

Abschlussbericht



Einsatz von Amidasen aus extremophilen Mikroorganismen für die enantioselektive Synthese von Amino- und Carbonsäuren

AZ 13107

Projektkoordinator: Prof. Dr. Dr. h.c. Garabed Antranikian, Institut für Technische Mikrobiologie, TU Hamburg-Harburg

Projektbearbeiter: Dr. Ksenia Egorova

Projektpartner: X-Zyme GmbH, Düsseldorf

Projektbearbeiter: Dr. Shukrallah Na'amnieh

DEGUSSA AG, Hanau

Projektbearbeiter: Dr. Steffen Osswald

Laufzeit: 2 Jahre (2004-2005)



Hamburg, Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|---|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 3 |
| 1. ZUSAMMENFASSUNG | 4 |
| 2. ANLASS UND ZIELSETZUNG DES PROJEKTES | 5 |
| 2.1. INDUSTRIELLE BEDEUTUNG VON AMIDASEN | 5 |
| 2.2. BISLANG BESCHRIEBENE AMIDASEN | 6 |
| 3. VERWENDETE METHODEN | 8 |
| 4. ERGEBNISSE | 9 |
| 4.1. REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON NATIVEN AMIDASEN AUS EXTREMOPHILEN MIKROORGANISMEN | 9 |
| Native Amidasen aus <i>Thermocrispum municipale 4K</i> und <i>Pseudonocardia thermophila</i> | 9 |
| 4.2. KLONIERUNG AMIDASE-KODIERENDER GENE | 15 |
| Klonierung der Amidase aus <i>Pseudonocardia thermophila</i> | 15 |
| Klonierung der Amidase aus <i>Thermocrispum municipale 4K</i> | 18 |
| Datenbankscreening und Klonierung von Amidasen aus verschiedenen extremophilen Mikroorganismen | 18 |
| Klonierung der Amidase aus <i>Anaerobranca gottschalkii</i> | 20 |
| 4.3. EXPRESSION DER REKOMBINANTEN AMIDASE AUS <i>A. GOTTSCHALKII</i> (REC-AMIDASE) IN <i>E. COLI</i> | 22 |
| Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) | 22 |
| Konstruktion von Colour-Tag-Fusionsproteinen | 24 |
| Fusion der Amidase mit dem colour-tag Protein C30 | Fehler! Textmarke nicht definiert. |
| Expression von recAmiKA1 und recAmiKA2 | 28 |
| 5. DISKUSSION | 31 |
| 7. KOOPERATION INNERHALB DES PROJEKTS | 32 |
| 8. VERÖFFENTLICHUNGEN | 32 |
| 9. PRÄSENTATIONEN | 33 |



Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------------------|---|----|
| Abbildung 1: | Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Amidasen..... | 5 |
| Abbildung 2: | Aufreinigung der Amidase aus <i>Thermocrispum municipale</i> 4K..... | 10 |
| Abbildung 3: | Aufreinigung der Amidase aus <i>Pseudonocardia thermophila</i> | 11 |
| Abbildung 4: | Einfluss von Temperatur (A) und pH (B) auf die enzymatische Aktivität und Stabilität (C) der Amidasen aus thermophilen Aktinomyzeten..... | 12 |
| Abbildung 5: | Substratspektrum der Amidase aus <i>Thermocrispum municipale</i> 4K (Acyltransferaseaktivität)..... | 15 |
| Abbildung 6: | Die Nukleotidsequenz des Amidasegens aus <i>Pseudonocardia thermophila</i> | 17 |
| Abbildung 7: | Expression der putativen Amidasen aus Archaea..... | 19 |
| Abbildung 8: | Multiple Cloning Site (MCS) der rekombinanten Amidase aus <i>A. gottschalkii</i> (Rec-Amidase) Expressionsplasmide..... | 21 |
| Abbildung 9: | Klonierungsstrategie zur Herstellung von Rec-Amidase-Expressionsplasmiden..... | 22 |
| Abbildung 10: | Wachstum des Rec-Amidase-Expressionsstamms gegenüber einem Kontrollstamm mit Leervektor..... | 23 |
| Abbildung 11: | SDS-PAGE Analyse der recAmidase Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3)..... | 23 |
| Abbildung 12: | Der Expressionsvektor mit CTP und 6-His-tag CTP..... | 24 |
| Abbildung 13: | Expressionsplasmide für recAmidase-CTP Fusionen..... | 25 |
| Abbildung 14: | Expression der recAmidase-CTP Fusion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen..... | 26 |
| Abbildung 15: | Löslichkeit der recAmiCTP Fusion in Abhängigkeit von der IPTG Konzentration..... | 27 |
| Abbildung 16: | Expression von N- und C-terminalen recAmidase-C30 Fusionen..... | 28 |
| Abbildung 17: | Expression der recAmidase mit Plasmiden pKA1 und pKA2..... | 29 |
| Abbildung 18: | Reinigung der rekombinanten Amidase mittels Ni-Affinitätschromatographie..... | 30 |
| Abbildung 19: | Proteineluat mit Amidase (AmiKA2) nach Ni-Affinitätschromatographie..... | 31 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|--|----|
| Tabelle 1: | Beschriebene Amidasen aus meso- und thermophilen Organismen..... | 7 |
| Tabelle 2: | Reinigung der nativen Amidasen aus <i>Pseudonocardia thermophila</i> und <i>Thermocrispum municipale</i> 4K..... | 9 |
| Tabelle 3: | Einfluss verschiedener Reagenzien und Metallionen auf die enzymatische Aktivität thermoaktiver Amidasen..... | 13 |
| Tabelle 4: | Substratspektrum der beiden untersuchten thermoaktiven Amidasen..... | 14 |
| Tabelle 5: | Sequenzen des N-Terminus des Proteins und interner Peptide..... | 16 |
| Tabelle 6: | Putative Amidasen (GenBank NCBI)..... | 19 |
| Tabelle 7: | Verwendete <i>E. coli</i> Expressionssysteme..... | 20 |



1. Zusammenfassung

Biokatalysatoren werden in Zukunft eine Schlüsselrolle bei der Herstellung hoch wertschöpfender Verbindungen für die chemische und pharmazeutische Industrie spielen. Insbesondere bei der Synthese chiraler Verbindungen haben Biokatalysatoren ein großes Potenzial. Im Sinne einer integrierten Produktionsweise ist daher die enzymatische Synthese von enantiomerenreinen Wirkstoffen von Vorteil, weil nur so die kostenintensive Enantiomerentrennung vermieden und eine nahezu 100%ige Produktausbeute gewährleistet werden kann. Ziel des vorliegenden Vorhabens war die umweltfreundliche Gewinnung von Amino- und Carbonsäuren aus Amidinen durch den Einsatz von neuentdeckten Amidasen aus extremophilen Mikroorganismen. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Amidasen zeichnen sich die Enzyme aus extremophilen Mikroorganismen durch eine hohe Stabilität gegenüber hohen Temperaturen und anderen denaturierenden Einflüssen aus. Darüber hinaus verfügen die neuentdeckten Amidasen über breite pH-Spektren, die insbesondere auch den sauren und neutralen Bereich abdecken.

Im Rahmen des Projekts wurden zwei Amidasen aus thermophilen Actinomyceten aufgereinigt und vollständig charakterisiert. Die Enzyme aus *Thermocrispum municipale* 4K und *Pseudonocardia thermophila* zeichnen sich durch hohe Thermoaktivität und -stabilität aus und verfügen über ein breites Substratspektrum. Diese Eigenschaften machen sie interessant für eine industrielle Anwendung. Im Rahmen der molekularbiologischen Arbeiten in diesem Projekt konnte die Gensequenz der Amidase aus *Pseudonocardia thermophila* aufgeklärt werden. Darüber hinaus wurden weitere Amidasegene aus extremophilen Mikroorganismen kloniert und in mesophilen Wirtszellen exprimiert.



2. Anlass und Zielsetzung des Projektes

Amidasen (EC 3.5.1.4) katalysieren die Hydrolyse von Amiden zu freien Carbonsäuren und Ammonium nach dem in Abb. 1 angegebenen Schema.

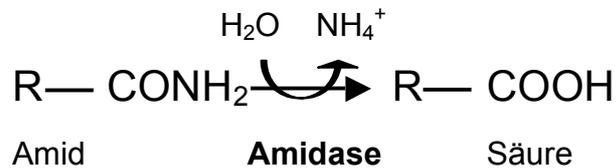


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Amidasen.

Diese Reaktion spielt eine wichtige Rolle im Stickstoffmetabolismus von Pro- und Eukaryonten und ist auch für biotechnologische Verfahren von zunehmender Bedeutung. Mit Hilfe von Amidasen werden Amide stereospezifisch umgesetzt, sodass zu nahezu 100 Prozent die gewünschte chirale Amino- bzw. Carbonsäure hergestellt wird.

2.1. Industrielle Bedeutung von Amidasen

Organische Carbonsäuren, inklusive Aminosäuren, sind essentielle End- und Zwischenprodukte in der Fein- und Spezialchemie. Aufgrund ökologischer Aspekte stellt die biotechnologische Produktion dieser Substanzklasse eine sehr günstige Alternative zu klassisch-chemischen Verfahren dar. Ein immer wichtigerer Aspekt für die Fein- und Spezialchemie ist die Erzeugung chiraler Substanzen. Schwerpunkte bilden hierbei Amidase-katalysierte Verfahren, da Amidasen enantioselektiver sind als die vorgeschalteten Nitrilhydratasen. Für die Synthese chiraler Säuren durch enantioselektive enzymatische Verseifung von Nitrilen gibt es bereits Beispiele. So ist die Produktion von enantiomerenreiner 2,2-Dimethylcyclopropanecarbonsäure (Lonza, 1 Tonne/Jahr), einem Schlüsselintermediat für den Dehydropeptidase-Inhibitor Cilastatin, oder von enantiomerenreiner Piperazine-2-carbonsäure (mehrere kg/Jahr) durch eine Amidase aus *Klebsiella terrigena* etabliert. Die Piperazine-2-carbonsäure wird zur Herstellung des oralaktiven HIV-Protease Inhibitors Crixivan (Merck) eingesetzt.

Aber auch die Herstellung von komplexen Carbonsäuren wie α -Aminosäure und α -Hydroxysäure über die Nitrilroute ist industriell sehr attraktiv, wie bereits laufende Prozesse zur Herstellung von unnatürlichen α,α -dimethylierten Aminosäuren bei der



Firma DSM (Niederlande) zeigen.

Aus dem Spektrum nitrilverseifender Enzyme, zu denen auch Nitrilasen und Nitrilhydratasen gehören, wird in diesem Vorhaben der Schwerpunkt bei Amidasen aus extremophilen Mikroorganismen gesetzt. Dennoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Substrate der Amidasen ebenfalls enzymatisch durch Nitrilasen und Nitrilhydratasen gewonnen werden können. Im Sinne einer ganzheitlichen Betrachtung ergibt sich somit eine ganze Produktionskette, die auf dem Einsatz biokatalytischer Verfahren beruht.

2.2. Bisläng beschriebene Amidasen

In letzter Zeit wurde eine Reihe von interessanten Amidasen aus mesophilen und thermophilen Mikroorganismen detektiert und teilweise in *E. coli* kloniert und exprimiert (Tab. 1).

