robertus, J. E. Ladner, R. S. Brown, J. T. Finch, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**, *71*, 3711.
- [7] P. F. Agris, *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, 223.
- [8] J. Shine, L. Dalgarno, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**, *71*, 1342.
- [9] L. Kisselev, M. Ehrenberg, L. Frolova, *Embo J* **2003**, *22*, 175.
- [10] N. Budisa, *Engineering the Genetic Code - Expanding the Amino Acid Repertoire for the Design of Novel Proteins*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, **2006**.
- [11] B. Wiltschi, N. Budisa, in *Molecular Interactions - Bringing Chemistry to Life: Proceedings of the International Beilstein Workshop* (Eds.: M. G. Hicks, C. Kettner), Beilstein-Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften, May 15th – 19th, Bozen, Italy, **2006**, pp. 93.
- [12] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nature Chemical Biology* **2005**, *1*, 13.
- [13] N. Budisa, *Angewandte Chemie International Edition in English* **2004**, *43*, 6426.
- [14] R. E. Connor, D. A. Tirrell, *Polymer Reviews* **2007**, *47*, 9
- [15] L. Wang, P. G. Schultz, *Angewandte Chemie* **2005**, *117*, 34.
- [16] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org Lett* **2000**, *2*, 1939.
- [17] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org Lett* **2000**, *2*, 2141.
- [18] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41*, 2596.
- [19] N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann, R. Huber, *European Journal of Biochemistry* **1995**, *230*, 788.
- [20] J. Xie, P. G. Schultz, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2006**, *7*, 775.
- [21] D. Gross, H. Tarver, *J Biol Chem* **1955**, *217*, 169.
- [22] G. N. Cohen, R. Munier, *Biochim Biophys Acta* **1956**, *21*, 592.
- [23] C. Minks, S. Alefelder, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9431.
- [24] C. Giese, S. Lepthien, L. Metzner, M. Brandsch, N. Budisa, H. Lilie, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1449.
- [25] M. Rubini, S. Lepthien, R. Golbik, N. Budisa, *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1764*, 1147.
- [26] B. Wiltschi, W. Wenger, S. Nehring, N. Budisa, *Yeast* **2008**, *25*, 775.

- [27] L. Merkel, M. Schauer, G. Antranikian, N. Budisa, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1505.
- [28] N. Budisa, W. Wenger, B. Wiltschi, *Mol Biosyst* **2010**, *6*, 1630.
- [29] S. Benzer, S. P. Champe, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1962**, *48*, 1114.
- [30] A. Garen, O. Siddiqi, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1962**, *48*, 1121.
- [31] J. Normanly, L. G. Kleina, J. M. Masson, J. Abelson, J. H. Miller, *J Mol Biol* **1990**, *213*, 719.
- [32] R. M. Hudziak, F. A. Laski, U. L. RajBhandary, P. A. Sharp, M. R. Capecchi, *Cell* **1982**, *31*, 137.
- [33] H. J. Drabkin, H. J. Park, U. L. RajBhandary, *Mol Cell Biol* **1996**, *16*, 907.
- [34] D. Kim, J. Johnson, *J Biol Chem* **1988**, *263*, 7316.
- [35] J. Kimble, J. Hodgkin, T. Smith, J. Smith, *Nature* **1982**, *299*, 456.
- [36] E. J. Murgola, *Annual Review of Genetics* **1985**, *19*, 57.
- [37] S. Chen, P. G. Schultz, A. Brock, *Journal of Molecular Biology* **2007**, *371*, 112.
- [38] L. Wang, P. G. Schultz, *Chem Commun (Camb)* **2002**, *1*.
- [39] M. A. Rould, J. J. Perona, D. Soll, T. A. Steitz, *Science* **1989**, *246*, 1135.
- [40] D. R. Liu, T. J. Magliery, M. Pastrnak, P. G. Schultz, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 10092.
