

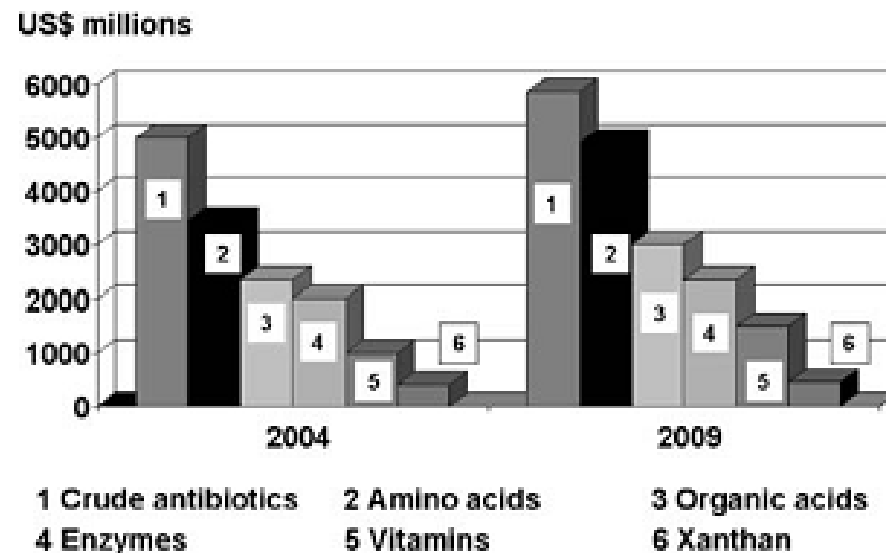
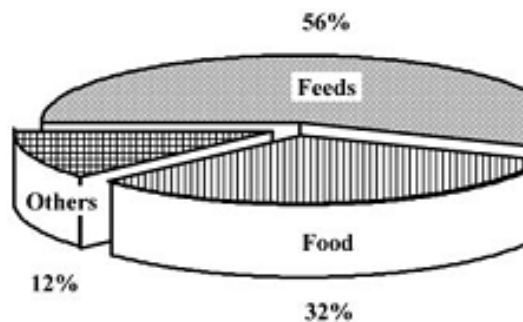
AS-Produktion

Extraktion (L-serine, L-proline, L-hydroxyproline, and L-tyrosine)

Synthese

Fermentation (1.500 tons/year glutamic acid)

Enzymatische Katalyse



Verwendung von AS

Produktgruppenumsätze ohne Alkohol als größtes Produkt

Produktionsstämme

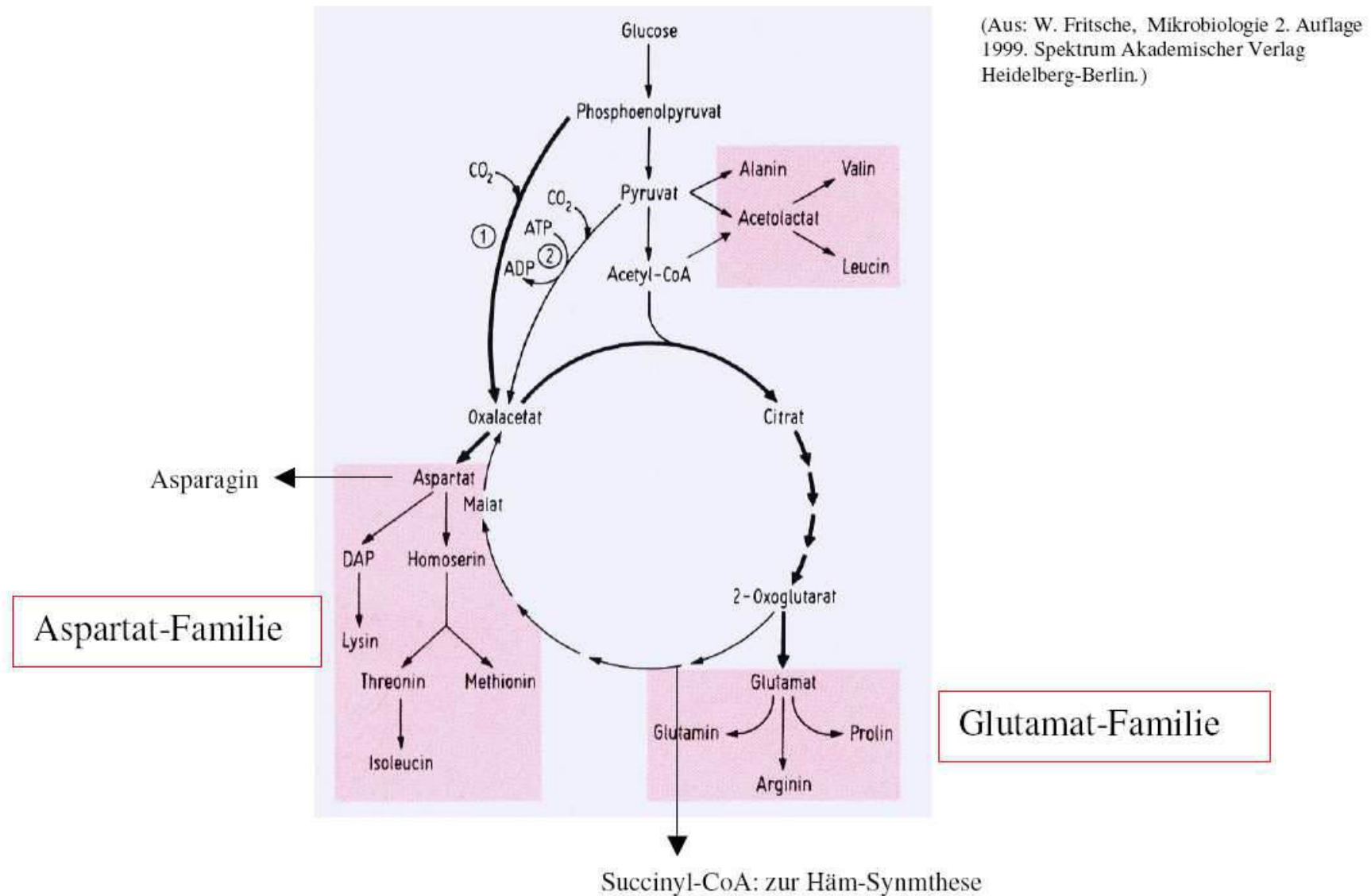
Amino acid	Strain/mutant	Titer (g/l)	Estimated yield (g/100 g sucrose)
L-Lysine HCl	<i>C. glutamicum</i> B-6	100	40–50
L-Threonine	<i>E. coli</i> KY 10935	100	40–50
L-Tryptophan	<i>C. glutamicum</i> KY9218/pIK9960	58	20–25
L-Tryptophan	<i>E. coli</i>	45	20–25
L-Phenylalanine	<i>E. coli</i> MWPWJ304/pMW16	51	20–25
L-Arginine	<i>Brevibacterium flavum</i> AJ12429	36	30–40
L-Histidine	<i>C. glutamicum</i> F81/pCH99	23	15–20
L-Isoleucine	<i>E. coli</i> H-8461	30	20–30
L-Serine	<i>Methylobacterium</i> sp. MN43	65	30–35
L-Valine	<i>C. glutamicum</i> VR 3	99	30–40

Generelle Möglichkeiten zur Stammverbesserung:

Isolieren von Wildstämmen mit unvollkommen ausgebildeten Regelsystemen; dadurch schon bei geeigneter Steuerung der Fermentation Überproduktion (Glu in *Corynebacterium glutamicum*)

Auxotrophe Mutanten, die den Effektor der Endprodukthemmung nicht mehr synthetisieren können (Überproduktion von Lysin durch Homoserin bedürftige auxotrophe Mutante von *C. glutamicum*)

Biosynthese der AS aus dem TCC



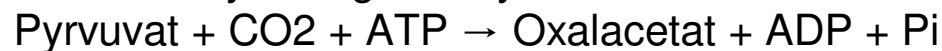
Oxalacetat als Schlüsselsubstanz

2 Gruppen von AS kommen aus dem TCC, die
Glutamat-Familie (Prolin, Glutamat, Arginin)
Aspartat-Familie (Methionin, Aspartat, Threonin, Isoleucin)

Oxalacetat ist in beiden Fällen eine Schlüsselsubstanz zum Auffüllen

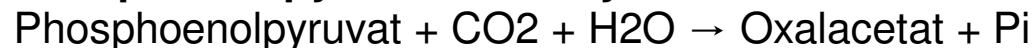
Pyruvat-Carboxylase-Reaktion:

Die Carboxylierung von Pyruvat erfordert eine energiereiche Bindung.



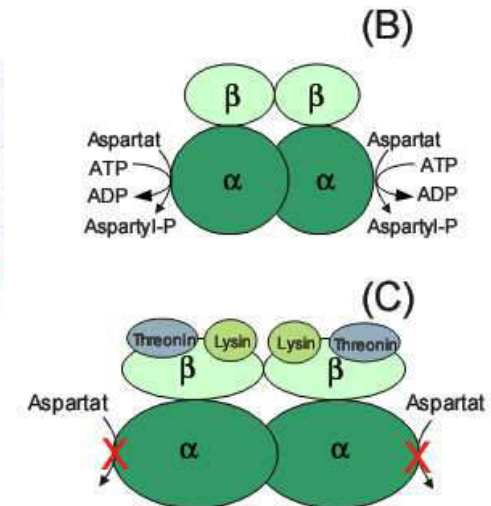
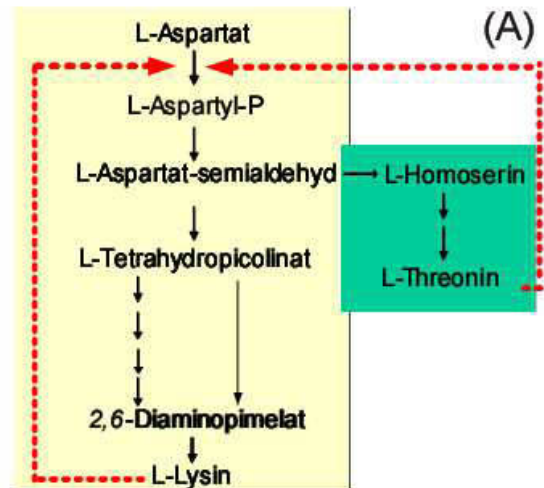
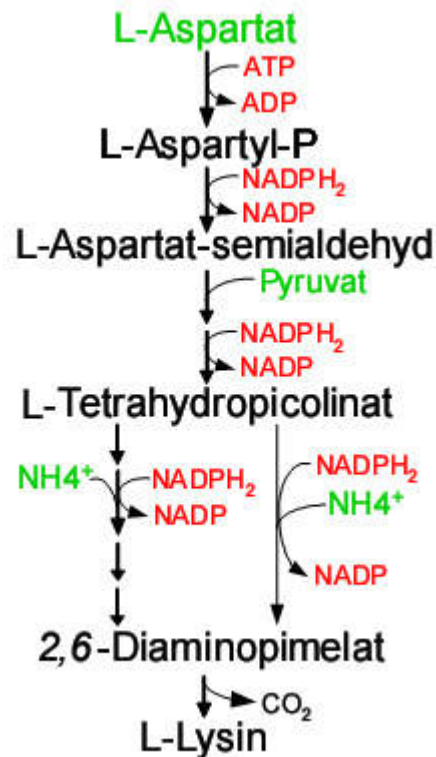
Die Pyruvat-Carboxylase-Reaktion ist typisch für einige *Pseudomonas*-Arten, aber auch für tierische Gewebe.

Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Reaktion:



Die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Reaktion ist offenbar bei Bakterien am weitesten verbreitet.

L-Lysin



- A: Regulation der Aspartokinase bei der Biosynthese von L-Lysin und L-Threonin in *C. glutamicum*
- B: Konformation der aktiven Aspartokinase mit katalytischen α-Untereinheiten und regulatorischen β-Untereinheiten und katalysierte Reaktion
- C: Konformation der Feedback-inhibierten Aspartokinase mit veränderter Konformation durch Bindung von L-Threonin und L-Lysin an die regulative Untereinheit (C).

L-Lysin Produktion in *C. glutamicum*

seit den 60er Jahren zahlreiche Mutationen an *C. glutamicum* durchgeführt, wobei der ursprüngliche Ausgangsstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 in hocheffiziente Produktionsstämme verbessert wurde. Dabei wurden verschiedene Strategien eingeschlagen.

Stammsoptimierung: die natürlichen Regulationsmechanismen der Zelle außer Kraft setzen, so dass auch bei hohen intrazellulären Konzentrationen eines Produktes kein Abschalten des Syntheseweges erfolgt. Die unkontrollierte Produktion führt dann zur Akkumulation und Sekretion ins Medium.

klassische und gezielte Stammsoptimierung zur Deregulation der ***Aspartokinase*** (Entkopplung von Feedback-Inhibierung), die sich als Schlüssel zur Optimierung der L-Lysin-Produktion gezeigt haben.

Klassischer Weg

Abschalten der Synthese von L-Threonin, das nicht direkt im L-Lysin-Syntheseweg selber liegt. In diesem Fall kann die Zelle selber kein L-Threonin synthetisieren (**Auxotrophie**). Dadurch entfällt die gemeinsame Feedback-Inhibierung durch L-Lysin und L-Threonin, da L-Lysin alleine die Aspartokinase nicht regulieren kann.

-auf klassischem Wege durch chemische Zufallsmutagenese und anschließende Selektion auf L-Threonin-Auxotrophie (=Threonin-Bedürftigkeit).

Die Mutante besitzt einen Defekt in der Homoserin-Dehydrogenase, dem ersten Enzym der L-Threonin-Synthese, kann also kein L-Threonin synthetisieren. Solange L-Threonin im Medium enthalten ist, ist die Feedback-Inhibierung der Aspartokinase durch L-Lysin und L-Threonin aktiv, es wird also kein L-Lysin sekretiert. Erst mit dem Aufbrauchen von L-Threonin beginnt, bei gleichzeitigem Stopp des Wachstums, die L-Lysin-Überproduktion.

Vermutlich weisen diese Mutanten neben diesem Defekt weitere unbekannte Mutationen auf, die unter Umständen Wachstum und Produktbildung negativ beeinflussen („Metabolic Burden“).

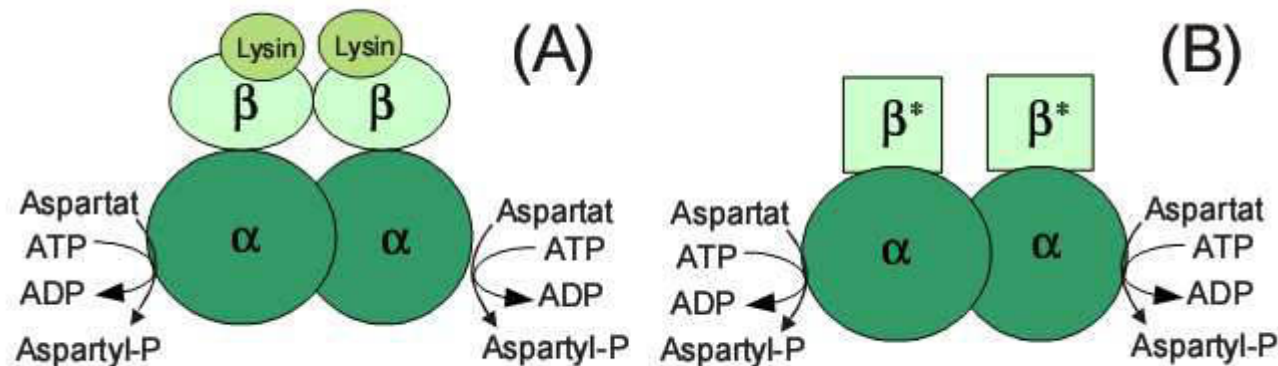
Gerichtete Mutation

Für die Bildung von L-Lysin wurden gezielt **Feedback-resistente Mutanten** der Aspartokinase entwickelt, die von der Feedback-Inhibierung durch L-Threonin und L-Lysin entkoppelt sind.

Dabei ist durch eine Mutation in der Aminosäuresequenz die Konformation des Enzyms so verändert, dass L-Lysin und L-Threonin nicht mehr an die regulatorische Untereinheit binden können.

Dadurch bleibt der Stoffwechselweg auch bei hohen intrazellulären Konzentrationen an L-Threonin und L-Lysin aktiv (lysC Mutante von *C. Glutamicum*).

Zusammenfassung der Stammverbesserung Lysin-Hochproduzenten

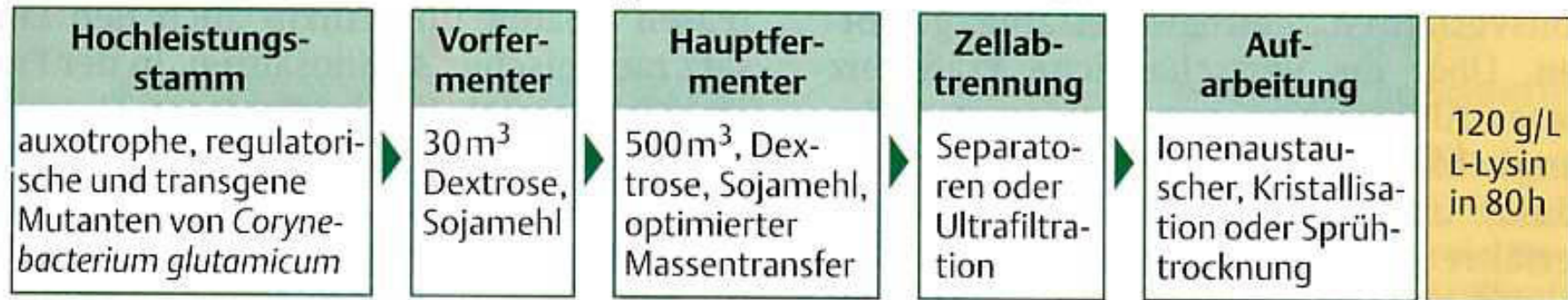


Deregulation von Aspartokinase zur Überproduktion von L-Lysin:

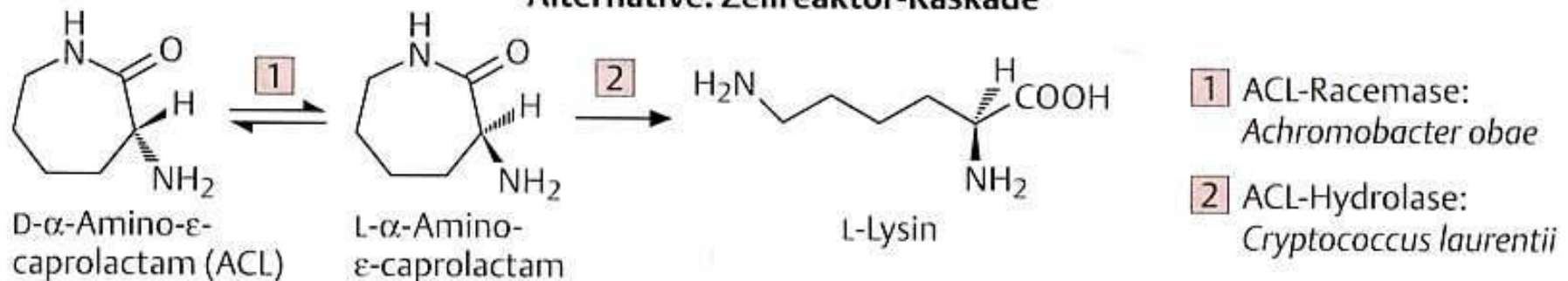
- A: Deregulation durch L-Threonin-Mangel über eine Knockout-Mutation der Homoserin-Dehydrogenase im L-Threonin-Syntheseweg
- B: Deregulation über eine Mutation der regulatorischen Untereinheit der Aspartokinase, die über eine entsprechende Konformationsänderung keine Bindung von L-Threonin und L-Lysin mehr ermöglicht.

Herstellung von L-Lysin mittels Fermentation oder Biokatalyse

bevorzugtes Verfahren: Fermentation



Alternative: Zellreaktor-Kaskade



Begriffliche Abgrenzung

Biotransformationen ..

..setzen definierte Edukte (“precursors”) in einer Serie von definierten (allerdings nicht immer genau bekannten) Schritten mit Enzymen oder ruhenden Zellen in ein gewünschtes (und definiertes) Produkt um.

Fermentationen ..

..transformieren Rohmaterialien wie Zucker, Stärke, Methanol (u.ä.) oder industrielle Mischsubstrate wie Melasse mittels lebender Zellen in ein gewünschtes, zum Teil komplexes Produkt. Anmerkung: Häufig handelt es sich dabei um Produkte des Primär- oder Sekundärmetabolismus

Edukt Fermentationen (“precursor fermentations”) ..

..starten mit definierten Edukten und transformieren sie mit lebenden Zellen in das gewünschte Produkt. Anmerkung: Viele biologische Redoxtransformationen fallen in diesen Bereich.

Enzymtechnologische Prozesse fallen häufig in den Bereich der Biotransformationen und Edukt Fermentationen. Weiters werden Enzyme in der Biotechnologie als Prozesshilfsmittel, in der Analytik und als Therapeutika eingesetzt.