Industriell eingesetzt werden aber zur Zeit nur die Amidasen aus den mesophilen Bakterien *Pseudomonas putida*, *Klebsiella* sp., *Ochrobactrum antropi* SV3 und *Mycobacterium neoaurum*. Die übrigen Amidasen haben aufgrund zu geringer Stabilität oder zu hoher pH-Optima noch keinen Einzug in industrielle Produktionsverfahren gehalten. Die einzige bisher beschriebene archaeelle Amidase aus *Sulfolobus solfataricus* verfügt zwar über Aktivität bei hohen Temperaturen (95°C), hat mit 13,8 U/mg aber eine vergleichsweise geringe spezifische Aktivität. Zu eukaryotischen Amidasen, beispielsweise aus Pilzen und Hefen, liegen bislang nur wenige Daten vor (Tab. 1).

Eine viel versprechende Quelle industriell verwertbarer und stabiler Amidasen stellen daher extremophile Mikroorganismen dar. Amidasen aus extremophilen Organismen zeichnen sich durch hohe Thermostabilität und -aktivität sowie durch breite pH-Spektren aus. Auch eine höhere Toleranz gegenüber organischen Lösemitteln, Detergenzien oder Salzen ist für viele Extremozyme beschrieben worden. Im Rahmen des Projekts sollten verschiedene Amidasen aus extremophilen Mikroorganismen untersucht und industrierelevante Enzyme in *E. coli* aktiv exprimiert werden. Die rekombinanten Enzyme sollten im 300-l Maßstab hergestellt und abschließend für anwendungstechnische Versuche eingesetzt werden, um so auf ökologisch und ökonomisch vorteilhafte Weise ein Beitrag zum produktionsintegrierten Umweltschutz zu leisten.



Tabelle 1: Beschriebene Amidasen aus meso- und thermophilen Organismen

| Quelle von Amidasen | Eigenschaften der Enzyme | | | | | |
|---|----------------------------|------------|------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| | nativ/rekombin., System | T° opt. | pH opt. | Selekti- vität | Substrat- spezifität | Sp. Akt., U/mg |
| Bakterien: | | | | | | |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3 | in <i>E. coli</i> | 22 | 7.5 | S-selekt. | Al, Ar | 12 |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | in <i>E. coli</i> | 55 | 7.0 | n.d. | Al | 167 |
| <i>Brevibacillus borstelensis</i> BCS-1 | nativ | 70 | 9.5 | D-selekt. | As | 31 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTR1 | nativ | 65 | 7.0 | n.d. | Al | 220 |
| <i>Mycobacterium neoaurum</i> | nativ | 50 | 8.0 | L-selekt. | Al, As | 240 |
| <i>Ochrobactrum antropi</i> SV3 | in <i>E. coli</i> | 45 | 9.0 | D-selekt. | As | 367 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | in <i>E. coli</i> | 40 | 9.0 | L-selekt. | As | 371 |
| <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1 | in <i>E. coli</i> | 55 | 7.9 | S-selekt. | Al, Ar, Zy, As | 12.2 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> MP50 | in <i>E. coli</i> | 55 | 7.5 | S-selekt. | Al, Ar, Zy | 4.14 |
| <i>Stenotrophomonas maltophila</i> | in <i>E. coli</i> | 40 | 6.0 | L-selekt. | As | 60 |
| <i>Variovorax paradoxus</i> | nativ | 48 | 8.0 | D-selekt. | Al, Ar, Zy, As | 1.4 |
| Archaea: | | | | | | |
| <i>Sulfolobus solfataricus</i> | in <i>E. coli</i> | 95 | 7.5 | S-selekt. | Al, Ar, Zy | 13.8 |
| Eukarya: | | | | | | |
| <i>Aspegilus nidulans</i> | in <i>A. nidulans</i> | n.d. | n.d. | n.d. | Al, Ar | n.d. |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | in <i>S. cerevisiae</i> | 30 | n.d. | n.d. | As | n.d. |

Al - aliphatische Amide, Ar - aromatische Amide, Zy - zyklische Amide, As - Aminosäureamide, n.d. – nicht detektiert.



3. Verwendete Methoden

- aerobe Kultivierungstechnik
- Proteinaufreinigung mittels verschiedener chromatographischer Methoden
- HPLC-Untersuchungen zur Charakterisierung von Enzymen
- Isolierung der genomischen DNA mittels CTAB-Methode
- Klonierung von Amidase kodierenden Sequenzen
- Konstruktion einer DNA-GenBank Bibliothek
- Screening der GenBank auf Substrat-Platten
- Inverse pCR
- Polyacrylamid Gel Elektrophorese
- Enzymatischer Nachweis der aktiven Proteine in Gelen
- Expression rekombinanter Proteine



4. Ergebnisse

4.1. Reinigung und Charakterisierung von nativen Amidasen aus extremophilen Mikroorganismen

Native Amidasen aus *Thermocrispum municipale* 4K und *Pseudonocardia thermophila*

Aus Azorenproben gelang die Isolierung eines extrem thermophilen Actinomyceten, der auf Methioninamid als C-Quelle wächst. Der neu isolierte Stamm wurde mit Hilfe der 16S rDNA-Sequenzanalyse als *Thermocrispum municipale* 4K identifiziert. Parallel dazu wurden auch Untersuchungen an der Amidase aus dem literaturbekannten Stamm *Pseudonocardia thermophila* durchgeführt. Durch den Einsatz chromatographischer Methoden (HIC, IAC, GF) konnten die Amidasen aus *T. municipale* 4K und *P. thermophila* bis zur Homogenität aufgereinigt werden (Tab. 2; Abb. 2 und 3).

Tabelle 2: Reinigung der nativen Amidasen aus *Pseudonocardia thermophila* und *Thermocrispum municipale* 4K.

| | Protein (mg) | Gesamtaktivität (U) ^a | Spez. Aktivität (U•mg ⁻¹) | Ausbeute (%) | Reinigungsfaktor (-fach) |
|--|--------------|----------------------------------|---------------------------------------|--------------|--------------------------|
| <i>Amidase aus Pseudonocardia thermophila</i> | | | | | |
| Rohextrakt | 85 | 34,7 | 0,4 | 100 | 1 |
| Phenyl Sepharose | 4,4 | 25,2 | 5,7 | 72,6 | 14 |
| UNO Q12 | 2,0 | 16,8 | 8,5 | 48,3 | 20,7 |
| Superdex 200 | 0,46 | 9,0 | 19,5 | 26,2 | 48 |
| <i>Amidase aus Thermocrispum municipale</i> 4K | | | | | |
| Rohextrakt | 124,5 | 2,28 | 0,02 | 100 | 1 |
| Phenyl Sepharose | 6,16 | 2,09 | 0,34 | 91 | 18 |
| UNO Q12 | 1,07 | 1,73 | 1,62 | 76 | 88 |
| Superdex 200 | 0,17 | 0,36 | 2,13 | 16 | 116 |

a – Eine Amidase-Unit katalysiert die Bildung von 1µmol Benzoesäure (*Pseudonocardia thermophila*) bzw. 1µmol Methionin (*Thermocrispum municipale* 4K) pro min pro mg Protein.



Die gereinigten Enzyme wiesen eine spezifische Aktivität von $2,13 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (*T. municipale* 4K) bzw. $19,5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (*P. thermophila*) auf. Mittels Gelpermeationschromatographie (Superdex 200) wurden die Molekulargewichte der Amidasen bestimmt. Im Falle von *T. municipale* 4K betrug das Molekulargewicht 112 kDa; die Amidase aus *P. thermophila* wies ein Molekulargewicht von 108 kDa auf. Auf dem SDS-PAGE migrierten beide Enzyme als einzige Bande auf einer Höhe von 52 bis 54 kDa; sie bestehen somit aus zwei Untereinheiten.

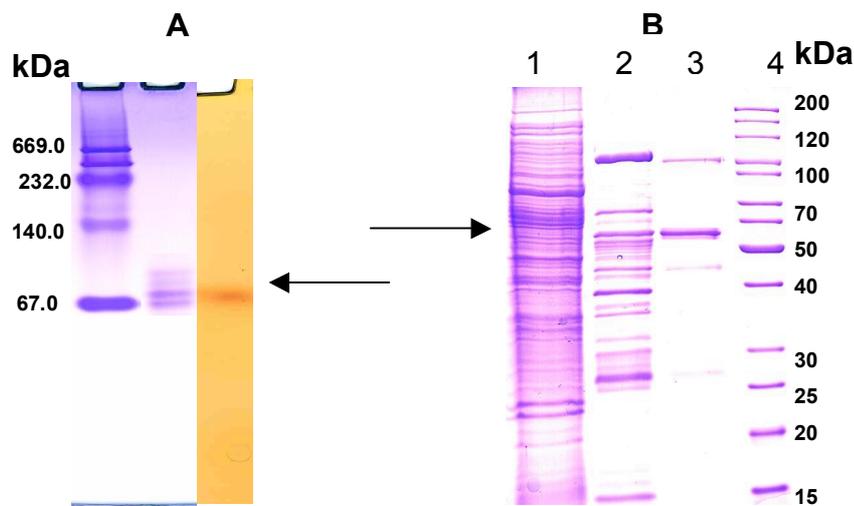


Abbildung 2: Aufreinigung der Amidase aus *Thermocrispum municipale* 4K. **(A)** Native PAGE und Zymogramm der aufgereinigten Amidase. Das Protein wurde mit Coomassie blue gefärbt. Die Aktivitätsfärbung ist in der rechten Spur dargestellt. **(B)** SDS-PAGE der Amidase-haltigen Fraktionen aus unterschiedlichen Stufen der Aufreinigung. Die Proteine wurden mit Coomassie blue gefärbt. Spur 1 – Phenyl Sepharose Pool; Spur 2 – UNO Q12 Pool; Spur 3 – Superdex 200 Pool; Spur 4 – Standard Proteinmarker. Die Amidasebande ist mit Pfeilen gezeichnet.



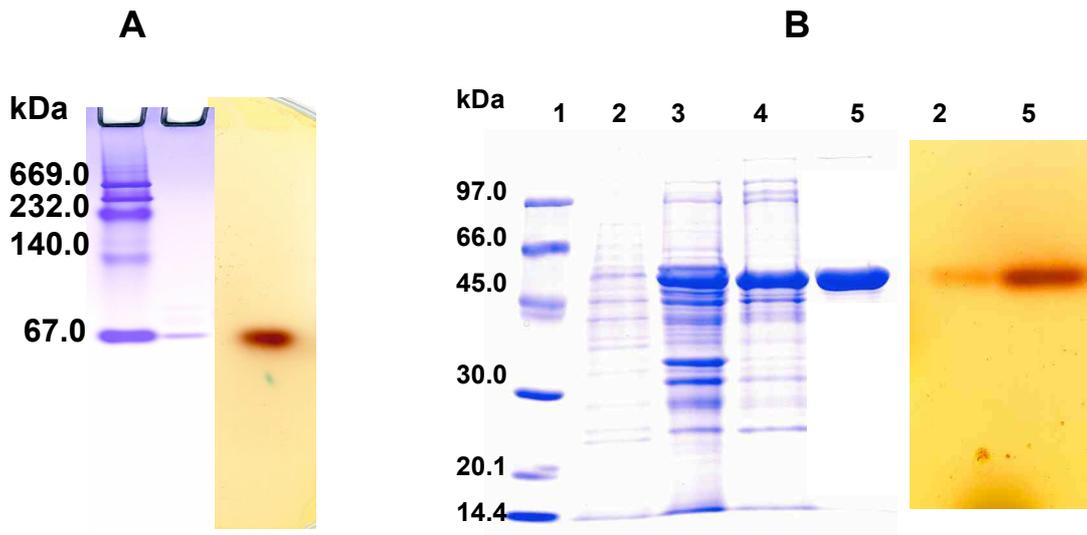


Abbildung 3: Aufreinigung der Amidase aus *Pseudonocardia thermophila*. (A) Native PAGE und Zymogram der aufgereinigten Amidase. Das Protein wurde mit Coomassie blue (linke Spuren) gefärbt. Die Aktivitätsfärbung ist in der rechten Spur dargestellt. (B) SDS-PAGE der Amidase-haltigen Fraktionen aus unterschiedlichen Stufen der Aufreinigung. Die Proteine wurden mit Coomassie blue gefärbt. Spur 1 – Proteinmarker; Spuren 2 – Rohextrakt; Spur 3 – Phenyl Sepharose Pool; Spur 4 – UNO Q12 Pool; Spuren 5 – Superdex 200 Pool.