- [41] D. R. Liu, T. J. Magliery, P. G. Schultz, *Chem Biol* **1997**, *4*, 685.
- [42] D. R. Liu, P. G. Schultz, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 4780.
- [43] R. Furter, *Protein Sci* **1998**, *7*, 419.
- [44] L. Wang, T. J. Magliery, D. R. Liu, P. G. Schultz, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 5010.
- [45] L. Wang, P. G. Schultz, *Chem Biol* **2001**, *8*, 883.
- [46] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498.
- [47] S. W. Santoro, L. Wang, B. Herberich, D. S. King, P. G. Schultz, *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 1044.
- [48] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu Rev Biochem* **2010**, *79*, 413.
- [49] J. A. Krzycki, *Curr Opin Microbiol* **2005**, *8*, 706.
- [50] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, *296*, 1459.
- [51] G. Galli, H. Hofstetter, M. L. Birnstiel, *Nature* **1981**, *294*, 626.
- [52] K. Sakamoto, A. Hayashi, A. Sakamoto, D. Kiga, H. Nakayama, A. Soma, T. Kobayashi, M. Kitabatake, K. Takio, K. Saito, M. Shirouzu, I. Hirao, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, 4692.
- [53] F. Li, Y. Xiong, J. Wang, H. D. Cho, K. Tomita, A. M. Weiner, T. A. Steitz, *Cell* **2002**, *111*, 815.
- [54] M. P. Deutscher, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **1990**, *39*, 209.
- [55] S. L. Wolin, A. G. Matera, *Genes Dev* **1999**, *13*, 1.
- [56] G. J. Arts, S. Kuersten, P. Romby, B. Ehresmann, I. W. Mattaj, *Embo J* **1998**, *17*, 7430.
- [57] H. Edwards, P. Schimmel, *Molecular and Cellular Biology* **1990**, *10*, 1633.
- [58] H. Edwards, V. Trezeguet, P. Schimmel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88*, 1153.

- [59] T. Mukai, T. Kobayashi, N. Hino, T. Yanagisawa, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *371*, 818.
- [60] N. Wu, A. Deiters, T. A. Cropp, D. King, P. G. Schultz, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 14306.
- [61] A. K. Kowal, C. Kohrer, U. L. RajBhandary, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 2268.
- [62] J. W. Chin, T. A. Cropp, S. Chu, E. Meggers, P. G. Schultz, *Chemistry & Biology* **2003**, *10*, 511.
- [63] J. W. Chin, T. A. Cropp, J. C. Anderson, M. Mukherji, Z. Zhang, P. G. Schultz, *Science* **2003**, *301*, 964.
- [64] A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11782.
- [65] H. S. Lee, J. Guo, E. A. Lemke, R. D. Dimla, P. G. Schultz, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 12921.
- [66] E. Brustad, M. L. Bushey, A. Brock, J. Chittuluru, P. G. Schultz, *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 6004.
- [67] E. A. Lemke, D. Summerer, B. H. Geierstanger, S. M. Brittain, P. G. Schultz, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 769.
- [68] D. Summerer, S. Chen, N. Wu, A. Deiters, J. W. Chin, P. G. Schultz, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 9785.
- [69] E. M. Tippmann, P. G. Schultz, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6182.
- [70] T. S. Young, I. Ahmad, A. Brock, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2009**, *48*, 2643.
- [71] K. Wang, H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat Biotechnol* **2007**, *25*, 770.
- [72] P. H. Byers, *The Journal of Clinical Investigation* **2002**, *109*, 3.
- [73] Q. Wang, L. Wang, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 6066.
- [74] H. T. Chen, L. Warfield, S. Hahn, *Nat Struct Mol Biol* **2007**, *14*, 696.
- [75] W. L. Tang, H. Zhao, *Biotechnol J* **2009**, *4*, 1725.
- [76] W. Soetaert, E. Vandamme, *Biotechnol J* **2006**, *1*, 756.