Biotransformationen und Enzymreaktoren

- Bei der Biotransformation werden Substrate durch Mikroorganismen oder immobilisierte Enzyme modifiziert
- Vorteile von Biotransformationen:
 - ◆ Molekül-Modifikationen lassen sich unter milden pH- und Temperaturen durchführen
 - ◆ katalysieren eine Vielzahl von Reaktionstypen
 - ◆ besitzen große Spezifität
- Nachteile von Biotransformationen
 - ◆ Empfindlichkeit gegen pH und Temp - Archebakterien

Enzyme

- Oxidoreduktasen
Oxidations- und Reduktionsreaktionen
- Transferasen
Transfer chemischer Gruppen
- Hydrolasen
hydrolytische Spaltung von Bindungen
- Lyasen
nicht hydrolytische Spaltung von Bindungen
- Isomerasen
Änderung der Anordnung von Atomen in Molekülen
- Ligasen
Verbindung von Molekülen

Biotransformation in Bioreaktoren

➤ Voraussetzung für die Nutzung von Enzymen:

- ◆ Biomasse leicht produzierbar
- ◆ Viel Enzym in der Biomasse vorhanden
- ◆ Leichte Reinigung des Enzyms
- ◆ Operative Stabilität muss gegeben sein (T, pH, LM-Verträglichkeit)
- ◆ Hohe Spezifität, hohe Aktivität

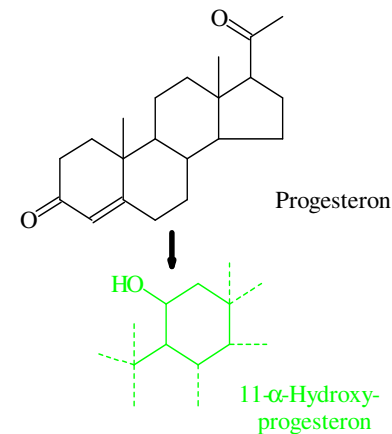
➤ Optimierung von Biokonversionsverfahren:

- ◆ Screening neuer geeigneter MOs und Pflanzenzellen mit gewünschten katalytischen Aktivitäten
- ◆ Optimierung der isolierten Stämme durch klassische Mutagenese/Selektionsstrategien aber auch mit gentechnischen Verfahren
- ◆ Verfeinerung der Züchtungsbedingungen und der Produktionsstrategien
- ◆ Auffinden optimaler Reaktionsbedingungen für die Umsetzung mit ganzen Zellen oder der rohen oder gereinigten Enzyme
- ◆ Technische Lösungen finden (z.B. Regenerierung des Cofaktors, Immobilisierung)

Oxidoreduktasen

- Entfernen Wasserstoffatome aus einem Donor-Molekül und übertragen gleichzeitig Wasserstoffatome auf ein Akzeptor-Molekül.
- Modifikation von Steroiden:
Aus verschiedenen Vorstufen werden Steroide hergestellt, die zu verschiedenen Produkten modifiziert werden können. 1952 wurde die erste pharmazeutisch industriell wichtige Reaktion an Steroiden gefunden:
 - ◆ Die 11-alpha-Hydroxylierung von Progesteron

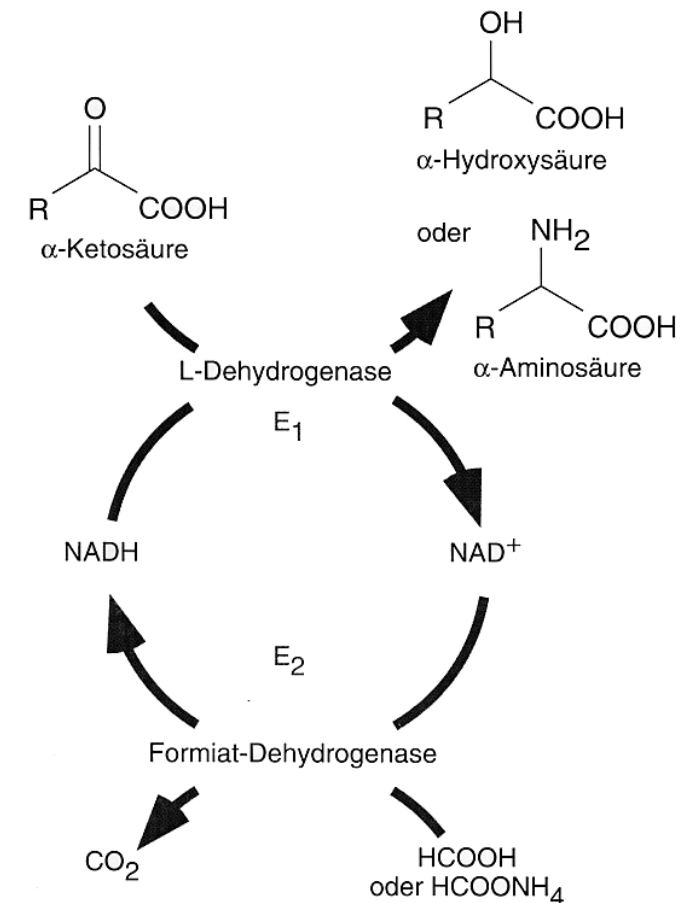
Die mikrobielle Hydroxylierung von Progesteron führt zum 11- α -Hydroxyprogesteron (zumeist Pilzenzyme)



Oxidoreduktasen

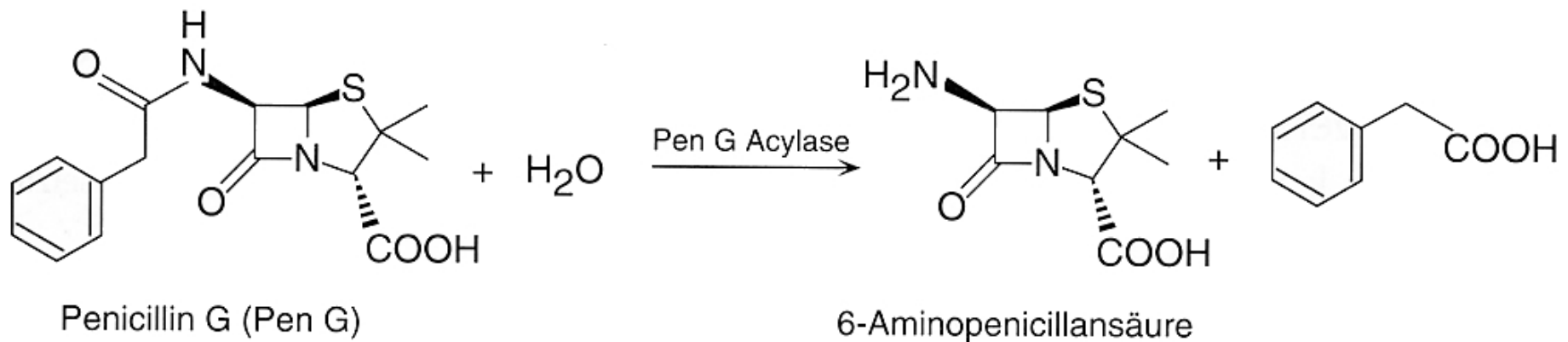
- Aminosäure-Dehydrogenasen (L-Aminosäure-Dehydrogenasen) bilden durch reduktive Aminierung von alpha-Ketosäuren L-Aminosäuren.
- Die Dehydrogenase benötigt als Cofaktor NADH
 - ◆ dieses muss im Prozess regeneriert werden
 - ◆ meist zu teuer für proteinogene AS

Die reduktive Aminierung mit immobilisierter L-Leucin-Dehydrogenase aus *Bacillus species* braucht neben NH_3 auch noch NADH, das sehr teuer ist und daher regeneriert werden muss. Dies wird sehr elegant mit Formiat-Dehydrogenase (FDH) gemacht, die aus *Candida boidinii* stammt, wobei das als Gas entweichende CO_2 die Gleichgewichtsreaktion in Richtung des L-Leucins verschiebt



Hydrolasen

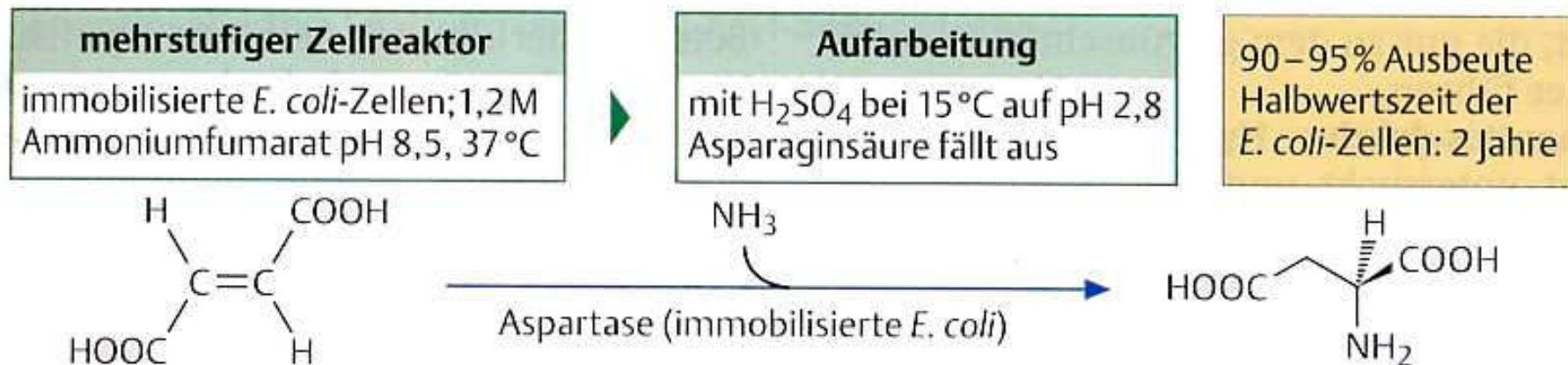
- Penicillin G-Acylase stellt semisynthetisch Penicillin her.
- Ausgangspunkt der Weiterverarbeitung ist zumeist die 6-Aminopenicillansäure, die enzymatisch aus Penicillin G (Herstellung im Fließbett-fermentor) mit Penicillin-G-Acylase gewonnen wird.
- exakte Einstellung des pH-Werts nötig, um eine Hydrolyse des beta-Lactamringes zu verhindern. Ausserdem muss das Enzym völlig frei von beta-Lactamase sein



Lyasen

- Lyasen spalten von einem Substrat Gruppen über einen nicht-hydrolytischen Mechanismus ab, wobei sie eine Doppelbindung hinterlassen.
- Sie katalysieren in der Umkehrreaktion die Anlagerung einer Gruppe (H_2O , NH_3 ..) an eine Doppelbindung
- Aspartase addiert an die Doppelbindung der Fumarsäure NH_3 , sodass enantio-selektiv L-Asparaginsäure entsteht. Die L-Asparaginsäure wird hauptsächlich für die Herstellung von Aspartam benötigt.

Herstellung von L-Asparaginsäure



Fumarsäure ist eine ungesättigte Dicarbonsäure, mit dem chemischen Namen trans-Butendisäure. Das cis-Isomer der Fumarsäure ist die Maleinsäure. Fumarsäure bzw. Fumarat ist ein intermediäres Oxidationsprodukt des pflanzlichen und tierischen Stoffwechsels (Citratcyklus, Harnstoffzyklus).

Wichtige Subfamilien der Lyasen: Decarboxylasen, Hydrolasen

- **Fumarase (Fumarat-Hydratase)** katalysiert die Umwandlung von Fumarsäure in Äpfelsäure (Hydroxycarbonsäure) durch Anlagerung von H_2O an die Doppelbindung (im Zitratcyclus).
Das Bakterium *Brevibacterium flavum* wird dazu im Carrageenan-Gelen mit Polyethylenimin immobilisiert.
- **L-Aspartat-beta-Decarboxylase** aus *Pseudomonas dacunhae* katalysiert die Decarboxylierung von L-Aspartat zu L-Alanin. Daher kann L-Alanin sehr preiswert durch Biotransformation hergestellt werden.

Isomerasen

- Isomere sind Moleküle gleicher Summenformel aber verschiedener Strukturformel
- Katalysieren die Umlagerung optischer, geometrischer oder sonstiger isomerer Verbindungen.
- **Glucose-Isomerase** isomerisiert Glucose zu Fructose
Glucose-Isomerase isomerisiert auch Xylose zu Xylulose im Festbettreaktor.

Tab. 12: Aus GMO fermentativ gewonnene Zusatzstoffe oder Zutaten

Zusatzstoffe oder Zutaten aus GMO	
Arginin	Guanylat
Leucin	Inosinat
Isoleucin	Diacetyl
Lysin	β -Carotin
Methionin	Fettsäuren
Phenylalanin	Vitamin B ₂ (Riboflavin)
Threonin	Vitamin B ₁₂ (Cobalamin)
Tryptophan	Natamycin
Glutaminsäure	Nisin
Iso-Ascorbinsäure	Thaumatococcus

Steroide

Ein wirtschaftlich erfolgreiches Produkt aus der Biotransformation ist die Herstellung von Steroiden aus Sterolen.