Die thermoaktive Amidase aus *Thermocrispum municipale* 4K ist bei pH 6,0 und 70°C optimal aktiv. Bei 40°C und 75°C weist das Enzym nur 20% seiner maximalen Aktivität auf. Das Enzym ist am stabilsten bei 50°C und pH 6,0 (Abb. 4). Die *P. thermophila*-Amidase zeigt ebenfalls ein Temperaturoptimum von 70°C hat aber im Vergleich zur Amidase aus *T. municipale* 4K ein deutlich engeres pH-Spektrum (Optimum bei pH 6,0). Beide Amidasen sind aufgrund ihrer hohen Thermostabilität und des breiten pH-Spektrums interessante Kandidaten für industrielle Anwendungen.

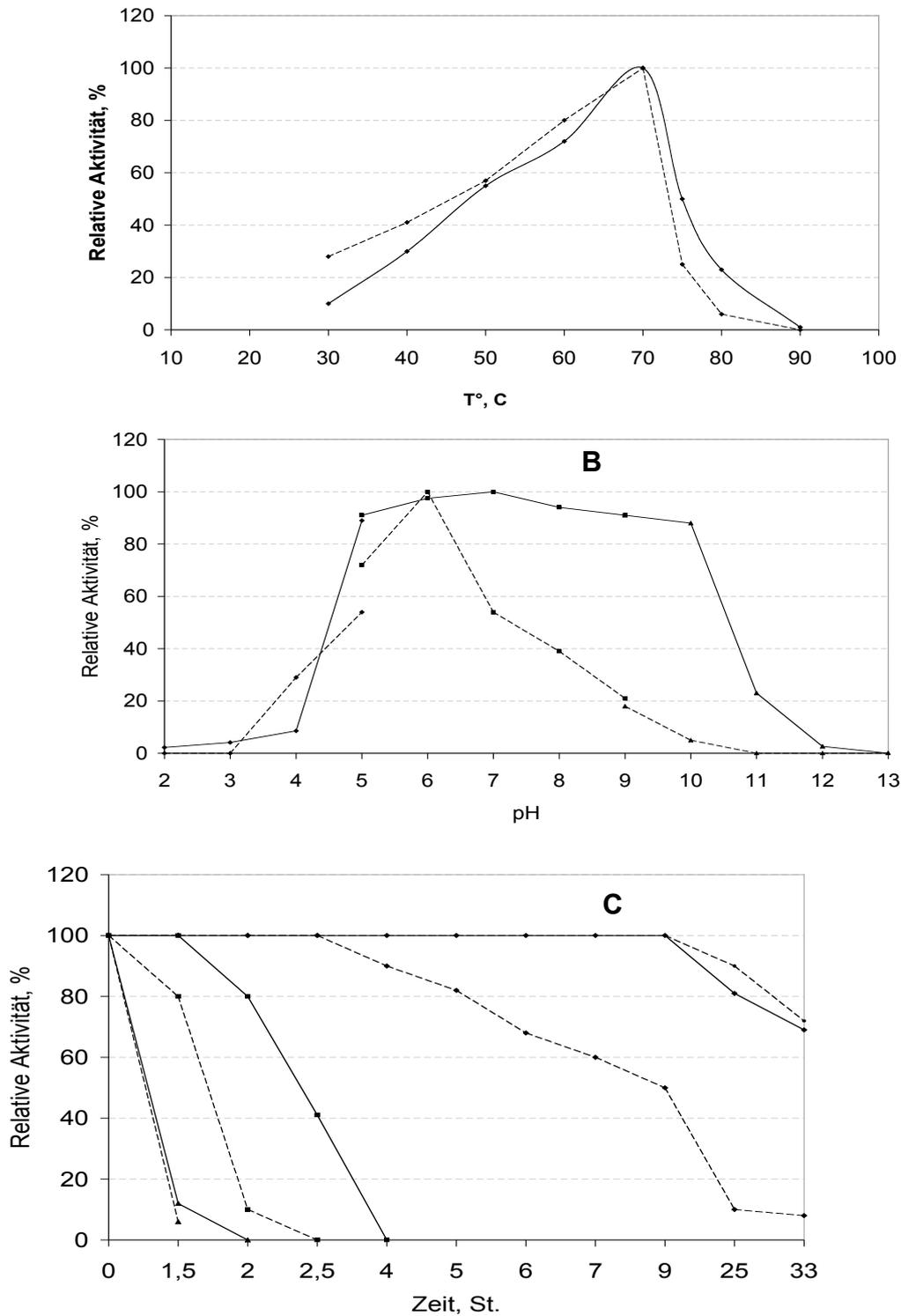


Abbildung 4: Einfluss von Temperatur (A) und pH (B) auf die enzymatische Aktivität und Stabilität (C) der Amidasen aus thermophilen Aktinomyzeten.

(—) – Amidase aus *Pseudonocardia thermophila*, (----) – Amidase aus *Thermocrisum municipale* 4K.

A) Die Aktivität wurde nach einer Stunde Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (30-90°C) getestet; **B)** Folgende Puffer (50 mM) wurden eingesetzt: (◆) – Na-Acetat Puffer; (■) – K-Na-Phosphat Puffer und (▲) – Na-Phosphat-NaOH Puffer; **C)** Die Enzyme wurden inkubiert bei 50°C (●), 60°C (◆), 70°C (■), 80°C (▲).



Die beiden aufgereinigten Enzyme konnten bei 4°C in 50 mM Phosphat Puffer für mehr als 6 Monate aufbewahrt werden. Viele der getesteten Metallionen sowie EDTA und Detergenzien wie SDS, Triton X-100 und Polyethylenglykol haben keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der gereinigten Amidasen aus *P. thermophila* und *T. municipale* 4K (Tab. 3). Kobalt- und Quecksilberionen inhibieren beide Enzyme komplett. Die Anwesenheit von Cu²⁺ und Ni²⁺ Ionen reduziert die enzymatische Aktivität auf 26-31% bzw. 42-56%. Iodacetat reduziert die enzymatische Aktivität ebenfalls signifikant bis auf 22-28% der ursprünglichen Aktivität, was zu der Vermutung führt, dass Cystein-Reste für die Aktivität eine wichtige Rolle spielen.

Tabelle 3: Einfluss verschiedener Reagenzien und Metallionen auf die enzymatische Aktivität thermoaktiver Amidasen.

| Reagenz [1mM] | Relative Aktivität, % | |
|-------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | <i>Pseudonocardia thermophila</i> | <i>Thermocrispum municipale</i> 4K |
| Co ²⁺ | 0 | 0 |
| Hg ²⁺ | 0 | 0 |
| Cu ⁺ | 26 | 31 |
| Ni ²⁺ | 42 | 56 |
| Zn ²⁺ | 93 | 81 |
| Mg ²⁺ | 90 | 80 |
| Ca ²⁺ | 85 | 81 |
| Mn ²⁺ | 98 | 86 |
| Fe ²⁺ | 80 | 100 |
| Fe ³⁺ | 96 | 100 |
| Ba ²⁺ | 87 | 88 |
| Sr ²⁺ | 86 | 88 |
| EDTA | 100 | 100 |
| Iodacetamid | 90 | 70 |
| Iodacetat | 22 | 28 |
| PCMB | 61 | 73 |
| SDS | 100 | 100 |
| Triton X-100 | 100 | 100 |
| Polyethylenglykol | 100 | 100 |
| DTT | 120 | 120 |

Ein weiterer Vorteil der beiden thermoaktiven Amidasen ist ihr sehr breites Substratspektrum. Aliphatische, zyklische und Aminosäure-Amide konnten hydrolysiert



werden, höchste Aktivität wurde mit Formamid, Acetamid, Propionamid und Acrylamid nachgewiesen (Tab. 4). Aufgrund ihres sehr breiten Substratspektrums können diese Enzyme für eine Vielzahl von industriellen Transformationen eingesetzt werden.

Tabelle 4: Substratspektrum der beiden untersuchten thermoaktiven Amidasen.

| eingesetzte Amide | Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$] | |
|---------------------------------|---|----------------------|
| | <i>T. municipale</i> 4K | <i>P. termophila</i> |
| Aliphatische: | | |
| C1: Formamid | 6,6 | 9,2 |
| C1: Harnstoff | 6,2 | 17,5 |
| C2: Acetamid | 6,3 | 15,7 |
| C2: <i>N</i> -Methylharnstoff | 0 | 0 |
| C3: Acrylamid | 5,2 | 26,8 |
| C3: <i>D,L</i> -Lactamid | 3,1 | 18,9 |
| C3: Malonamid | 0 | 7,4 |
| C3: Propionamid | 6,4 | 25,4 |
| C4: Fumaramid | 0 | 0 |
| C4: Isobutyramid | 2,5 | 13,5 |
| C4: Methacrylamid | 4,4 | 23,5 |
| C4: Succinamid | 2,4 | 4,0 |
| C5: Pivalinamid | 0,9 | 14,9 |
| C6: Adipamid | 6,1 | 12,0 |
| C6: Hexanoamid | 5,2 | 9,3 |
| C7: Cyclohexanoamid | 0,1 | 10,1 |
| Aromatische: | | |
| C6: Sulfanylamid | 0 | 0 |
| C7: 2-Aminobenzamid | 0 | 3,4 |
| C7: 4-Aminobenzamid | 0 | 6,5 |
| C7: Benzamid | 0,4 | 19,4 |
| C7: <i>o</i> -Hydroxybenzamid | 0 | 7,4 |
| C7: <i>p</i> -Hydroxybenzamid | 0 | 12,1 |
| C7: <i>N</i> -Phenylharnstoff | 0 | 0 |
| C8: Acetanilid | 0 | 0 |
| C8: Benzylcarbammat | 0 | 0 |
| C8: <i>o</i> -Tolylamid | 0 | 0 |
| C8 : <i>m</i> -Tolylamid | 0 | 12,7 |
| C8 : <i>p</i> -Tolylamid | 0 | 13,1 |
| C9 : 2-Phenylpropionamid | 0 | 15,8 |
| C10 : 3-Indolylacetamid | 0,1 | 7,6 |
| Heterozyklische: | | |
| C5: Pyrazinamid | 6,9 | 11,2 |
| C6: Nicotinamid | 6,7 | 11,6 |
| C6: Isonicotinamid | 2,6 | 7,1 |
| Aminosäureamide: | | |
| C3: <i>L</i> -Alaninamid | 1,8 | 10,5 |
| C5: <i>D,L</i> -Methioninamid | 2,1 | 14,4 |
| C5: <i>L</i> -Prolinamid | 0,4 | 13,0 |
| C5: <i>D,L</i> -Valinamid | 0,2 | 13,0 |
| C6: <i>D,L</i> -Leucinamid | 2,6 | 10,8 |
| C9: <i>D,L-tert</i> -Leucinamid | 0 | 0,1 |
| C11: <i>D,L</i> -Tryptophanamid | 2,1 | 10,3 |



Die Amidase aus *T. municipale* 4K weist eine Acyltransferase-Aktivität auf und bevorzugt aliphatische Substrate (Abb. 5). Die thermoaktive Amidase ist *L*-stereoselektiv gegen Aminosäureamide wie z.B. *D,L*-Tryptophanamid und *D,L*-Methioninamid.

