

5. Einleitung

5.1. Protein Engineering

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

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

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

5.2. Rationales Proteindesign

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

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

5.3. Evolutionäres Proteindesign

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

5.4. „You get what you screen for“

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

5.5. Zufallsmutagenese

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

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

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

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

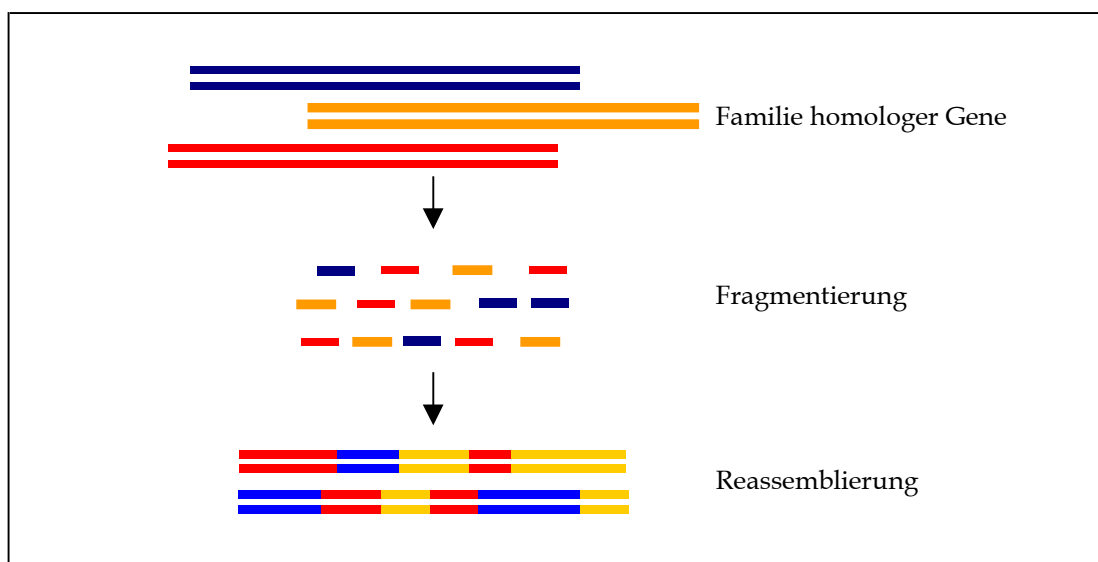


Abbildung 1 DNA-Shuffling

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

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

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

5.7. Die Vorteile der Mutagenese mittels homologer Rekombination

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

5.7.1. Besonders leistungsstark: *Family DNA Shuffling*

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

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

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

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

5.8. Homologie-unabhängige Rekombination

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

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