Steroide sind eine Gruppe von 10.000 natürlich vorkommenden und synthetischen Verbindungen, von denen viele pharmazeutisch eingesetzt werden.

Beispiele sind:

- Vitamin D (Calciferol),
- Entzündungshemmer (Corticosteroide)
- Ovulationshemmer (Estrogene und Gestagene)
- Digitalis-Glykoside
- Diuretika (Spironolacton)

Steroide – industrielle Synthese

1. Chemischer Abbau der Seitenkette aus pflanzlichen Naturstoffen

2. verschieden Typen der Biotransformation:

Der Seitenkettenabbau von beta-Sitosterol zu Androsta-4-en-3,17-dion (AD), Androst-1,4.dien-3,17-dion (ADD) oder die 11-beta-Hydroxylierung von Cortexolon (Reichstein Synthese).

meist chemischer Abbau der Seitenketten von pflanzlichen und tierischen Naturstoffen :

Diosgenin pflanzlicher Naturstoff

Gallensäuren aus Schlachttierabfällen

Stigmasterol aus Soja

Für den mikrobiellen Abbau der Seitenketten stammen die Enzyme aus:

Mycobakterium

Nocardia

Arthrobacter

Corynebacterium

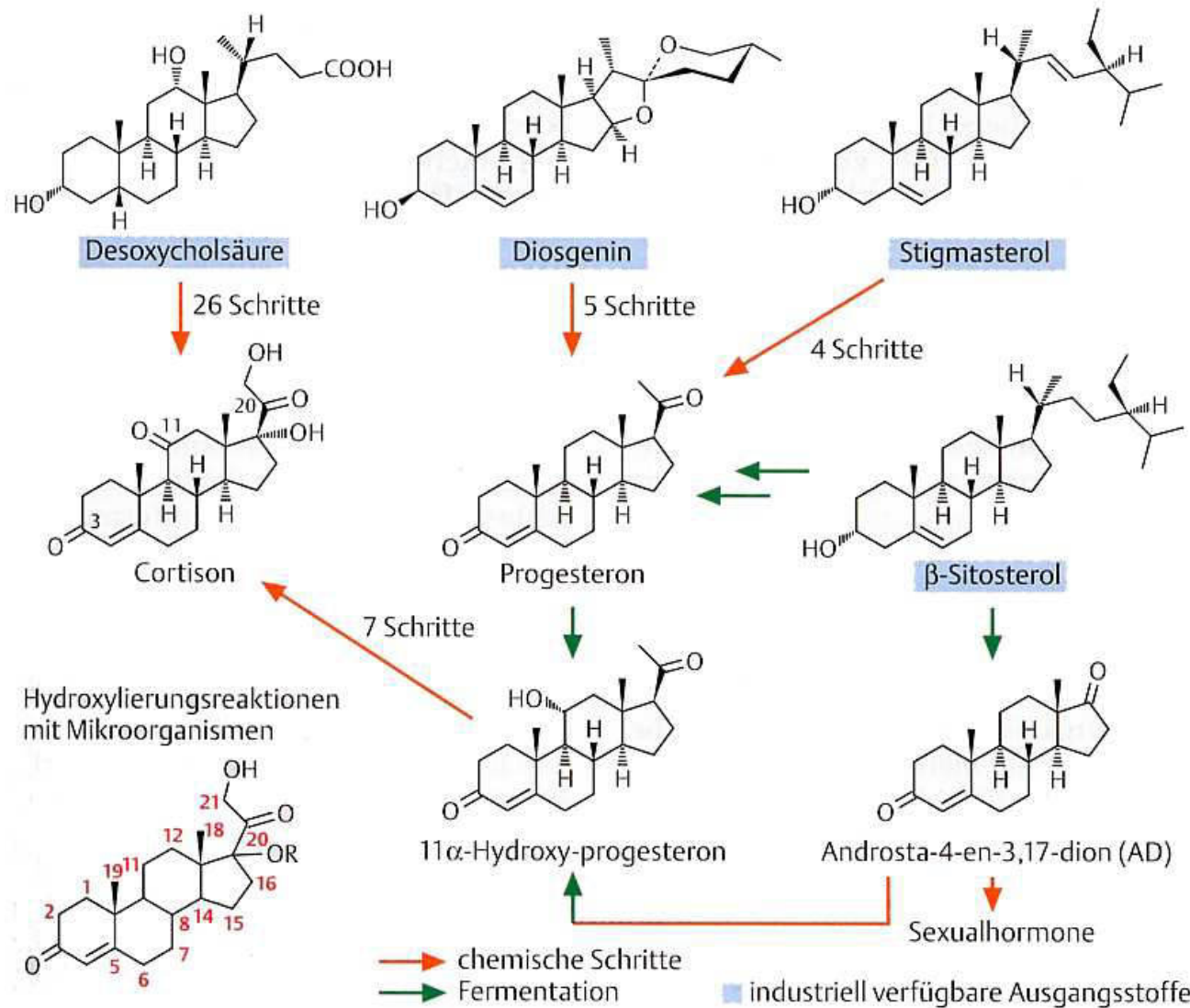
Als Ausgangsmaterial wird meist beta-Sitosterol verwendet

3. Totalsynthese von Pregnenolon aus Zucker:

wirtschaftliche Ausbeute gentechnisch optimierter Reaktionen noch nicht ausreichend;
ähnlich der biotechnologischen Herstellung von Ascorbinsäure

Herstellung von Steroiden

Ausgangsstoffe und Umwandlungsschritte



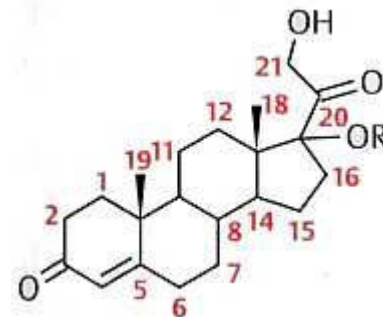
Reichstein Hydroxylierung

11 β -Hydroxylierung von Reichstein S mit *Curvularia lunata*

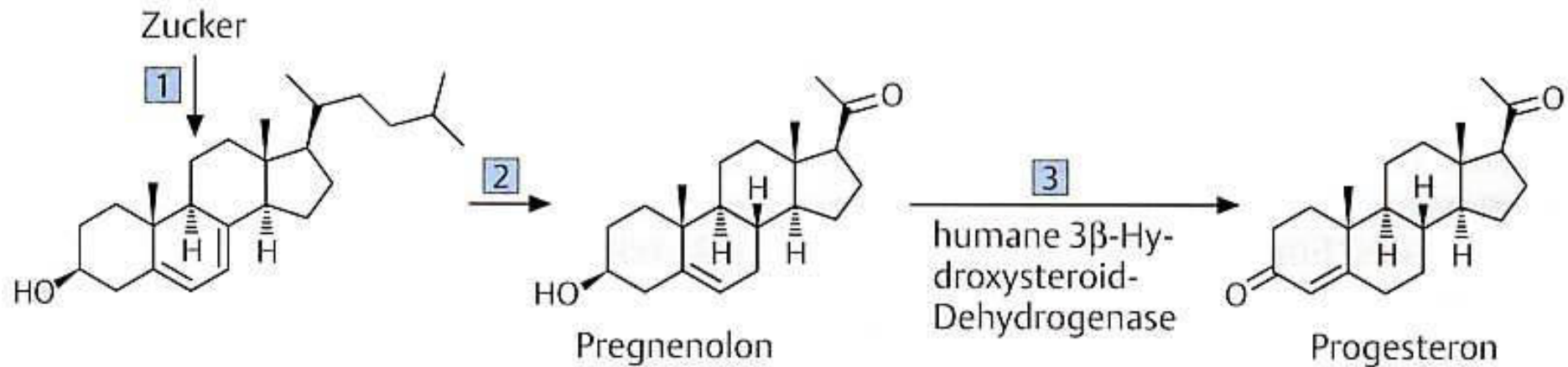


durch Acetylierung des Substrats an der 17-Hydroxy-Gruppe wird die unerwünschte Hydroxylierung an Position 7 α und 14 α unterbunden

Die Biotransformation dieses 17 α -Acetat-Ester Substrates in einem Fermentationsprozess erfolgt mit hoher Regio- und Stereospezifität.



Steroidsynthese aus Zuckern mit rekombinanter Backhefe



- 1 Backhefe-Stoffwechsel
- 2 einklonierte Gene vom Rind, Menschen und *Arabidopsis thaliana*
- 3 einkloniertes Gen vom Menschen

Reinkulturen

Reinkulturen sind Voraussetzung für die Herstellung von

Bakterien

1. Einzelzellen trennen - Kolonien (Klon)
2. Vereinzeln unter dem Mikroskop (Mikromanipulator)
3. Verdünnungsausstrich
4. Verdünnungsreihe

Pilze

1. Einspor- bzw. Einzell-kultur
 - mit dem Präpariermikroskop
 - mit dem Mikromanipulator
 - Plattierungsmethoden: Zählung, Verdünnungsreihe, ausplattieren
2. Selektive Kultivierungsmethoden
 - Bakterielle Infektionen in Pilzkulturen können mit Antibiotika leicht entfernt werden

Anlegen von Reinkulturen

Ziel der sterilen (aseptischen) Arbeitstechnik ist:

Die Vermeidung einer Kontamination (=Verunreinigung) von Nährmedien, Lösungen, Geräten, Reinkulturen von MO durch unerwünschte Keime (unbekannte Bakterien, Pilze)

Schutz der Umwelt und arbeitender Personen vor einer Kontamination bzw. Infektion durch die Versuchskulturen (besonders wichtig bei Arbeiten mit MO ab Sicherheitsstufe 2)

Pilze

Einspor- bzw. Einzell-kultur

- mit dem Präpariermikroskop
- mit dem Mikromanipulator
- Plattierungsmethoden: Zählung, Verdünnungsreihe, ausplattieren

Selektive Kultivierungsmethoden

- Bakterielle Infektionen in Pilzkulturen können mit Antibiotika leicht entfernt werden

Haltung und Lagerung

- Degenerationserscheinungen bei längerer vegetativer Vermehrung
- Temperaturabsenkung nur begrenzt zielführend
- Aufbewahrung unter chemisch inerten Flüssigkeiten
Einfrieren in fl. N₂ oder bei -70°C unter 10-20% Glycerin
Eintrocknen von Suspensionen unter Vakuum mit Trägermaterial (Sand, Silicagel), Emulgatoren (Magermilch, oder Serum), und Lagerung bei niedriger Temperatur in verschlossenen Ampullen oder Exsiccator
- Lyophilisation: einfrieren von konzentrierten Zellsuspensionen mit flüssigem N₂,
- Trocknung in Gegenwart von Schutzflüssigkeit (Serum, Glycerin) im Vakuum - Mutabilität am geringsten

Herstellung von Zellbanken

- Selektion oder Isolierung eines Produktionsstammes
- Überprüfung der kritischen Qualitätssicherungsparameter
- Anlegen einer Forschungszellbank (RCB)
- Anlegen einer Master- Zellbank (MCB)
- Anlegen einer Master-Arbeitszellbank (MWCB, WCB)