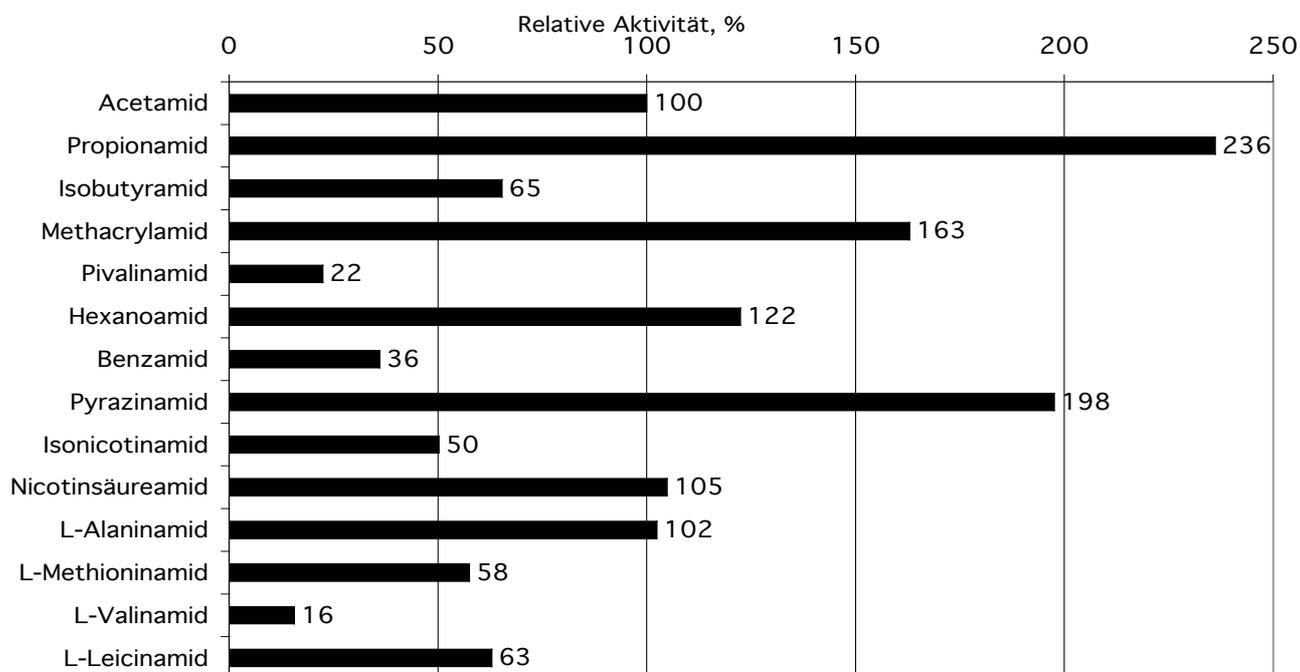


Abbildung 5: Substratspektrum der Amidase aus *Thermocrisum municipale* 4K (Acyltransferaseaktivität).

Die Eigenschaften der beiden untersuchten Amidasen aus *T. municipale* 4K und *P. thermophila*, insbesondere ihre ausgeprägte Thermoaktivität und -stabilität, die Resistenz gegenüber Detergenzien und Reduktionsmitteln sowie ihr breites Substratspektrum, machen diese Enzyme für die Herstellung von Amino- und Carbonsäuren sehr interessant.

4.2. Klonierung Amidase-kodierender Gene

Klonierung der Amidase aus *Pseudonocardia thermophila*

Um genügend Enzymmaterial für Anwendungstests zur Verfügung stellen zu können, sollte die thermostabile Amidase aus *P. thermophila* rekombinant gewonnen werden. Zur Klonierung der Amidase wurden zunächst der N-Terminus des aufgereinigten Enzyms sowie die Sequenz von zwei internen Peptiden (nach Trypsin-Verdau) bestimmt (Tab. 5).



Tabelle 5: Sequenzen des N-Terminus des Proteins und interner Peptide.

| Protein / Peptid | Aminosäuresequenz |
|------------------|-------------------|
| Protein | IHMPDPDAV |
| Peptide 1 | DGLPVGLMIVGKHF |
| Peptide 2 | DPRQPDVVEVQ |

Ausgehend von diesen Sequenzen wurden degenerierte Oligonukleotidprimer konstruiert, mit denen es gelungen ist, ein PCR-Produkt mit einer Länge von etwa 1500 bp aus *P. thermophila* zu amplifizieren. Durch den Einsatz der inversen PCR Technik konnte die Sequenz des Genes vervollständigt werden (Abb. 6).

→ **Amidase**

90
GGCGTTCTGTCTCGCTCTTGACCTCCTCCCTCTCAGGAGAAATCTTCCGTA**ATG**ATCCACATGCCGGACCCGGACCGGTCGGTGGCCCGGATG
MetIleHisMetProAspProAspAlaValAlaArgMet

180
GCCGCAGAGGGTCGGTTCGGGATCCCCGTAGTAGTGATCTGCCGTACCTACCACGACCTCGGTACCAGGCTGCTCGGCTCGTGGAAACAA
AlaAlaGluGlyArgPheGlyIleProValValValIleCysArgThrTyrHisAspLeuGlyHisArgProAlaArgLeuValGluGln

270
GGTCGAAGAGCTGTACGCGGAGGTGGCCCCACCCCGCCGAGCGCTCGTGGACCCGCCGACCCGAGGACGACAAGCTCGGCGCGTG
GlyArgArgAlaValArgGlyGlyGlyProHisProAlaAlaAlaLeuValAspProProArgArgArgGlyArgGlnAlaArgArgVal

360
GGCGGTGCAGACCTCGATCACCAGAACCTCGGAGGGGCCGCTCGCCGGCCGACGGTCGCGGTGAGGACAACGTCGCCGTCGCCGGCGTG
GlyGlyAlaAspLeuAspHisArgAsnLeuGlyGlyAlaAlaArgArgProHisGlyArgGlyGlnAspAsnValAlaValAlaGlyVal

450
CCGATGATGAACGGATCGCGGACCCTGGAGGGCTTCGTCCCCGCCGAGGACGCCACCGTCGTGTCCCGGCTGCTCGCCGCCGGCGCGACC
ProMetMetAsnGlySerArgThrLeuGluGlyPheValProAlaGluAspAlaThrValValSerArgLeuLeuAlaAlaGlyAlaThr

540
ATCGCCGCAAGTCGGTGTGCGAGGACCTGTGCTTCTCCGGCGCTCGCACACCAGCAAGCCGGGAACCGTGCACAACCCGTGGGACATG
IleAlaGlyLysSerValCysGluAspLeuCysPheSerGlyGlySerHisThrSerLysProGlyThrValHisAsnProTrpAspMet

630
AGCCGCTCGGCGGTGGTTCCTCGAGCGGTAGCGGGCGCTGGTGGCCGCCGAGGTCGACATGGCCATCGGCGGTGACCAGGGCGGG
SerArgSerAlaGlyGlySerSerSerGlySerGlyAlaLeuValAlaAlaGlyGluValAspMetAlaIleGlyGlyAspGlnGlyGly

720
TCGATCCGCATCCCGTCGGCGTACTGCGGCACCGTCGGGCACAAGCCGACCCACGGCCTGGTGCCTACACCGGAGGCTTCCCGATCGAG
SerIleArgIleProSerAlaTyrCysGlyThrValGlyHisLysProThrHisGlyLeuValProTyrThrGlyGlyPheProIleGlu

810
CAGTCGATCGACCACCTCGGCCGATCACCCGCACCGTCGCCGACGCCGCTCATGCTGTCGGTGCATCGCCGGCCGCGACGGGCTCGAC
GlnSerIleAspHisLeuGlyProIleThrArgThrValAlaAspAlaAlaLeuMetLeuSerValIleAlaGlyArgAspGlyLeuAsp



In enzymatischen Tests mit Substraten, die vom nativen Protein umgesetzt wurden, konnte indes keine Aktivität der rekombinante Amidase aus *P. thermophila* nachgewiesen werden.

Bei der Klonierung der thermoaktiven *L*-selektiven Amidase aus *T. municipale* 4K wurde eine andere Strategie verfolgt. Aus frisch induzierten Zellen wurde zunächst die genomische DNA isoliert. Anschließend wurde mittels des λ -ZAP Expressionsvektor (Stratagene) eine DNA-Bibliothek generiert. Der Titer betrug $4,3 \times 10^5$ koloniebildende Einheiten pro ml. Diese Genbank wurde mit Hilfe von Substrat-Platten auf Amidaseaktivität getestet. Insgesamt wurden 6000 Klone gescreent. Trotz dieser großen Zahl von Klonen konnte keine Amidaseaktivität nachgewiesen werden. Grund hierfür könnten eine falsche Faltung (*inclusion bodies*) oder eine fehlende Glykosylierung des rekombinanten Proteins sein.

Datenbankscreening und Klonierung von Amidasen aus verschiedenen extremophilen Mikroorganismen

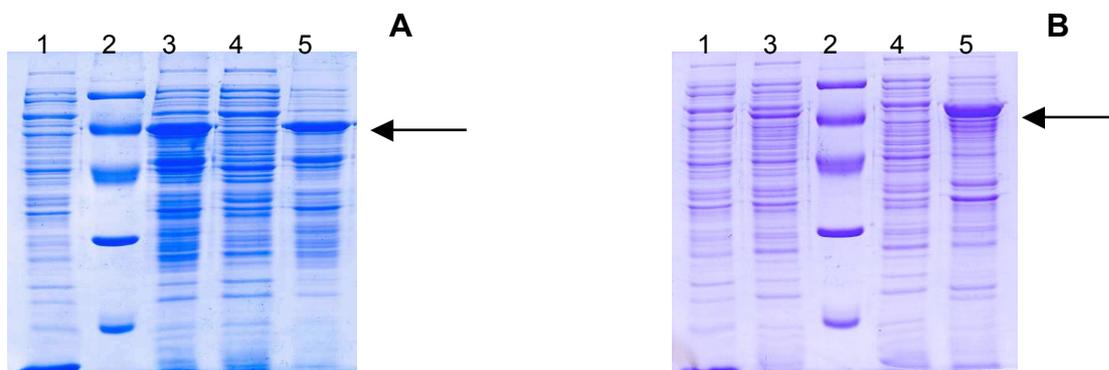
Um die Diversität von Amidasen aus extremophilen Mikroorganismen möglichst umfassend ausschöpfen zu können, wurde in öffentlich zugänglichen Datenbanken nach Amidase-kodierenden Sequenzen gescreent. Ziel ist es, ein möglichst großes Portfolio von industriell relevanten Amidasen vorzuhalten. So wurden beispielsweise in der GenBank/NCBI die Sequenzen von mehreren putativen, noch nicht beschriebenen Amidasegenen aus extremophilen Mikroorganismen wie *Aeropyrum pernix*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Aquifex aeolicus*, *Thermotoga maritima* und *Methanococcus jannaschii* auf DNA-Ebene detektiert (Tab. 6). Aus den Datenbanken wurden die homologen DNA-Abschnitte herausgesucht um diese als Vorlage zur Herstellung von Primern zu nutzen. Mit Hilfe der PCR-Technik wurden anschließend diejenigen DNA-Bereiche, welche möglicherweise für Amidasen kodieren amplifiziert und in den Arabinose-induzierten Expressionsvektor pBad-Thio-TOPO kloniert.