- [77] G. Antranikian, *Angewandte Mikrobiologie*, 1. Auflage ed., Springer, Berlin, **2005**.
- [78] R. J. Fox, G. W. Huisman, *Trends in Biotechnology* **2008**, *26*, 132.
- [79] S. J. Benkovic, S. Hammes-Schiffer, *Science* **2003**, *301*, 1196.
- [80] E. T. Farinas, T. Bulter, F. H. Arnold, *Current Opinion in Biotechnology* **2001**, *12*, 545.
- [81] F. H. Arnold, *Nature* **2001**, *409*, 253.
- [82] C. Minks, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10649.
- [83] P. P. Pal, J. H. Bae, M. K. Azim, P. Hess, R. Friedrich, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3663.
- [84] N. Budisa, R. Huber, R. Golbik, C. Minks, E. Weyher, L. Moroder, *European Journal of Biochemistry* **1998**, *253*, 1.
- [85] C. B. Anfinsen, L. G. Corley, *Journal of Biological Chemistry* **1969**, *244*, 5149.
- [86] B. Brooks, R. S. Phillips, W. F. Benisek, *Biochemistry* **1998**, *37*, 9738.

- [87] P. C. Cirino, Y. Tang, K. Takahashi, D. A. Tirrell, F. H. Arnold, *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, *83*, 729.
- [88] F. Naider, J. Yariv, Z. Bohak, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3202.
- [89] M. Ring, R. E. Huber, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1990**, *283*, 342.
- [90] F. Bordusa, *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 4817.
- [91] A. Zaks, A. M. Klibanov, *Science* **1984**, *224*, 1249.
- [92] M. T. Reetz, *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 145.
- [93] K. E. Jaeger, T. Eggert, *Curr Opin Biotechnol* **2002**, *13*, 390.
- [94] A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, *Appl Biochem Biotechnol* **2004**, *118*, 155.
- [95] K. E. Jaeger, S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. Vanheuvel, O. Misset, *Fems Microbiology Reviews* **1994**, *15*, 29.
- [96] R. Verger, G. H. Dehaas, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **1976**, *5*, 77.
- [97] P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, M. E. Leser, R. Miller, *Adv Colloid Interface Sci* **2009**, *147-148*, 237.
- [98] J. D. Schrag, M. Cygler, *Lipases, Part A* **1997**, *284*, 85.
- [99] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, et al., *Protein Eng* **1992**, *5*, 197.
- [100] A. M. Brzozowski, U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Hugejensen, S. A. Patkar, L. Thim, *Nature* **1991**, *351*, 491.
- [101] A. Svendsen, *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, *1543*, 223.
- [102] L. Sarda, P. Desnuelle, *Biochim Biophys Acta* **1958**, *30*, 513.
- [103] K. E. Jaeger, S. Ransac, H. B. Koch, F. Ferrato, B. W. Dijkstra, *FEBS Lett* **1993**, *332*, 143.
- [104] P. Rathi, S. Bradoo, R. K. Saxena, R. Gupta, *Biotechnology Letters* **2000**, *22*, 495.
- [105] M. E. M. Noble, A. Cleasby, L. N. Johnson, M. R. Egmond, L. G. J. Frenken, *FEBS Letters* **1993**, *331*, 123.
- [106] J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *Structure* **1994**, *2*, 293.
- [107] F. Lawrence, B. Sylvain, P. Maryse, R.-G. Malka, W. Jean-Pierre, *European Journal of Biochemistry* **1973**, *36*, 234.
- [108] U. K. Winkler, M. Stuckmann, *Journal of Bacteriology* **1979**, *138*, 663.
- [109] C. Schmidt-Dannert, H. Sztajer, W. Stocklein, U. Menge, R. D. Schmid, *Biochimica et Biophysica Acta* **1994**, *1214*, 43.
- [110] J. Soding, A. Biegert, A. N. Lupas, *Nucleic Acids Research* **2005**, *33*, W244.