Validierung und Kontrolle von Zellbankensystemen

- Durch Validierung soll die Zuverlässigkeit eines Produktionsprozesses demonstriert und eine vorgegebene Qualität eines Produktes reproduzierbar garantiert werden
- Zugelassene Produkte dürfen nur aus dem, von der Zulassungsbehörde genehmigten Zellbankensystem (MCB, WCB) isoliert werden
- Ist die Zellbank erschöpft, muss eine neue MCB erstellt, validiert und genehmigt werden
- Unterteilung in primäre Master-Zellbank (master seed lot) und sekundäre Arbeitszellbank (working seed lot)
- Nach GMP (good manufacturing practice) Richtlinien – Schutz von Personal und Material, Risiko der Kontamination minimiert, kontrollierte Umgebung
- Lagerbehälter eindeutig gekennzeichnet, in eigenem Raum
- Lagertemperatur kontinuierlich aufzeichnen
- Produktionsstamm ist zumeist eine Kombination aus Wirt und Vektor, deshalb müssen die Stabilität der Zellelinie und der darin befindliche Vektor geprüft werden

Identitäts-, Qualitäts- und Sicherheits- kriterien für MCB und WCB

- Kontrolle auf Reinheit der Zellpopulation (bakterielle Fremdinfectionen, Phagen)
- Kontrolle auf Identität
- Kontrolle auf Stabilität – hauptsächlich Plasmidstabilität

Produktprüfung

- Produktivität (Quantität)
- Charakterisierung (Qualität)

Stammverbesserung

MO, die ein bestimmtes verwertbares Produkt herstellen, werden zur Produktion herangezogen und einer Ertragssteigerung unterzogen

•Stammverbesserung durch genetische Manipulation:

- Eukaryonten - Prokaryonten
- Sexualzyklus - vegetative Vermehrung
- Wissensstand - Grundlagenforschung

Prozessoptimierung

•Änderung der äußeren Bedingungen:

- Verfahrensoptimierung
- Reinigungsoptimierung

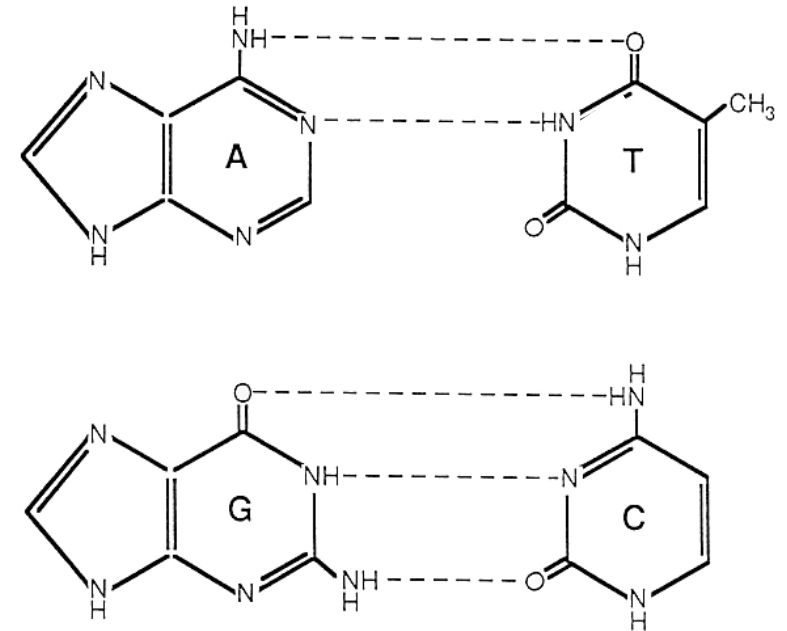
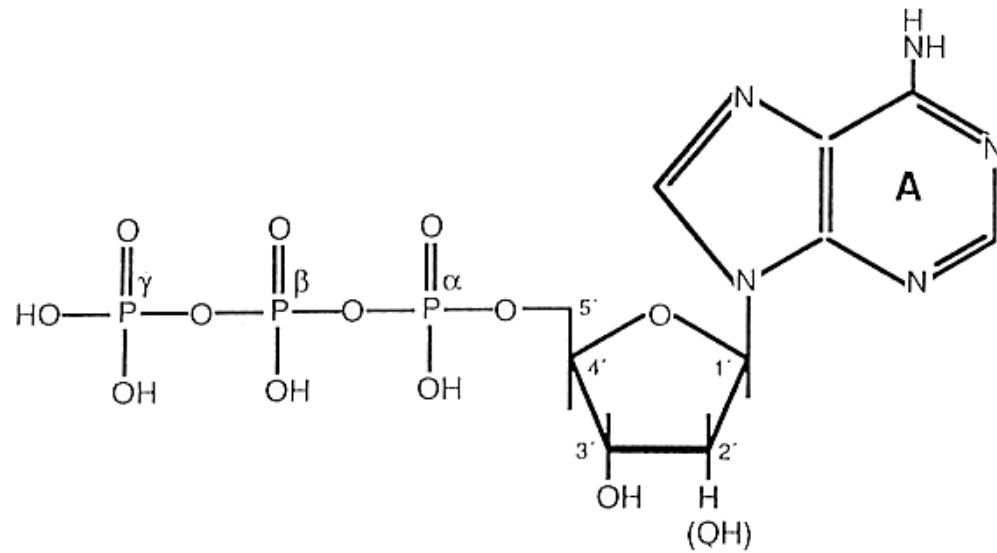
Stammverbesserung

- Selektion - vor allem in der Pflanzen- und Tierzüchtung:
 - Nährböden
 - klimatische Bedingungen
 - hygienische Verhältnisse
- Screening:
 - Suche nach Hochproduzenten
 - Veredelung dieser
- Mutation ist die gewollte Auslösung genetischer Veränderungen
 - mit erblicher Konstanz

Mutationen

- Genmutationen wirken sich auf Expression oder Aktivität des Genprodukts aus
 - Punktmutationen verändern Basenpaarungen (Änderung des codons, stopp-codon)
 - Rastermutationen verändern den Leseraster oder die codierende Sequenz
 - Insertionen/Deletionen/Translokationen
- Mutationen sind spontane zufällige seltene Ereignisse
- Chemikalien oder Strahlungen erhöhen die Mutationsrate (Mutagenese)
- Primär-Mutationen werden durch (falsche) Reparatur oder Replikation fixiert
- Auswirkung einer Mutation kann durch eine zweite Mutation (Rückmutation oder Suppressormutation) korrigiert werden
- In einer Population gibt es (viele) verschiedene Allele eines Gens und die Allelfrequenz ist stabil (bei zufälliger Paarung)
- Mutationen können zu verschiedenen Allel-Typen führen

Die Basen



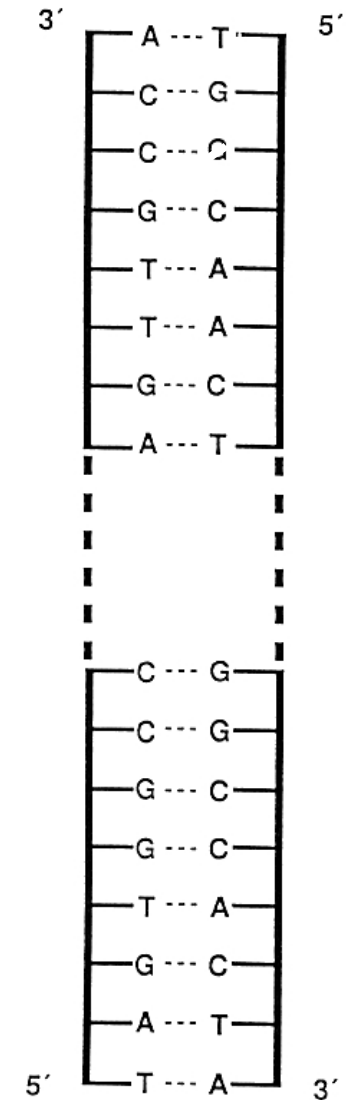
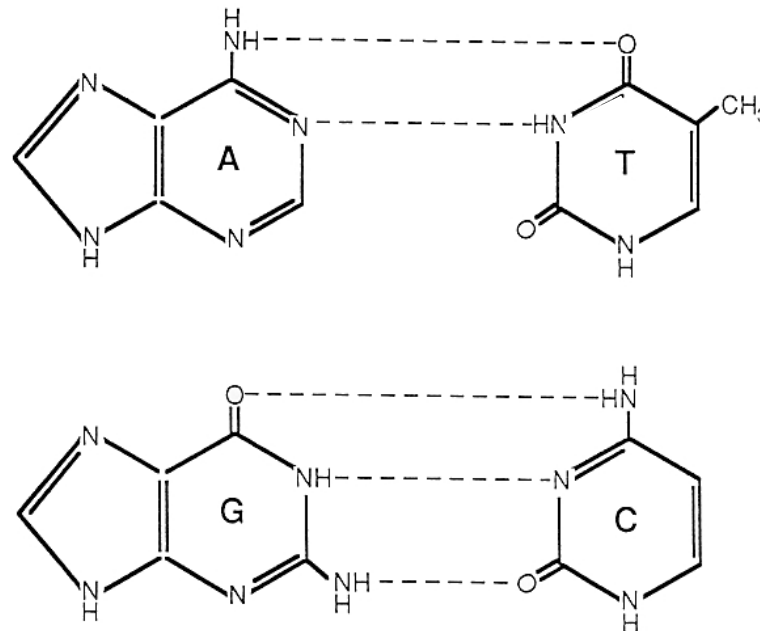
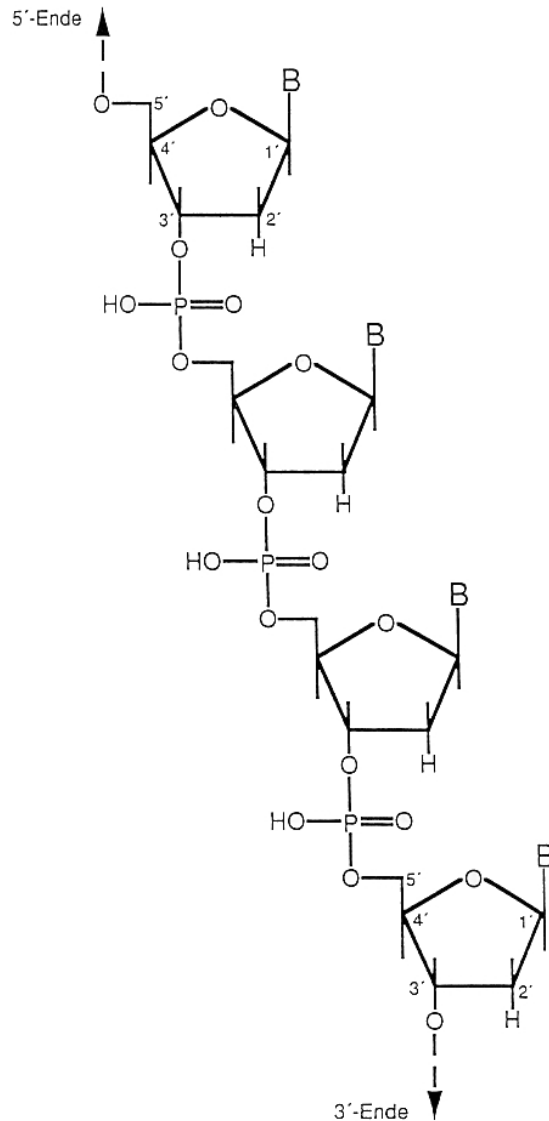
Nucleosidtriphosphat = Nucleotid