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

5.9. Die konservative Natur des genetischen Codes

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

5.10. Beispiele für die Optimierung mittels gerichteter Evolution

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

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

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

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

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

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

5.11. Entwicklung neuer Technologien

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

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

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

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

5.12.1. DNA-*Shuffling*

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

5.12.2. *Random Priming* Rekombination

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

5.12.3. *Staggered Extension Process*

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

5.12.4. Heteroduplex Rekombination

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

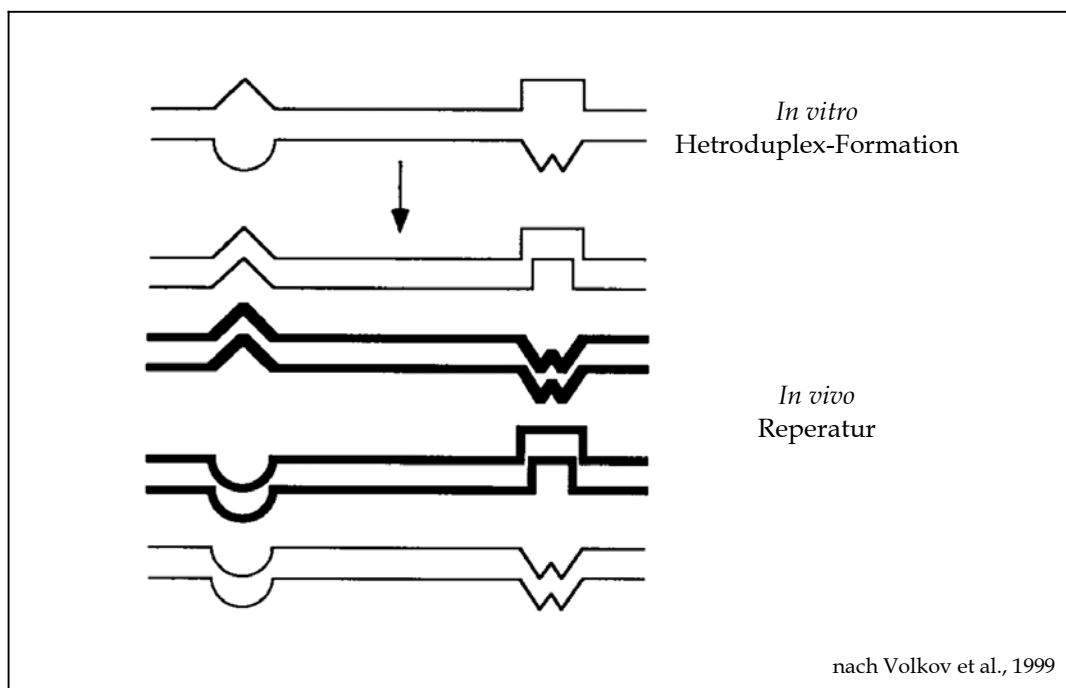


Abbildung 2 Heteroduplex Rekombination

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

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

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

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

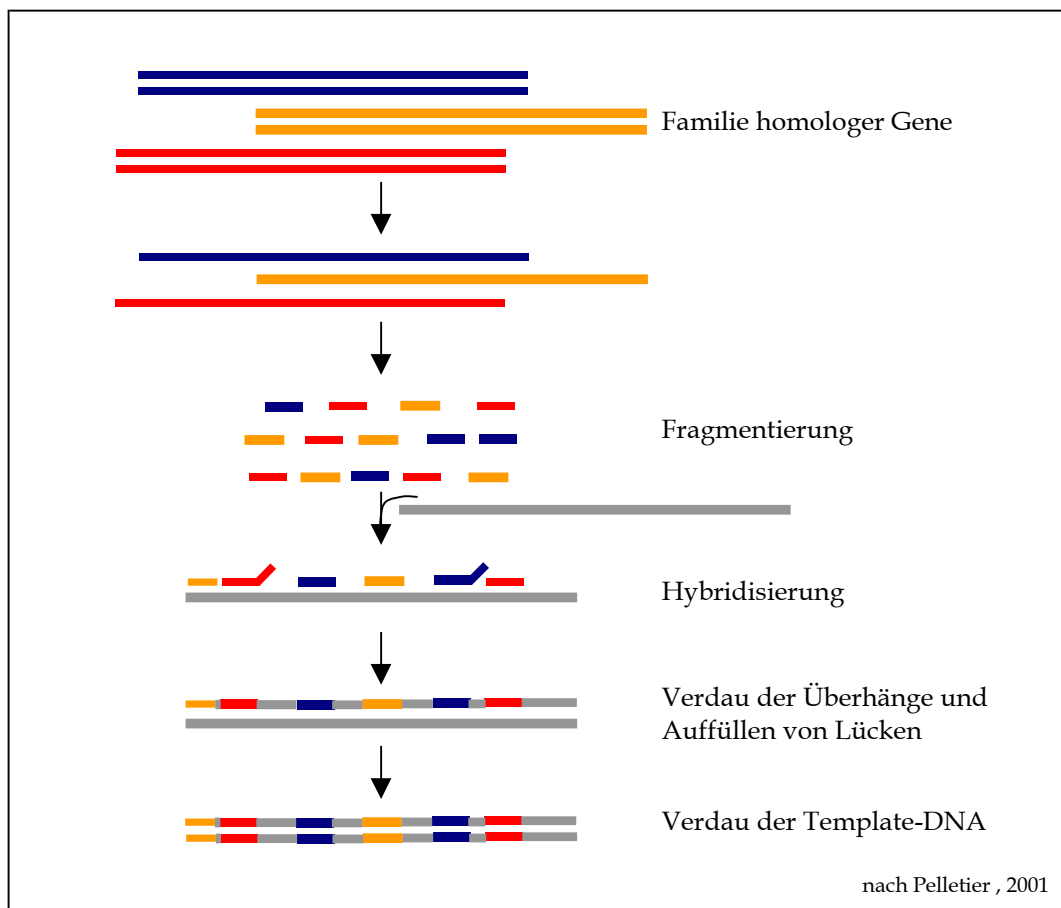


Abbildung 3

RACHITT