Tabelle 6: Putative Amidasen (GenBank NCBI).

| Mikroorganismus | Gen |
|--|----------------------------------|
| <i>Aeropyrum pernix</i> | putative Amidase (NCBI AP000060) |
| <i>Methanococcus jannaschii</i> | putative Amidase (NCBI U67558) |
| <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> | putative Amidase (NCBI AE000910) |
| <i>Aquifex aeolicus</i> | Amidotransferase (NCBI AE000680) |
| <i>Thermotoga maritima</i> | Amidotransferase (NCBI TM1272) |

Die erfolgreiche Expression entsprechender Proteine konnte mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 7). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass die rekombinanten Proteine vollständig in Form von Proteinaggregaten, sog. *inclusion bodies*, vorlagen.

**Abbildung 7:** Expression der putativen Amidasen aus Archaea.

Expression der Proteine aus *Methanococcus jannaschii* (A) und *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (B) erfolgte unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierten Promotors. Spuren: 1 – nicht induzierte Zellen; 2 – Proteinmarker; 3 – induzierte Zellen (Rohextrakt); 4 – induzierte Zellen (Überstand vom Rohextrakt); 5 – induzierte Zellen (Pellet vom Rohextrakt). Mit den Pfeilen sind die rekombinanten Proteine markiert.

Zur Vermeidung von *inclusion bodies* wurden unterschiedliche Strategien verfolgt. Eine davon war die Umklonierung der Amidasegene in Vektoren mit IPTG-induzierten Promotoren wie beispielsweise pET102/D-Thio-TOPO und pET3a. Auch in diesen Vektoren konnten die Amidasegene erfolgreich in *E. coli* kloniert und exprimiert werden; allerdings wieder in Form von *inclusion bodies*. Um die Bildung von Proteinaggregaten zu vermeiden, wurden die Zellen während der Expression bei niedrigen Temperaturen (20-28°C) inkubiert. Eine andere Methode die *inclusion bodies* zu reduzieren, ist die Koexpression der rekombinanten Proteine mit homologen, Faltung unterstützenden



Proteinen, wie Chaperone. Es ist bekannt, dass die Zugabe von Ethanol zu wachsenden Kulturen von *E. coli* zur Bildung von Chaperonen führt. Diese Strategie wurde in weiteren Experimenten verfolgt und Ethanol wurde in einer Konzentration von 3% zur *E. coli* Expressionskultur zugegeben. Ein weiterer Lösungsansatz zur Gewinnung aktiver rekombinanter Amidasen war die Expression der rekombinanten Proteine in Gegenwart von Metallionen ($ZnCl_2$, $CoCl_2$, $BaCl_2$), die für die Amidaseaktivität und möglicherweise auch für die Faltung des Proteins benötigt werden. Bis zum Projektende konnte die Bildung von *inclusion bodies* mit diesen Strategien jedoch nicht verhindert werden. Die Suche nach weiteren Amidasen aus extremophilen Mikroorganismen wurde daher fortgesetzt und auf das thermoalkaliphile Bakterium *Anaerobranca gottschalkii* ausgedehnt.

Klonierung der Amidase aus *Anaerobranca gottschalkii*

In der Genomsequenz des anaeroben, thermophilen Bakteriums *Anaerobranca gottschalkii* wurde ein putativer offener Leserahmen mit Homologie zu Amidasen anderer Bakterien identifiziert. Die Expression dieses Enzyms sollte in verschiedenen Expressionssystemen getestet werden. Da die Gensequenz bekannt ist, konnten spezifische Primer für die Klonierung des Gens eingesetzt werden. Tab. 7 gibt einen Überblick der verwendeten Vektorsysteme und *E. coli* Expressionsstämme.

Tabelle 7: Verwendete *E. coli* Expressionssysteme.

| Expressionsvektor | Promotor | <i>E. coli</i> -Stamm |
|-------------------|----------|-----------------------|
| pBtac2 | tac | JM105 |
| pET16b | T7 | BL21(DE3) |

Das pET-System ist das am häufigsten verwendete *E. coli*-Expressionssystem. Die Expression des klonierten Gens steht unter Kontrolle des starken Promotors für die RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 (P_{T7}) und kann somit nur in Anwesenheit der T7-Polymerase erfolgen. Das Gen für die T7 RNA Polymerase, dessen Expression mit IPTG induziert werden kann, ist im Chromosom des Überexpressionsstammes BL21(DE3) verankert. Zusätzlich ist beim Vektor pET16b auch die Expression des Zielgens IPTG-abhängig, wodurch eine stringente Kontrolle der Expression erzielt wird. *E. coli* BL21(DE3) ist defizient für die Proteasen Lon und OmpT. Dies wirkt sich in der Regel positiv auf die Stabilität rekombinanter Proteine aus.



Im Fall des Vektors pBtac2 steht die Genexpression unter Kontrolle des starken *tac*-Promotors, der aus der –35 Region des *trp*-Promotors und der –10 Region des *lac*-Promotors besteht. Die Expression kann ebenfalls mit IPTG induziert werden. Um die Basaltranskription zu minimieren, sollte ein *lacIq*-Stamm (z.B. *E. coli* JM105) verwendet werden. In pBtac2 wurde das Amidase-Gen sowohl als 5'*EcoRI*-*PstI*3' Fragment, als auch als 5'*BamHI*-*PstI*3' Fragment kloniert. Dadurch befand sich das Startcodon einmal im optimalen Abstand (10 bp) und einmal in einem weniger optimalen (18 bp) Abstand zur Ribosomenbindestelle (RBS). Auf diese Weise sollte die Effektivität der Expression moduliert werden.

In pET16 wurde das Gen als 5'*NdeI*-*BamHI*3' Fragment kloniert. Das daraus resultierende Fusionsprotein trägt einen N-terminalen His10-tag (Abb. 8) und besitzt gegenüber dem nativen Protein (52 kDa) ein Molekulargewicht von 55 kDa.

Durch die Wahl verschiedener Expressionssysteme und Konstruktion verschiedener Rec-Amidase Expressionsplasmide sollte die Gewinnung aktiven Enzyms optimiert werden.

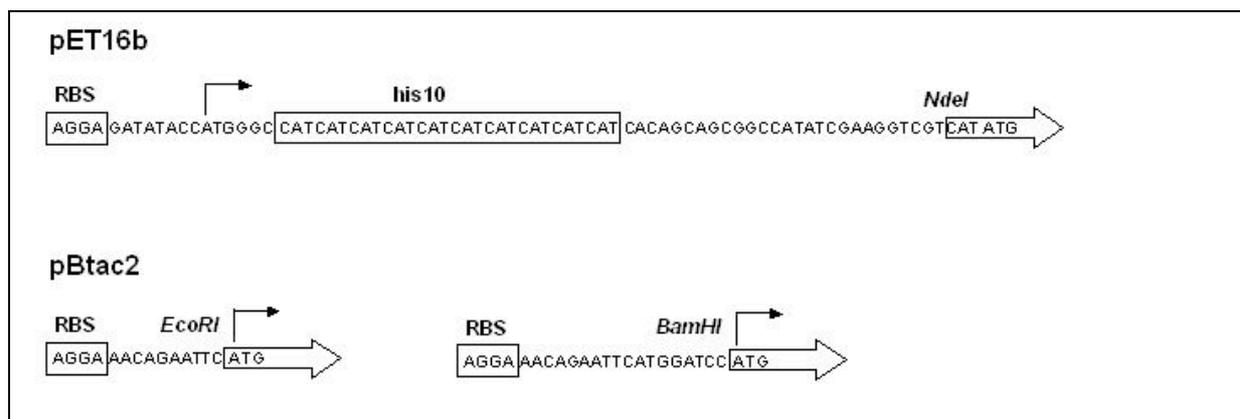


Abbildung 8: Multiple Cloning Site (MCS) der rekombinanten Amidase aus *A. gottschalkii* (Rec-Amidase). Das Amidase-Gen (offener Pfeil) wurde in die MCS der Vektoren pET16b und pBtac2 kloniert. Der jeweilige Startpunkt der Translation (Pfeil) befindet sich in unterschiedlichem Abstand zur ribosomalen Bindestelle (RBS). Bei pET16b wird ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen His10-tag gebildet.

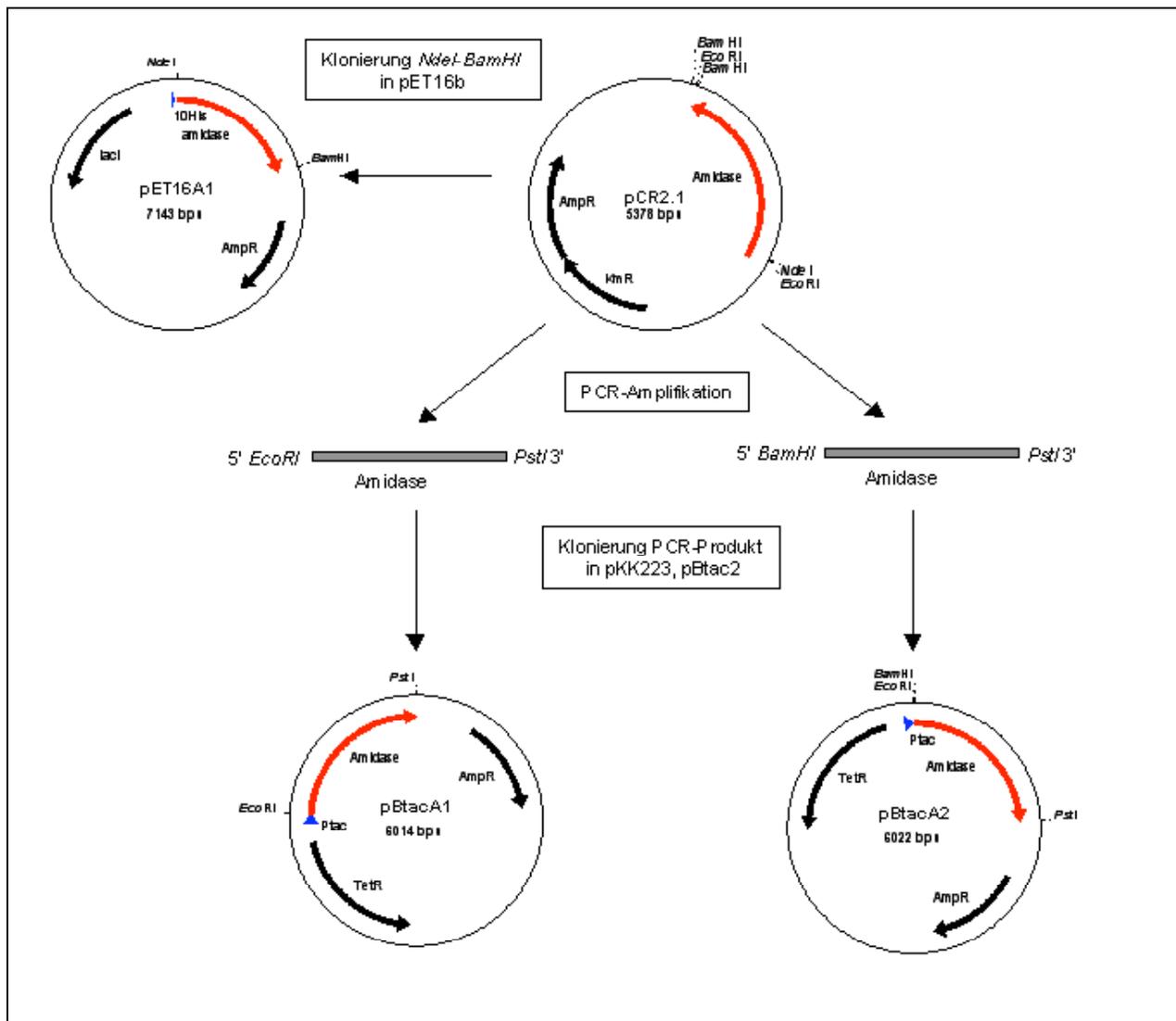


Abbildung 9: Klonierungsstrategie zur Herstellung von Rec-Amidase-Expressionsplasmiden.