Nucleosiddiphosphat = Nucleotid

Nucleosidmonophosphat = Nucleotid

Nucleosid

Gentechnik- Struktur der DNA

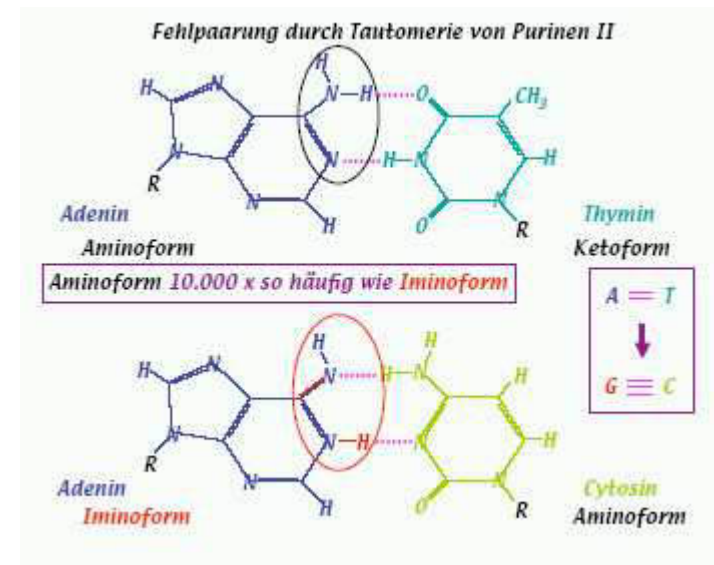
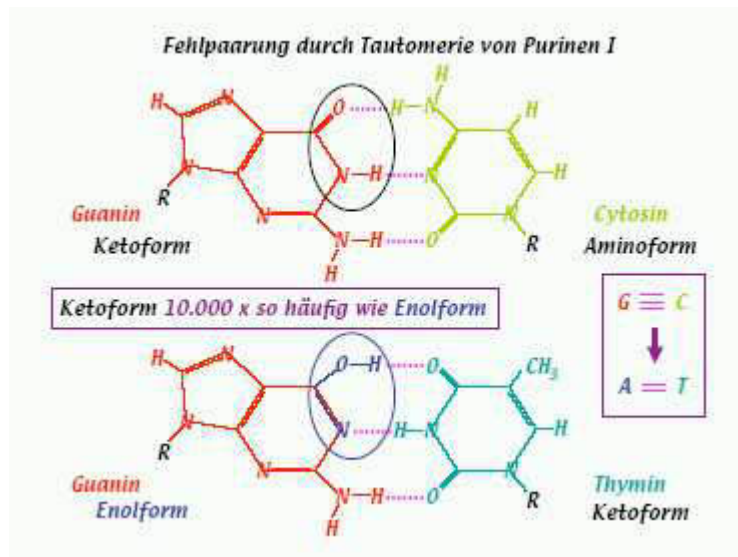


Mutagene

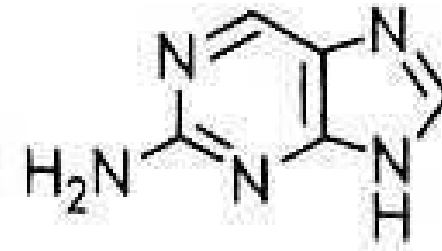
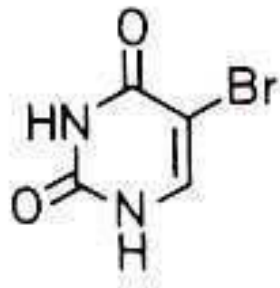
Wirkung	Mutagen	Typ von Mutation
Zufällige Mutationen	Seltene Tautomerien	Alle Typen von Mutation
Basenanaloga	2-Aminopurin	Transition
	Bromdeoxyuridin	
Alkylierende Mutagene	Dimethylnitrosamin, Diethylnitrosamin n-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanin	G-C nach A-T
	Ethylmethansulfonat	G-C nach A-T
	Nitrosoguanin	
Oxidative Desaminierung	Nitrite	G-C nach A-T A-T nach G-C
Interkalierende Substanzen	Derivate von Acridin, Ethidiumbromid	Änderung des Leserasters

Tautomerien

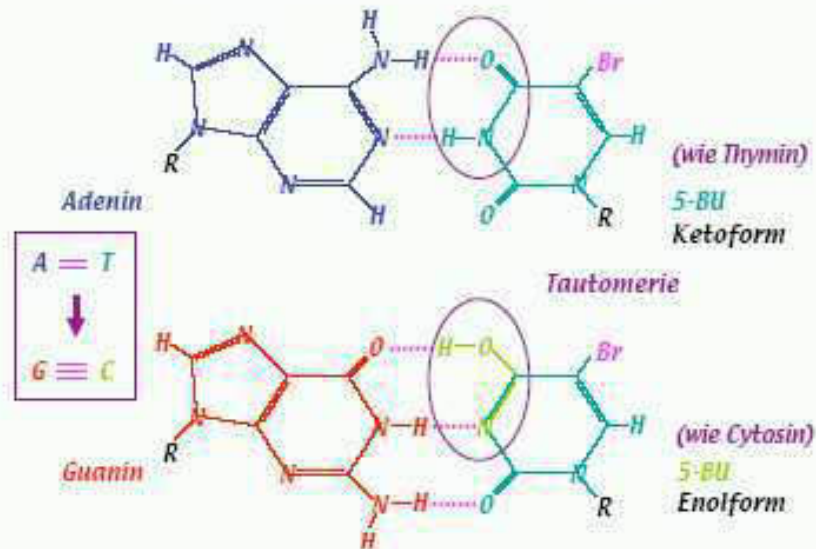
- Durch Keto-Enoltautomerie kann
 - Guanin in der Enolform mit Thymin paaren; dadurch kommt es von einer G-C Paarung zu einer A-T Paarung (Transition)
- Durch Umlagerung von der Amino- in die Iminoform kann
 - Adenin in der Iminoform mit Cytosin paaren; dadurch kommt es zu einer Transition von A-T zu G-C
- Transition ist eine Änderung innerhalb der Purine bzw. Pyrimidine
- Transversion ist der Übergang von Purinen zu Pyrimidinen



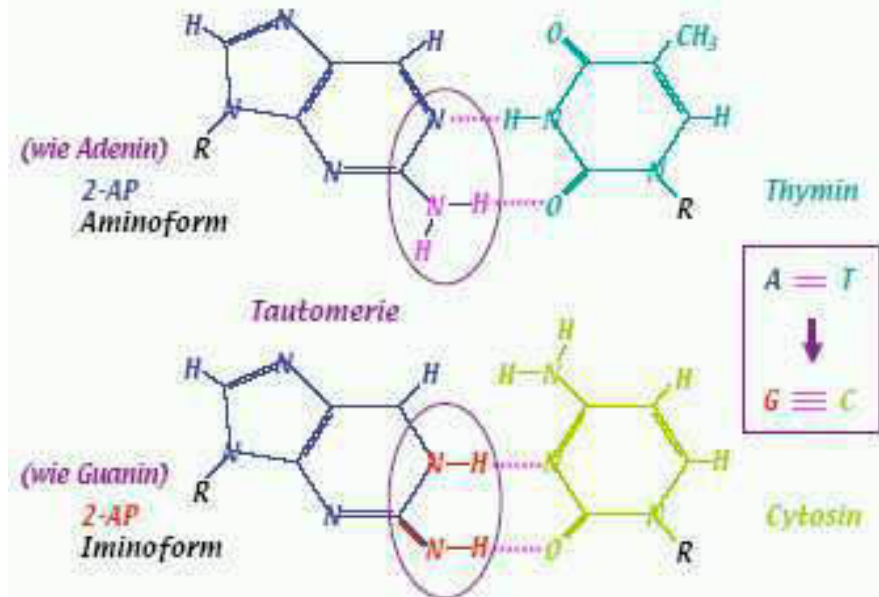
Basenanaloga



Mutagene Wirkung von 5-Bromuracil (5-BU)



Mutagene Wirkung von 2-Aminopurin (2-AP)

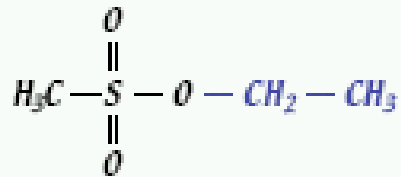


Alkylierende Mutagene

- Durch Methylierung der Ketogruppe am G paart dieses dann mit T
- Beispiele für alk. Mutagene
 - Dimethylnitrosamin, Diethylnitrosamin, Epoxy-Verbindungen, MNNG

Alkylierende Verbindungen

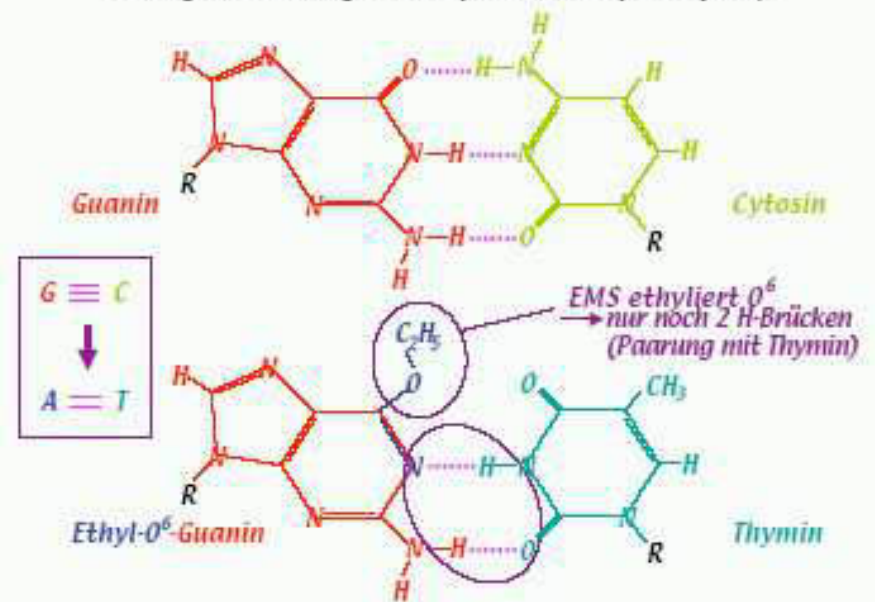
z.B. Ethylmethansulfonat (EMS)