- [111] D. C. Goldstone, S. G. Villas-Boas, M. Till, W. J. Kelly, G. T. Attwood, V. L. Arcus, *Proteins* **2010**, *78*, 1457.
- [112] A. L. Kiss, B. Hornung, K. Radi, Z. Gengeliczki, B. Sztaray, T. Juhasz, Z. Szeltner, V. Harmat, L. Polgar, *Journal of Molecular Biology* **2007**, *368*, 509.

- [113] T. Bertrand, F. Auge, J. Houtmann, A. Rak, F. Vallee, V. Mikol, P. F. Berne, N. Michot, D. Cheuret, C. Hoornaert, M. Mathieu, *Journal of Molecular Biology* **2010**, 396, 663.
- [114] N. Eswar, B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Y. Shen, U. Pieper, A. Sali, *Current Protocols in Bioinformatics* **2006**, Chapter 5, Unit 5 6.
- [115] A. Deiters, T. A. Cropp, J. W. Chin, C. Anderson, P. G. Schultz, **2006**, Unnatural reactive amino acid genetic code additions, USA, US Patent 2006/0246509 A1.
- [116] L. Y. Huang, G. Umanah, M. Hauser, C. Son, B. Arshava, F. Naider, J. M. Becker, *Biochemistry* **2008**, 47, 5638.
- [117] N. Mohibullah, S. Hahn, *Genes Dev* **2008**, 22, 2994.
- [118] D. S. Allison, S. H. Goh, B. D. Hall, *Cell* **1983**, 34, 655.
- [119] W. Liu, A. Brock, S. Chen, S. Chen, P. G. Schultz, *Nat Methods* **2007**, 4, 239.
- [120] A. Kamal, Y. Damayanthi, B. S. Narayan Reddy, L. B., B. S. Praveen Reddy, *Chemical Communications (Cambridge, England)* **1997**, 11, 1015.
- [121] J. W. Back, O. David, G. Kramer, G. Masson, P. T. Kasper, L. J. de Koning, L. de Jong, J. H. van Maarseveen, C. G. de Koster, *Angewandte Chemie International Edition in English* **2005**, 44, 7946.
- [122] H. E. Parge, R. A. Hallewell, J. A. Tainer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89, 6109.
- [123] J. J. Lichty, J. L. Malecki, H. D. Agnew, D. J. Michelson-Horowitz, S. Tan, *Protein Expr Purif* **2005**, 41, 98.
- [124] M. A. Romanos, C. A. Scorer, J. J. Clare, *Yeast* **1992**, 8, 423.
- [125] R. A. Hallewell, R. Mills, P. Tekamp-Olson, R. Blacher, S. Rosenberg, F. Otting, F. R. Masiarz, C. J. Scandella, *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **1987**, 5, 363.
- [126] M. J. Lindberg, J. Normark, A. Holmgren, M. Oliveberg, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, 15893.
- [127] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Inc., **1996**.
- [128] C. S. Francklyn, E. A. First, J. J. Perona, Y.-M. Hou, *Methods* **2008**, 44, 100.
- [129] B. Wiltschi, L. Merkel, N. Budisa, *Chembiochem* **2009**, 10, 217.
- [130] N. Sharma, R. Furter, P. Kast, D. A. Tirrell, *FEBS Lett* **2000**, 467, 37.
- [131] M. Royter, M. Schmidt, C. Elend, H. Hobenreich, T. Schafer, U. T. Bornscheuer, G. Antranikian, *Extremophiles* **2009**, 13, 769.
- [132] M. Salameh, J. Wiegel, *Advances in Applied Microbiology* **2007**, 61, 253.
- [133] C. Renner, S. Alefelder, J. H. Bae, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder, *Angewandte Chemie International Edition in English* **2001**, 40, 923.