4.3. Expression der rekombinanten Amidase aus *A. gottschalkii* (Rec-Amidase) in *E. coli*

Die Expressionsplasmide pBtacA1 und pBtacA2 wurden für die Expressionsanalyse in *E. coli* JM105, pET16A1 wurde in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Zur Kontrolle wurden die entsprechenden Vektoren ohne Insert transformiert.

Expression in *E. coli* BL21(DE3)

Der Teststamm mit dem Plasmid pET16A1 zeigte ein verlangsamtes Wachstum gegenüber dem Kontrollstamm mit Leervektor (Abb. 10). Der Teststamm erreichte eine OD₅₈₀ von 0,7 nach 5 h Inkubation, der Kontrollstamm bereits nach 3 h. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots für die Analyse mittels SDS-PAGE genommen (Abb. 11).



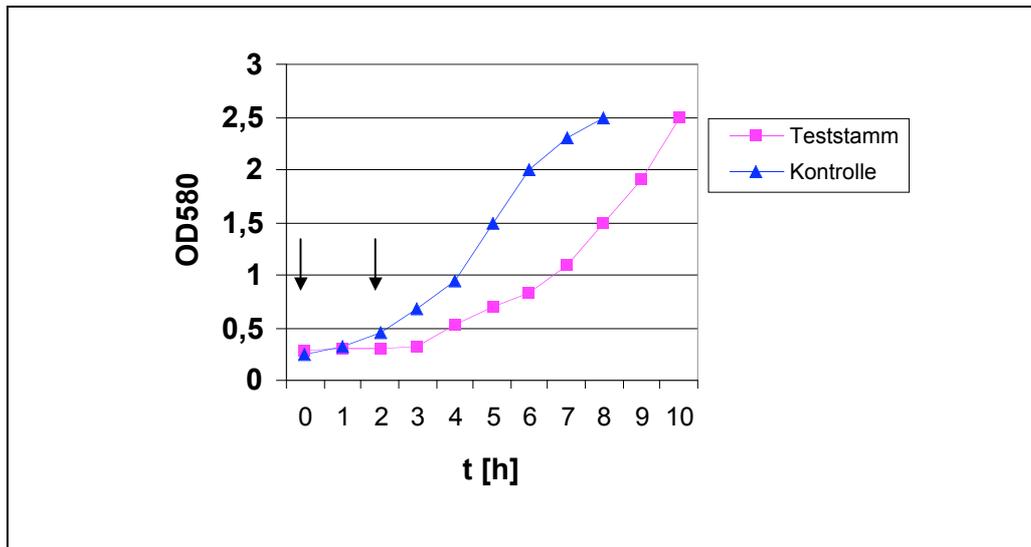


Abbildung 10: Wachstum des Rec-Amidase-Expressionsstamms gegenüber einem Kontrollstamm mit Leervektor. Pfeile bezeichnen den Zeitpunkt der Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG.

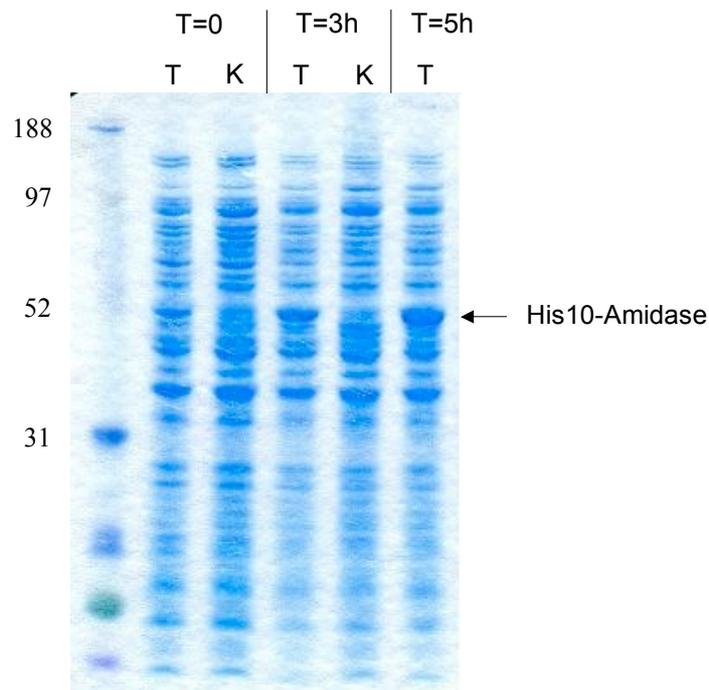


Abbildung 11: SDS-PAGE Analyse der recAmidase Expression in *E. coli* BL21(DE3). Aufgetragen wurden Gesamt-Proteinextrakte von Proben, die zum Zeitpunkt der Induktion mit 1mM IPTG (T = 0) bis 5 h nach Induktion (T = 5h) genommen wurden. K = Kontrollstamm BL21(DE3) + pET16b, T = Teststamm BL21(DE3) + pET16A1

Die Analyse von löslicher und unlöslicher Fraktion des Zellaufschlusses zeigte, dass das rekombinante Protein zu einem großen Anteil in *inclusion bodies* vorliegt. In *E. coli* JM105 konnte kein rekombinantes Protein nachgewiesen werden.



Eine weitere Strategie zielte daher darauf ab, die Löslichkeit der rekombinanten Amidase in *E. coli* zu verbessern. Dies sollte durch Fusion mit einem gut löslichen Protein ermöglicht werden.

Konstruktion von Colour-Tag-Fusionsproteinen

Der Projektpartner X-Zyme verfügt über das Farbprotein CTPTM (colour-tag protein). Durch gebundenes FAD hat CTP eine intensiv gelbe Farbe. Durch gentechnische Änderungen wurden Farbvarianten hergestellt, die neue Anwendungen u.a. im Bereich Proteinexpression und –aufreinigung ermöglichen (Abb. 12). Aufgrund seiner hohen Löslichkeit und außergewöhnlichen Stabilität eignet sich CTP hervorragend für die Herstellung von Fusionsproteinen.

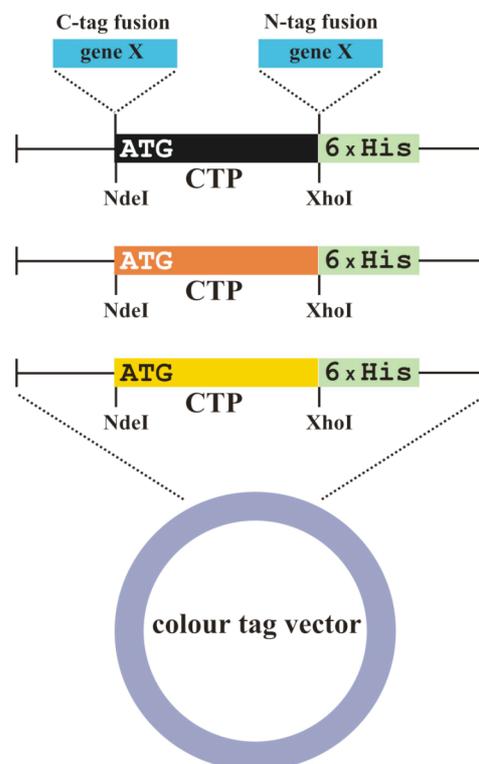


Abbildung 12: Der Expressionsvektor mit CTP und 6-His-tag CTP.

Dieser Vektor kann N- oder C-terminal mit dem Zielprotein X fusioniert werden. Neben dem nativen CTP (gelb) stehen weitere Farbvarianten (schwarz, orange) zur Verfügung.

Durch die farbliche Markierung können Proteine schnell und effizient aufgereinigt werden. Bereits im Rohextrakt kann die Proteinexpression durch Messung der OD₄₆₀ (Absorption von FAD) einfach spektrometrisch überprüft werden. Die Farbdomäne umfasst nur ca. 100 Aminosäuren, so dass die Gefahr einer negativen Beeinflussung des Zielproteins gering ist.



Im Fall der Amidase sollte die Löslichkeit des Enzyms durch die gute Löslichkeit von CTP gesteigert werden. Hierfür wurde das native CTP (gelb) sowohl an den N-Terminus (pCTPAmi) als auch an den C-Terminus (pAmiCTP) fusioniert.

Mit dem Plasmid pAmiCTP (s. Abb.13) konnte in Rohextrakten von entsprechenden AmiCTP-Expressionsstämmen eine geringfügig gesteigerte Aktivität (34 nmol Hydroxamsäure/min) gegenüber einem Kontrollextrakt mit CTP allein beobachtet werden.

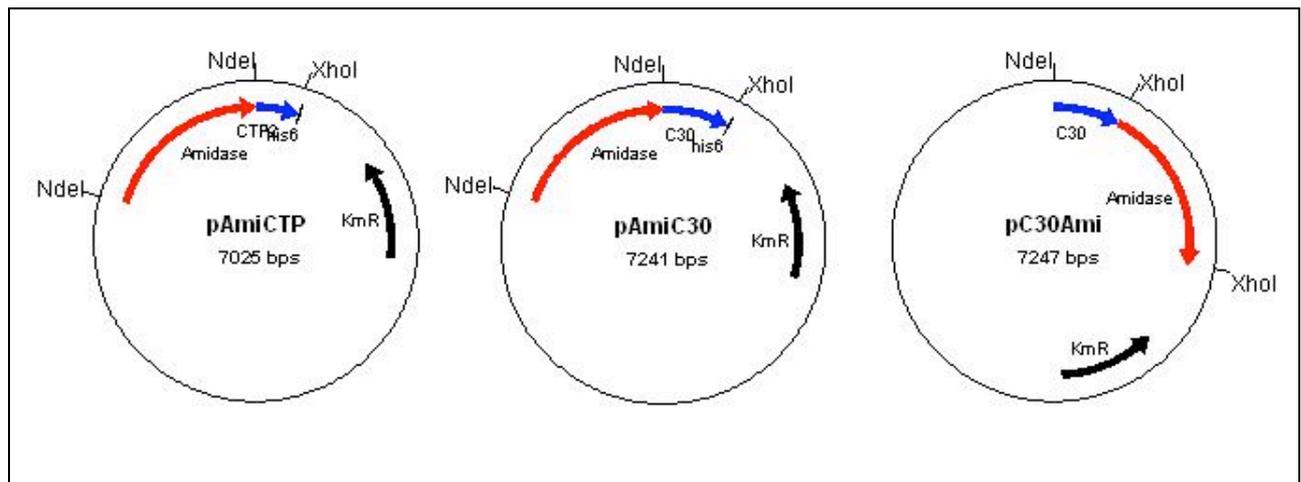


Abbildung 13: Expressionsplasmide für recAmidase-CTP Fusionen

Bisher wurden die recAmiCTP-Kulturen beim Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase mit 0,5 mM IPTG induziert. Durch Variation der IPTG Konzentration sollte getestet werden, ob die Aktivität der Amidase-CTP Fusion verbessert werden kann.