Wirkung

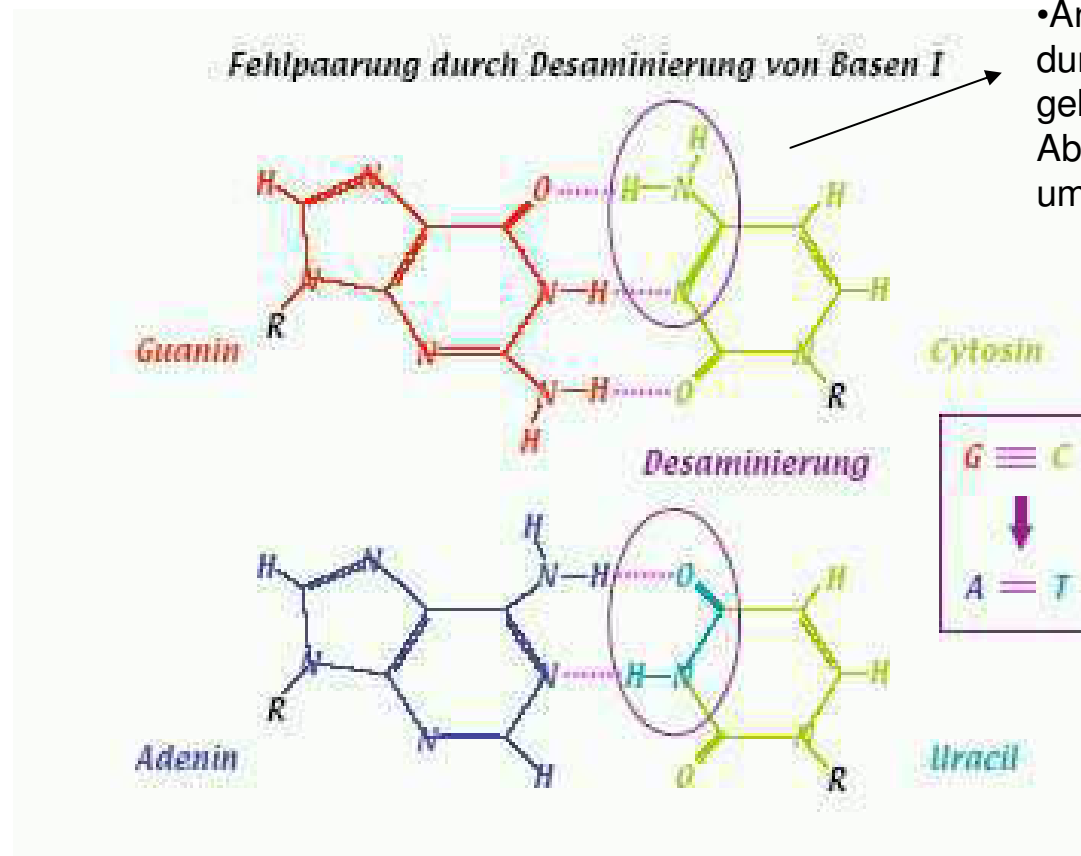
Guanin (vor allem)
> Ethyl-O⁶-Guanin

Mutagene Wirkung von Ethylmethansulfonat (EMS)



Fehlpaarung durch Desaminierung

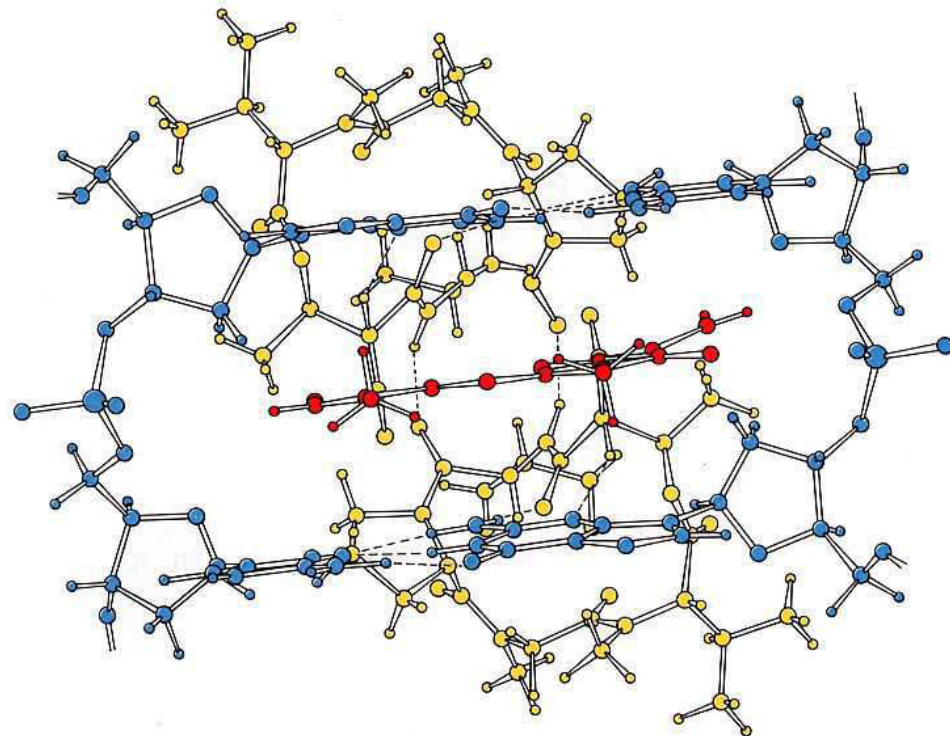
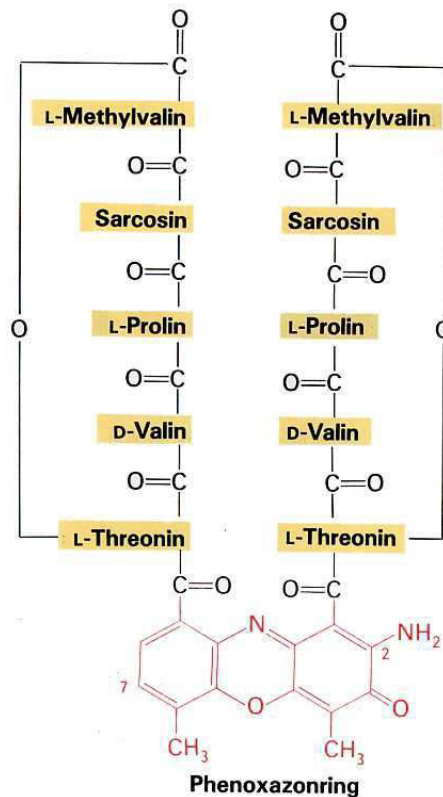
- Durch oxidative Desaminierung
 - entsteht aus Cytosin Uracil, das dann statt mit G, mit A paart



• An diese NH_2 Gruppe wird durch Nitrit eine Azoverbindung gebildet, die sich dann unter N_2 Abspaltung in das Uracil umlagert

Interkalierende Substanzen

- Basenveränderung hat hohe Revertantenhäufigkeit
- Interkalierende Substanzen (Acridinfarbstoffe - Proflavin)
 - durch Einlagerung in die DNA oft Rasterschub



Physikalische Mutagenese

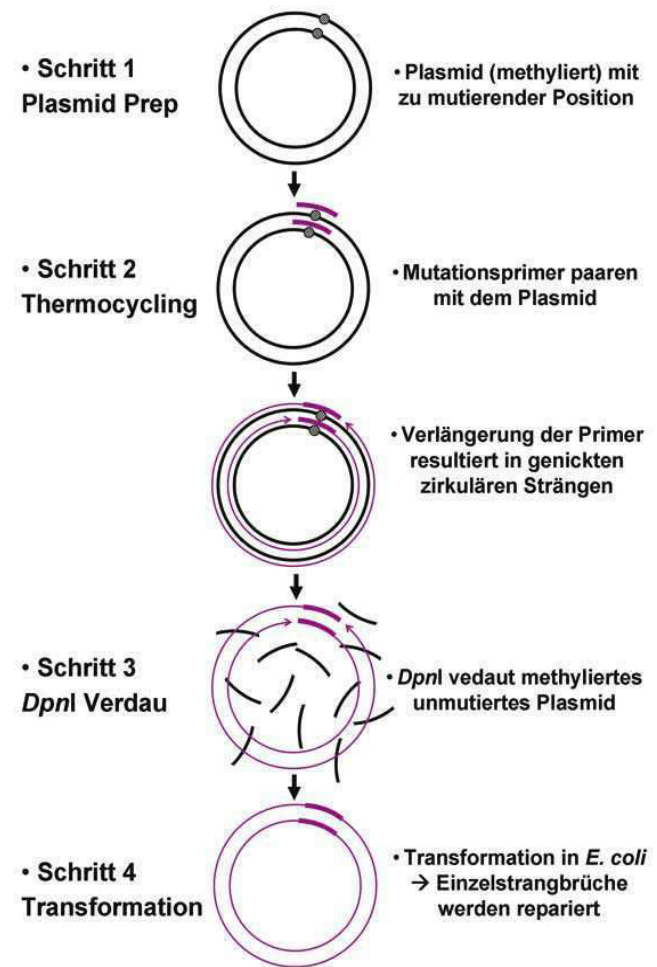
- Röntgenstrahlung (durch Müller 1927 entdeckt)
 - sehr stark
 - Brüche und Deletionen am Chromosom, weniger Punktmutationen
- UV-Strahlung (Knapp 1938, DNA absorbiert bei 260 nm)
 - Punktmutationen - Thymin-dimerisierung
- Radioisotope

Ortsspezifische Mutagenese

- Verschiedene Kits bieten die Möglichkeit der Oligonukleotid-vermittelten gerichteten Mutagenese

- Änderung der Eigenschaften von Proteinen (protein engineering):