- [134] T. Steiner, P. Hess, J. H. Bae, B. Wiltschi, L. Moroder, N. Budisa, *PLoS One* **2008**, 3, Article No.: e1680.
- [135] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Research* **2000**, 28, 235.

- [136] P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, M. Cygler, *Protein Science* **1994**, *3*, 82.
- [137] A. H. Andreotti, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9515.
- [138] C. Dugave, L. Demange, *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 2475.
- [139] J. Yang, Y. Koga, H. Nakano, T. Yamane, *Protein Engineering* **2002**, *15*, 147.
- [140] P. D. de Maria, J. M. Sanchez-Montero, J. V. Sinisterra, A. R. Alcantara, *Biotechnology Advances* **2006**, *24*, 180.
- [141] P. Fojan, P. H. Jonson, M. T. N. Petersen, S. B. Petersen, *Biochimie* **2000**, *82*, 1033.
- [142] A. A. Karkhane, B. Yakhchali, F. R. Jazii, B. Bambai, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, *61*, 162.
- [143] N. A. Turner, E. C. Needs, J. A. Khan, E. N. Vulfson, *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, *72*, 108.
- [144] J. H. Bae, P. P. Pal, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *Chembiochem* **2004**, *5*, 720.
- [145] F. Theil, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2905.
- [146] T. Okamoto, E. Yasuhito, S. Ueji, *Org Biomol Chem* **2006**, *4*, 1147.
- [147] A. E. Finkelstein, E. S. Strawich, S. Sonnino, *Biochim Biophys Acta* **1970**, *206*, 380.
- [148] K. S. Freeman, T. T. Tang, R. D. E. Shah, D. J. Kiserow, L. B. McGown, *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 9312.
- [149] Z. Mozaffar, J. Weete, R. Dute, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1994**, *71*, 75.
- [150] J. Zhang, S. Lin, R. Zeng, *J Microbiol Biotechnol* **2007**, *17*, 604.
- [151] K. H. Nam, S.-J. Kim, A. Priyadarshi, H. S. Kim, K. Y. Hwang, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, *389*, 247.
- [152] J. W. Chin, S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 9026.
- [153] J. H. Bae, M. Rubini, G. Jung, G. Wiegand, M. H. J. Seifert, M. K. Azim, J. S. Kim, A. Zumbusch, T. A. Holak, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *Journal of Molecular Biology* **2003**, *328*, 1071.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Darstellung des genetischen Codes (RNA-Format).....	2
Abb. 2 Struktur der tRNA.	4
Abb. 3: Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren durch Stop-Codon Suppression. ^[11]	12
Abb. 4 Selektionsschema für NCAA-spezifische aaRS Mutanten in <i>S. cerevisiae</i> . 14	
Abb. 5 Lipase Reaktion.	18
Abb. 6 Modell der Lipase Kinetik.	20
Abb. 7 Mechanismus der Lipase-Katalyse.....	21
Abb. 8 Strukturelle Merkmale von Lipasen.	22
Abb. 9 Strukturen von Tyrosin und dessen Analoga, die in dieser Studie verwendet wurden.	58
Abb. 10 Schematische Darstellung des Tandem-Expressionsvektors für <i>E. coli</i> TyrRS und Amber-Suppressor-tRNA _{CUA}	62
Abb. 11 DNA- und Protein-Sequenz Alignment von TyrRS und ihren Mutanten. .	63
Abb. 12 Der hSOD1 Expressionsvektor.	65
Abb. 13 DNA- und Protein-Sequenz der codierenden Sequenz für hSOD1(W33TAG) mit einem N-terminalen Strep-Tag II.	65
Abb. 14 In vivo Einbau von Tyr und dessen Analoga.....	67