Hierfür wurden ausgehend von derselben VK mehrere HK bis zu einer OD_{580} von 0,5-0,6 angezogen. Die Amidase-CTP Kulturen wuchsen langsamer als die CTP-Kontrollkultur und erreichten die gewünschte OD eine $\frac{3}{4}$ Stunde nach der Kontrollkultur. Alle Kulturen wiesen zum Zeitpunkt der Induktion eine OD_{580} von 0,54-0,58 auf. Die Induktion erfolgte mit 50, 250, 500 und 1000 μ M IPTG. Eine weitere Kultur wurde nicht induziert. Die Kontrolle wurde mit 1000 μ M IPTG induziert. Die weitere Anzucht erfolgte bei 28°C für 22h. Zum Zeitpunkt der Induktion (T_0) und nach Inkubation (T_{22}) wurden Gesamtproteinextrakte genommen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 14).



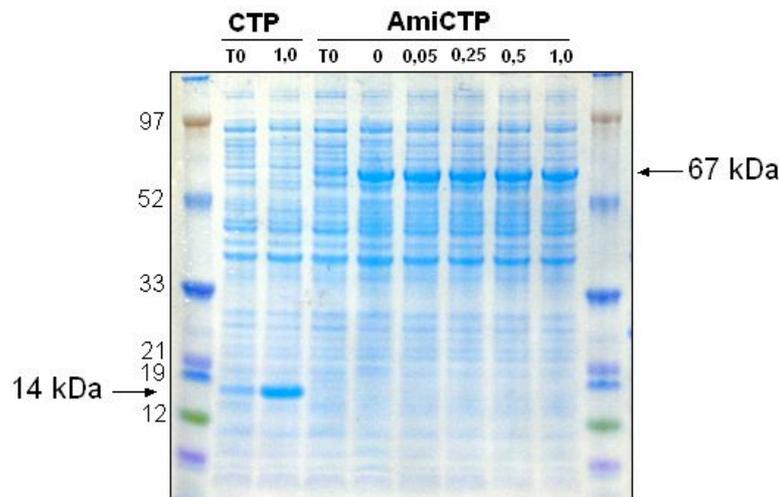


Abbildung 14: Expression der recAmidase-CTP Fusion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen. Gesamtproteinextrakte vom Zeitpunkt der Induktion (T_0) und nach 22h Inkubation mit 0-1 mM IPTG.

Durch die Fusion mit dem 14 kDa CTP-Protein besaß die recAmidase-CTP Fusion ein MG von 67 kDa. Beide Proteine wurden auch ohne IPTG sehr stark exprimiert, so dass bereits zum Zeitpunkt der Induktion (T_0) eine deutliche Bande bei 14 kDa und 67 kDa im Gel zu erkennen ist. Nach 22 h ist kein Unterschied zwischen der recAmidase-Kultur ohne IPTG-Zugabe und den Kulturen mit IPTG zu erkennen. Eine Zunahme der Bandendicke mit steigender IPTG-Konzentration findet nicht statt. Die Amidase wird offensichtlich ohne IPTG bereits maximal exprimiert.

Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen und die lösliche Proteinfraction (Rohextrakt) sowie die unlösliche Fraction (Pellet) ebenfalls im SDS-Gel analysiert (Abb. 15). Der Rohextrakt der Kontrolle CTP unterschied sich durch seine gelbe Färbung deutlich von den AmiCTP-Rohextrakten, die eine *E.coli* übliche bräunliche Färbung aufwiesen. Die Gelbfärbung zeigt die Anwesenheit des colour-tag Proteins im Rohextrakt an. Dies wird durch das SDS-Gel bestätigt: Während das 14 kDa CTP auch in der löslichen Fraction als deutliche Bande zu erkennen ist, verbleibt das Amidase-CTP Prot ein nahezu vollständig in der unlöslichen Fraction. Mit 0,5 und 1 mM IPTG ist ebenfalls keine Bande im Rohextrakt zu erkennen (nicht abgebildet).



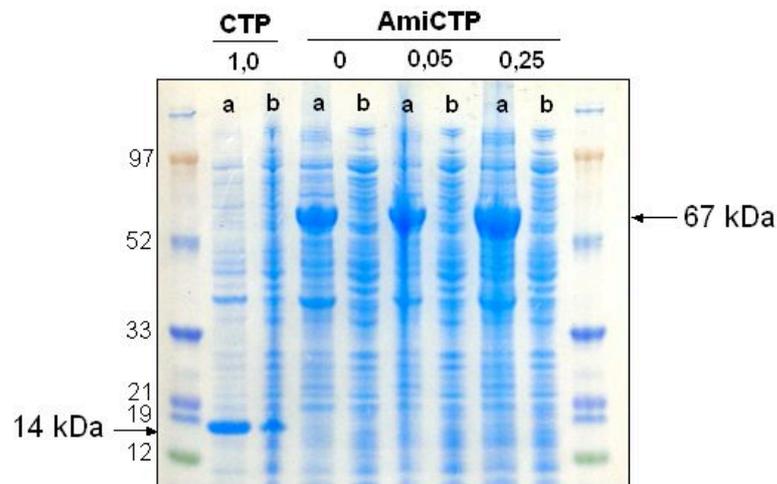


Abbildung 15: Löslichkeit der recAmiCTP Fusion in Abhängigkeit von der IPTG Konzentration. Unlösliche (a) und lösliche (b) Proteinfraction nach 22 h Inkubation mit 0-1 mM IPTG.

Mit den Rohextrakten wurde ein Aktivitätstest mit Propionamid bzw. Hydroxylamin als Substrate durchgeführt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle CTP und den recAmiCTP Proben ermittelt werden. Ebenfalls war kein Unterschied zwischen den einzelnen IPTG-Konzentrationen festzustellen. Auch Enzymtests bei anderen Temperaturen (60°C, 37°C) lieferten keine Aktivität. Durch die Fusion mit CTP konnte die Löslichkeit der Amidase nicht verbessert werden.

Neben CTP verfügt die X-Zyme GmbH über ein weiteres colour-tag protein, C30, das in *E. coli* eine um den Faktor 6 höhere Löslichkeit als CTP aufweist. Eine Fusion der Amidase mit dem noch besser löslichen C30-Protein sollte die Löslichkeit der Amidase erhöhen.

Durch Insertion des Amidase-Gens in die *NdeI* Schnittstelle wurde eine C-terminale C30 Fusion erzeugt, durch Insertion in die *XhoI*-Schnittstelle eine N-terminale. Für eine Analyse der Expression wurden die rekombinanten Plasmide in *E.coli* BL21(DE3) transformiert. Die induzierten Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und Gesamtproteinextrakte, lösliche Fraktion (Rohextrakt) und unlösliche Fraktion (Pellet) im Vergleich zu einer Kontrolle mit C30 Protein in einer SDS-PAGE untersucht (Abb. 16). Im Bereich 75 kDa erkennt man bei beiden Fusionen eine deutliche Proteinbande in der Gesamtprotein- und Pelletfraktion. Im Gegensatz zu C30 ist keine prägnante Bande in der löslichen Proteinfraction zu erkennen.



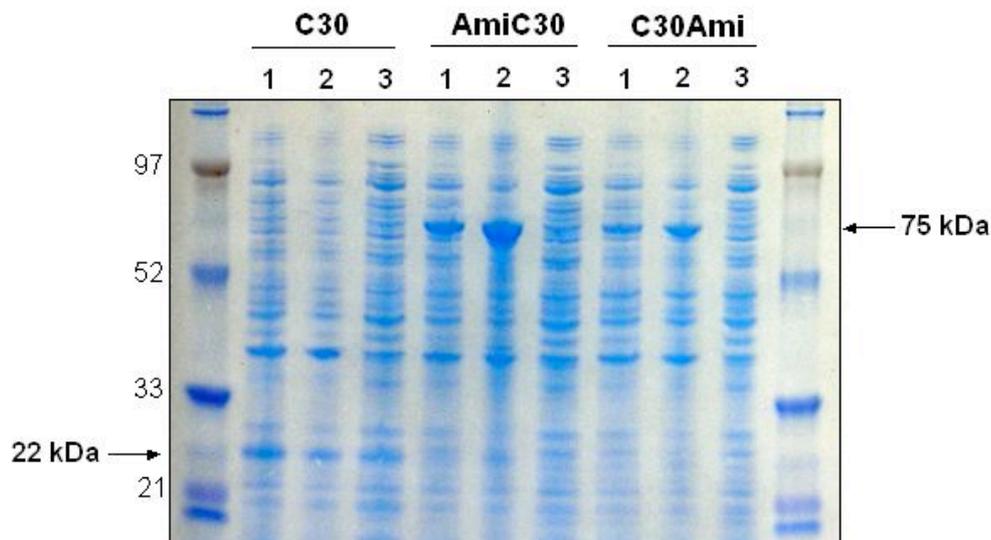


Abbildung 16: Expression von N- und C-terminalen recAmidase-C30 Fusionen.
 1: Gesamtproteinextrakt = lösliche + unlösliche Fraktion
 2: Pellet = unlösliche Fraktion
 3: Rohextrakt = lösliche Fraktion

Enzymtests zeigten keine gesteigerte Aktivität der recAmidase-C30 Fusionen im Vergleich zur Kontrolle C30. Das recAmiC30 Protein konnte nicht durch Ni-Affinitätschromatographie aus dem Rohextrakt gereinigt werden. Die Fusionen mit C30 führten zu keiner Bildung von löslichem Enzym.