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

5.13. Begrenzungen der Methoden und Bedarf neuer Technologien

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

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

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

5.14. Ziel der Arbeit (1)

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

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

5.15. Creatinase aus *Erwinia* sp.

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

5.16. Creatininbestimmung

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

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

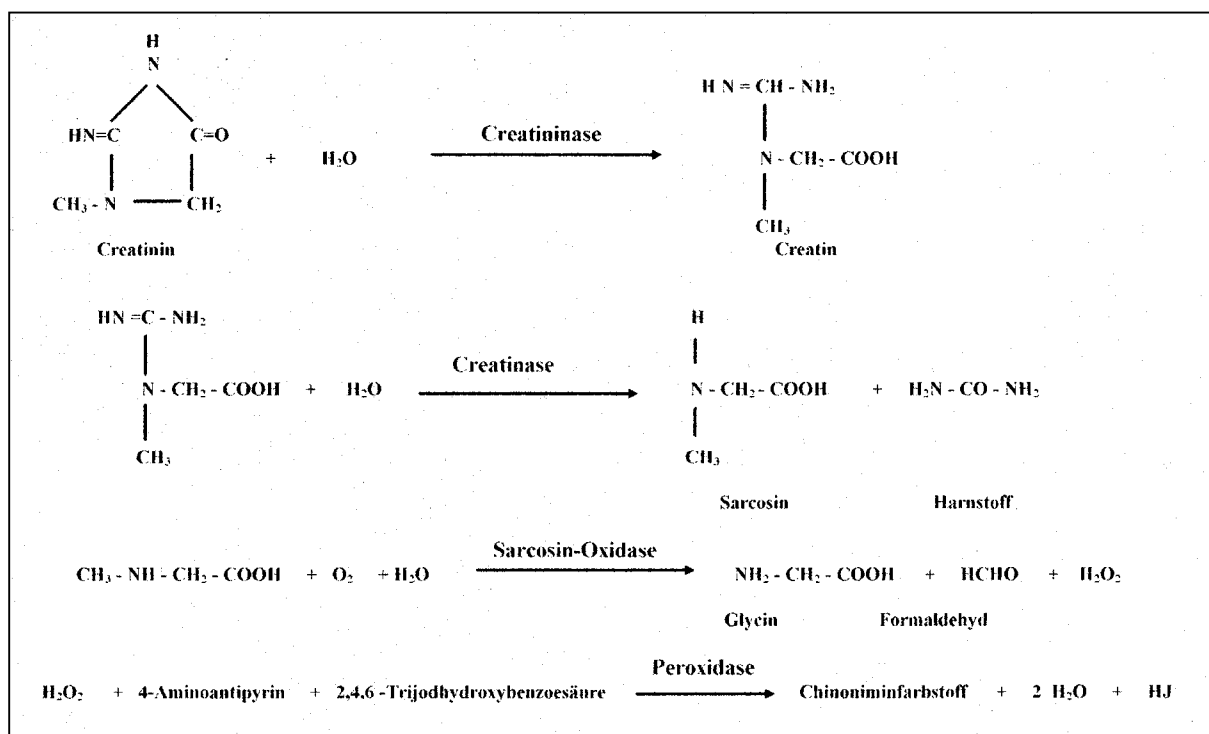


Abbildung 4 Creatininbestimmung

5.17. Bisher bekannte Creatinasen

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

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

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

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

5.18. Stabilität von Proteinen

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

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

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

5.19. Gerichtete Evolution von thermostabilen Proteinen

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

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

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

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

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

5.20. Ziel der Arbeit (2)

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