Abb. 15 ESI-MS-Spektren der auf dem Immunoblot in Abb. 14 detektierten hSOD1 Varianten.	71
Abb. 16 Intrazelluläre Expression der TyrRS Mutanten von verschiedenen orthogonalen Paaren.	73
Abb. 17 SDS-Page der gereinigten <i>E. coli</i> Wildtyp TyrRS und der TyrRS Mutanten.	75
Abb. 18 ESI-MS-Spektren von <i>E. coli</i> Wildtyp TyrRS und den aaRS Mutanten, die in Abb. 17 und Tabelle 5 dargestellt sind.	77
Abb. 19 ATP-PPi Aktivierungs Assay von TyrRS mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tyr.	78
Abb. 20 Aktivierung von Tyr, AzF und AmF durch TyrRS und die AzRSs.	79
Abb. 21 Aktivierung von Tyr, Bpa, AzF und AmF durch BpaRS.	79
Abb. 22 Aktivierung von Tyr, AzF und AmF bei niedrigen Konzentrationen durch die AzRSs.	81
Abb. 23 Aktivierung von verschiedenen Aminosäuren und deren Analoga durch <i>E. coli</i> PheRS (Gly294Phe) ^[130]	83
Abb. 24 Strukturen und Molekulargewichte der verwendeten Analoga von Phenylalanin, Prolin und Tyrosin, sowie der entsprechenden kanonischen Aminosäuren.	85
Abb. 25 Homologie-Modell der TTL mit hervorgehobenen Seitenketten der zu substituierenden Aminosäuren.....	86

Abb. 26 Gereinigte TTL-Kongenere, 12 % SDS-Page.....	88
Abb. 27 ESI-MS-Analyse der Lipase-Kongenere.	91
Abb. 28 Einfluss der Temperatur auf die enzymatische Aktivität der verschiedenen TTL-Kongenere.	94
Abb. 29 Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische Aktivität der verschiedenen TTL-Kongenere.	96
Abb. 30 Enzymatische Aktivität der TTL-Kongenere nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen für 180 min.	99
Abb. 31 Effekte der thermischen Aktivierung auf die enzymatische Aktivität der TTL und ihrer Kongenere.....	101
Abb. 32 Bevorzugte Acyl-Seitenkettenlänge von TTL und TTL[mFF].....	103
Abb. 33 Strukturen der verwendeten Detergenzien.	111
Abb. 34 Circular dichroismus Spektren der TTL und der TTL-Kongenere.	115
Abb. 35 ESI-MS-Analyse der PxF Präparation.....	120
Abb. 36 Aminosäuresequenz der TTL.	120
Abb. 37 Massenanalyse der TTL.	121

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen der DNA-Primer	25
Tabelle 2: Bestandteile der verwendeten Polyacrylamidgele (für 2 Gele):	51
Tabelle 3: Details der orthogonalen Paare, die für den <i>in vivo</i> Einbau von Tyr-Analoga in hSOD1(W33TAG) eingesetzt wurden.....	59
Tabelle 4: ESI-MS-Analysen der auf dem Immunoblot in Abb. 14 detektierten hSOD1 Varianten.	69
Tabelle 5: Massen Analyse von <i>E. coli</i> Wildtyp TyrRS und den aaRSs Mutanten.....	76
Tabelle 6: Ausbeute der Lipase Varianten.....	89
Tabelle 7: Totale Einbau Effizienz (TEE) und Anzahl der maximal ausgetauschten Aminosäure (AS) Reste.....	89
Tabelle 8: Thermische Aktivierung der Lipase-Kongenere.....	100
Tabelle 9: Farbskala der Lipase-Aktivitäten nach Einfluss von Additiven, als Prozentwert der Aktivität des Kongeneres ohne Einwirkung eines Additivs.....	105
Tabelle 10: Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Aktivität der TTL-Kongenere.	106
Tabelle 11: Einfluss von Metallionen auf die Aktivität der TTL-Kongenere.	108
Tabelle 12: Einfluss von Detergenzien auf die Aktivität der TTL-Kongenere.	110
Tabelle 13: Einfluss von Inhibitoren auf die Aktivität der TTL-Kongenere.....	113