Expression von recAmiKA1 und recAmiKA2

In einem weiteren Experiment sollte die Expression der recAmidase mit den Plasmiden pKA1 und pKA2 untersucht werden. In beiden Fällen handelt es sich um Expressionsplasmide der Firma X-Zyme, die durch CTP-Modifikation eine verbesserte Löslichkeit und Aktivität der exprimierten Enzyme in *E. coli* erzielen sollen. Für pKA1 konnte dies bereits experimentell gezeigt werden. Das pKA2 Plasmid unterscheidet sich von pKA1 dadurch, dass das gebildete Protein über einen N-terminalen His10-tag aufgereinigt werden kann. Die Amidase-Gensequenz wurde als *NdeI-BamHI*-Fragment in pKA1 und pKA2 kloniert. Die Plasmide wurden als pAmiKA1 und pAmiKA2 bezeichnet und für eine Analyse der Expression in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Als Kontrolle diente ein Stamm mit Vektor pKA2. Hauptkulturen wurden bei einer OD₅₈₀ von 0,5 mit 0,5 mM IPTG induziert. Die weitere Inkubation erfolgte für 20 h bei 28°C. Gesamtproteinextrakte sowie der lösliche (Rohextrakt) und unlösliche (Pellet) Proteinanteil wurden in einer SDS-PAGE analysiert (Abb. 17)



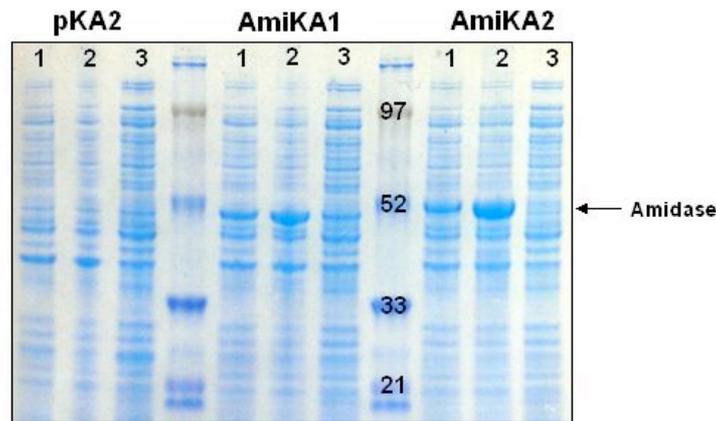


Abbildung 17: Expression der recAmidase mit Plasmiden pKA1 und pKA2.
 1: Gesamtproteinextrakt = lösliche + unlösliche Fraktion
 2: Pellet = unlösliche Fraktion
 3: Rohextrakt = lösliche Fraktion

Das Molekulargewicht der rekombinanten Proteine beträgt 52 kDa für AmiKA1 und 55 kDa für AmiKA2. Im SDS-Gel verlief die Bande der recAmidase im Vergleich zum Marker etwas unterhalb dieses Wertes bei 52 kDa. Anders als bei Expression aller bisherigen Konstrukte lag das rekombinante Protein zum Teil in der löslichen Proteinfraction vor. Im Enzymassay war mit entsprechenden Rohextrakten keine Amidaseaktivität nachweisbar.

AmiKA2 trägt einen N-terminalen His-tag. Im Folgenden wurde versucht, die Amidase aus dem AmiKA2 Rohextrakt durch Ni-Affinitätschromatographie zu reinigen. Da das Enzym aus einem thermophilen Organismus stammt und bei 70°C aktiv sein sollte, wurde ein Teil des Rohextrakts vor der chromatographischen Reinigung einer partiellen Aufreinigung mittels Hitzefällung unterzogen. Hierfür wurde der Rohextrakt für 10 min bei 55°C inkubiert, die denaturierten Proteine abzentrifugiert und der restliche Extrakt mit Ni-NTA inkubiert. Die übrigen Extrakte wurden ohne Hitzefällung mit Ni-NTA inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden nach einem Waschschrift (20 mM Imidazol) mit 250 mM Imidazol von der Ni-Matrix eluiert und die Eluate in einer SDS-PAGE überprüft. Zum Vergleich wurde eine Probe unlösliche Proteinfraction (Pellet) eines AmiKA2-Extrakts aufgetragen, bei der die Bande der recAmidase bei 52 kDa deutlich zu erkennen ist (Abb.18)



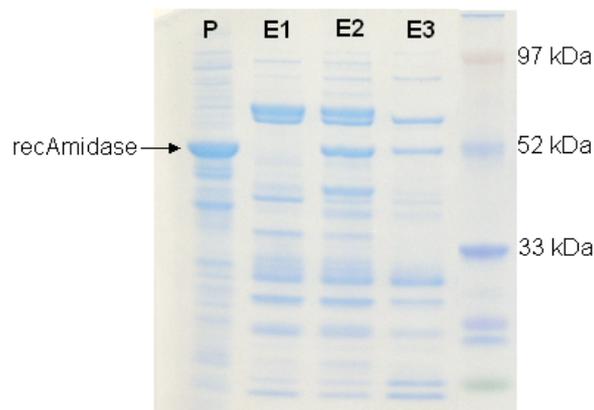


Abbildung 18: Reinigung der rekombinanten Amidase mittels Ni-Affinitätschromatographie.
P: nicht aufgereinigte unlösliche Proteinfraction (Pellet)
E1: Eluat Kontrollextrakt KA2
E2: Eluat Amidase-Extrakt AmiKA2
E3: Eluat Amidase-Extrakt AmiKA2, vorgereinigt durch Hitzefällung bei 55°C

In den Eluaten E2 und E3 aus der recAmidase Expression erkennt man eine deutliche Bande im Bereich 52 kDa, die bei der Kontrolle fehlt und auf Höhe der Amidase-Bande der Pellet-Fraktion läuft. Mit dem AmiKA2-Expressionsstamm konnte folglich lösliches Protein gewonnen werden. Der Anteil an löslicher Amidase im Extrakt ist nicht sehr hoch, da zahlreiche andere Proteine unspezifisch an Ni-NTA gebunden haben und mit eluiert wurden. Durch die partielle Reinigung mittels Hitzefällung kann ein Teil der unspezifischen Proteinbindungen vermieden werden (E3), allerdings erhält man auch eine geringere Ausbeute an Amidase im Vergleich zur Proteinelution ohne vorherige Hitzefällung. Unter den gegebenen Bedingungen ist die Thermostabilität der rekombinanten Amidase offensichtlich verringert.

Durch Veränderungen in der Anzucht und beim Reinigungsprotokoll wurde anschließend versucht, die Ausbeute an löslicher recAmidase zu erhöhen. Im Fall von AmiCTP konnte gezeigt werden, dass die Amidase auch ohne Induktion mit IPTG sehr stark exprimiert wird. Es wurde daher eine AmiKA2-Hauptkultur ohne IPTG bei 28°C für 22 h inkubiert. Die Proteine des Rohextrakts wurden ohne vorherige Hitzefällung an Ni-NTA gebunden. Der Waschschrift erfolgte mit 100 mM Imidazol, um die Bindung unspezifischer Proteine zu verringern. Unter diesen Bedingungen konnte im Vergleich zu ersten Reinigung deutlich mehr lösliches Protein von der Ni-Matrix eluiert werden (Abb. 19).

Mit dem gereinigten Protein wurde ein Enzymtest durchgeführt. Der Umsatz von Propionamid und Hydroxylamin zu Hydroxamat wurde bei verschiedenen Temperaturen bestimmt (10 min 70°C, 20 min 50°C, 30 min 37°C). Dabei konnte keine Hydroxamat-



Bildung in den Ansätzen mit Amidase im Vergleich zum Kontrolleluat KA2 festgestellt werden.

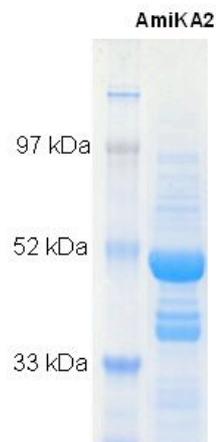


Abbildung 19: Proteineluat mit Amidase (AmiKA2) nach Ni-Affinitätschromatographie.

Da mit Hilfe des Plasmids pAmiKA2 eine ausreichende Menge lösliches Protein aus *E. coli* isoliert werden konnte, kann fehlendes Enzym nicht die Ursache für die mangelnde Aktivität sein.

5. Diskussion

Enzymaufreinigung und Charakterisierung: Die nativen Amidasen aus *Thermocrispum municipale* 4K und *Pseudonocardia thermophila* wurden planmäßig gereinigt und vollständig charakterisiert. Beide Enzyme sind sehr thermoaktiv und zeigen maximale Aktivität bei 70°C. Die Amidase aus *T. municipale* 4K weist darüber hinaus ein ungewöhnlich breites pH-Profil auf. Beide thermoaktiven Amidasen verfügen über ein breites Substratspektrum und sind sehr resistent gegenüber Detergenzien und Reduktionsmitteln. Aufgrund dieser Eigenschaften verfügen beide Enzyme über ein großes Potenzial für eine industrielle Anwendung zur Herstellung von Carbonsäuren und ungewöhnlichen Aminosäuren.

Klonierungen: Im Laufe des Projekts konnten wie geplant zahlreiche Amidasegene aus extremophilen Mikroorganismen kloniert werden. Ziel war es, eine möglichst große Anzahl von Amidasen mit unterschiedlichen Eigenschaften für eine industrielle Nutzung



zu erschließen. Die Klonierung von Amidasegenen aus *A. gottschalkii*, *M. jannaschii*, *M. thermoautotrophicus*, *Aquifex aeolicus* und *T. maritima* konnte erfolgreich durchgeführt werden. Da die rekombinaten Amidasen in Form von unlöslichen *inclusion bodies* vorlagen, mussten unerwartet große Anstrengungen unternommen werden, um Lösungsansätze für diese Fragestellungen zu entwickeln. Anders als ursprünglich geplant sind daher neben den Standard-Expressionssystemen (*E. coli* BL21) noch weitere Systeme getestet worden mit dem Ziel, die Bildung von *inclusion bodies* zu vermeiden bzw. signifikant zu reduzieren. Durch Fusion der Amidase mit verschiedenen colour tag Proteinen (CTP), die in *E. coli* sehr gut löslich sind, wurde die Löslichkeit der rekombinaten Amidase verbessert. In weiteren Untersuchungen sollen die löslichen rekombinanten Proteine nun charakterisiert und mit verschiedenen Substraten getestet werden.

Fermentationsoptimierung und Anwendungstests: Versuche zur Überexpression einer ausgewählten industriell relevanten thermoaktiven Amidase durch Fermentationsoptimierung wurden nicht durchgeführt, da kein entsprechendes Enzym in aktiver rekombinanter Form vorlag.

7. Kooperation innerhalb des Projekts

Die Zusammenarbeit innerhalb des Projektkonsortiums verlief ausgezeichnet und sehr vertrauensvoll. Die Expertisen der Projektpartner ergänzen sich sehr gut. Schwerpunkte lagen bei der AG Antranikian in der Bereitstellung extremophiler Mikroorganismen und in der Klonierung von Amidasegenen. Die molekularbiologische Seite wurde durch den Projektpartner X-Zyme GmbH hervorragend ergänzt. Mit dem Industriepartner Degussa AG wurden mögliche Strategien zur Umklonierung der Amidasen in ein industrielles Expressionssystem erarbeitet.

8. Veröffentlichungen

Egorova, K., H. Trauthwein, S. Verseck, and G. Antranikian. 2004. Purification and properties of an enantioselective and thermoactive amidase from the thermophilic actinomycete *Pseudonocardia thermophila*. *Appl. Microbiol. & Biotechnol.* 65, 1:38-45.



Egorova, K., H. Trauthwein, and G. Antranikian. 2004. A rapid and sensitive method for the detection of amidases in polyacrylamide gels and agar plates. *J. Microb. Methods* submitted.

9. Präsentationen

Egorova K., P. Müller, C. Vorgias, H. Trauthwein, S. Verseck, G. Antranikian. Thermophiles as sources of thermostable nitrile-degrading enzymes. International Congress on Biocatalysis Aug. 29- Sept. 1 2004, Hamburg, Germany. P. 250.

10. Patente

Egorova, K., H. Trauthwein, S. Verseck and G. Antranikian. The amidase from *Pseudonocardia thermophila*. German Patent. 21.03.2003. Submission number DE 103 12 842.

Egorova, K., H. Trauthwein and G. Antranikian. A method for the detection of amidases in polyacrylamide gels and agar plates. German Patent. 2002. Submission number 10233686.5.