- pH-Optimum
- Thermostabilität
- Endprodukt-Hemmung
- Substratspezifität

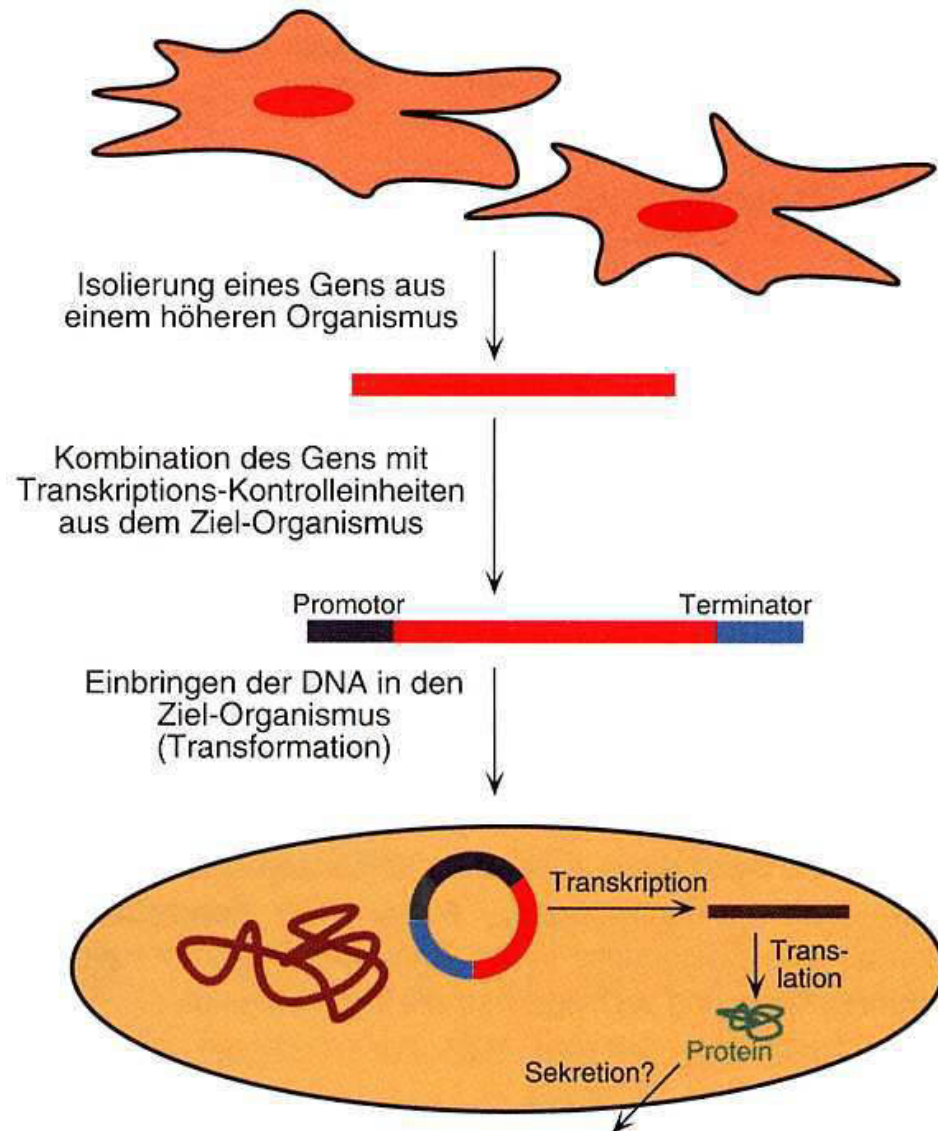


Verfahren zur Isolation von Mutationen

Mutantentyp		Anreicherung	Erkennungstest
auxotrophe	Bakterien	a) Anzucht in Minimalmedium mit Zusatz eines Antibiotikums, das nur auf wachsende Zellen wirkt (z. B. Penicillin)	Ausplattieren auf Kompletmedium und Überstempeln (Lederberg-Technik) auf Minimalmedium mit verschiedenen Supplementen
	Pilze	a) s. Bakterien b) Anzucht in Minimalmedium und Abfiltrieren der gekeimten Myzelien	Ausplattieren auf Kompletmedium und mit Filterpapier-Replica-Technik auf Minimalmedium überstempeln. Test der Verdächtigen auf Minimalmedium mit verschiedenen Supplementen
resistente	Bakterien und Pilze	Ausplattieren einer großen Zahl von Zellen auf feste Nährböden mit Zusatz des hemmenden Stoffes	direkt, da nur die Resistenten in Kolonien heranwachsen

Proteinexpression in Prokaryonten

- Das Fremdgen wird unter Kontrolle einer effizienten Transkriptionseinheit (Promotor) gestellt
- Der Transkriptionsterminator in 3' zum Zielgen, bricht die Transkription ab und verhindert dadurch unnötig lange mRNAs Sicherstellen der Translation
- Die Signalsequenz (leader) leitet das translatierte Protein an einen bestimmten Ort, Bakterien tragen oft keinen leader, dadurch bleibt das exprimierte Protein im Cytoplasma und bildet inclusion bodies (IBs)

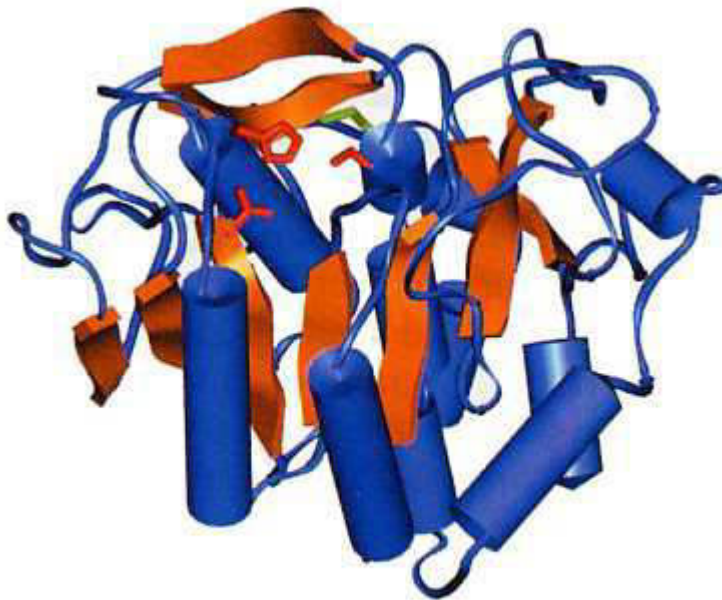


Überträgermoleküle für Fremd-DNA

- Autologe Genexpression: das zu exprimierende Gen wird von der Zelle selbst codiert
- Heterologe Genexpression: das zu exprimierende Gen kommt aus einem Fremdgenom
- Plasmide sind extrachromosomale, circuläre DNA Abschnitte, die nur nicht essentielle Gene ursprünglich tragen. Aus E.coli hat man bereits 300 natürliche Plasmide isoliert.
- Virale DNA
- Cosmide enthalten das cos-Gen, das zum Verpacken in den lambda Phagen benötigt wird, sodass man auch eine Infektion durchführen kann und 30-40 kbp Stücke effizient klonieren kann
- Phagmide sind Klonierungsvektoren, die sowohl als Plasmid als auch als Bakteriophage replizieren kann, sie tragen einen Bakteriophagen-ori. Bei Infektion mit Helferphagen, wird das Phagmid gemeinsam mit der Phagen DNA repliziert und verpackt

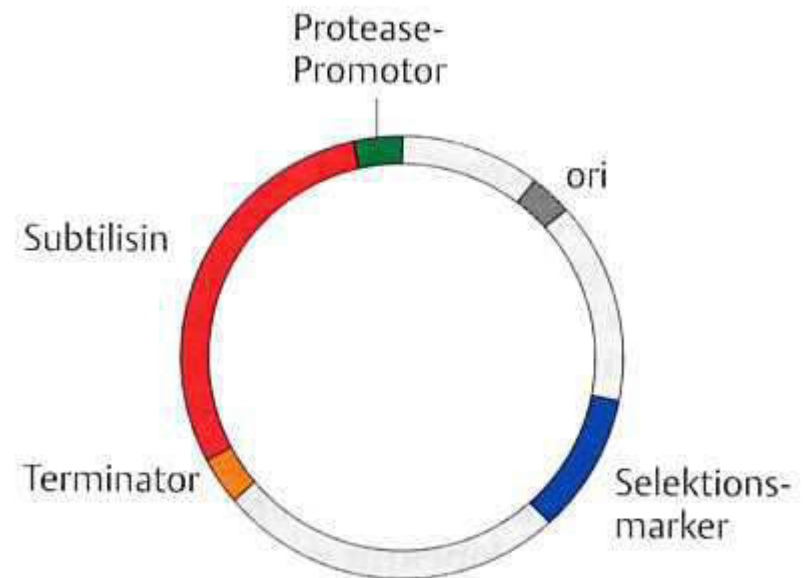
Waschmittelproteasen

•Struktur Subtilisin



Subtilisin Carlsberg (1sbc) bei 0,23 nm. Rot: Katalytische Triade (Ser, Asp, His); grün: Met²²²

•Expressionsvektor



Plasmid zur Expression von Subtilisin Carlsberg in Hochleistungstämmen von *Bacillus lentus*

Enzyme in Waschmitteln

•Waschmittelbestandteile

- Anionische, nicht-ionische oder selten kationische Tenside
- Komplexbildner
- Bleichmittel
- Enzyme
 - Proteasen
 - Cellulasen
 - Lipasen
 - Amylasen

•Waschbedingungen

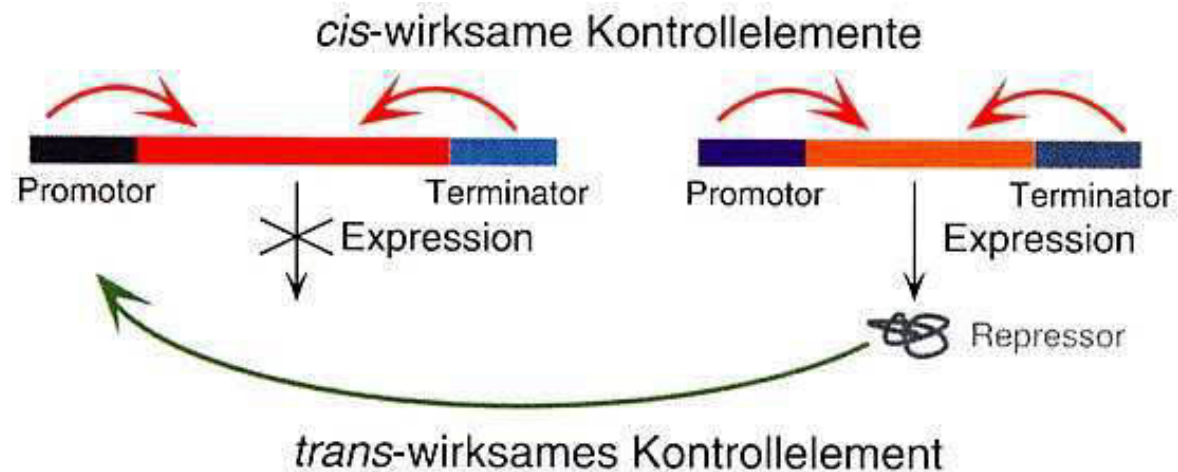
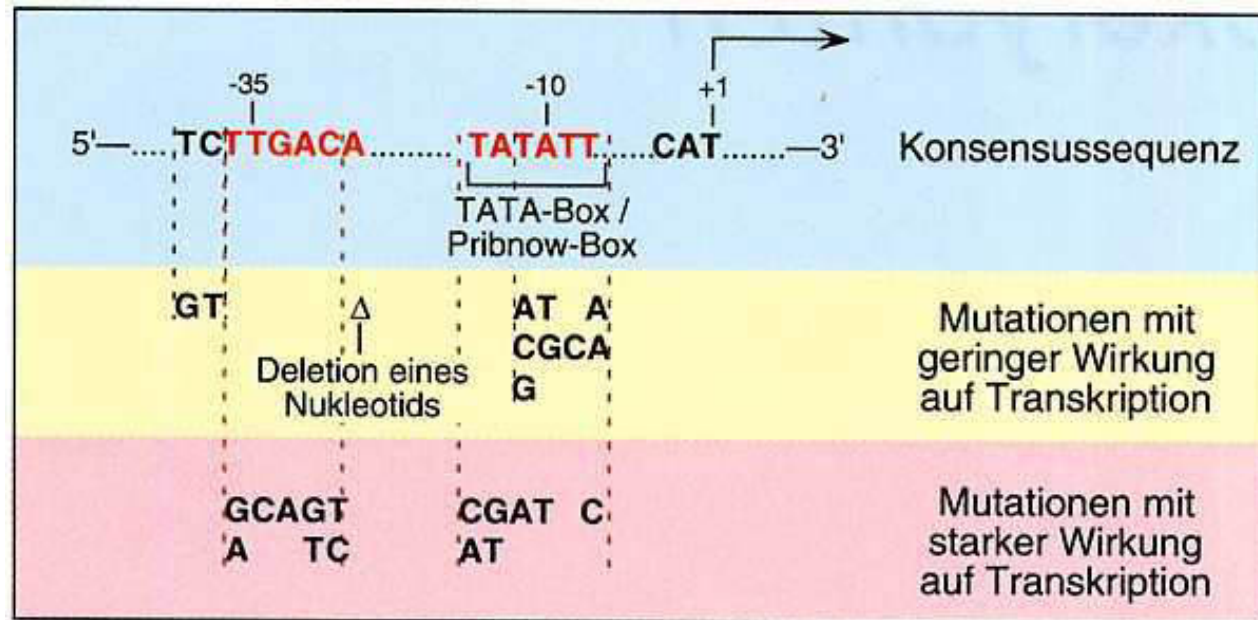
- pH 10
- 30-90°C
- 30 - 60 min

•Vor ca. 100 Jahren setzte Otto Röhm erstmals Pankreas-Enzyme zur Lösung von Eiweißschmutz den Waschmitteln zu. Seit 1960 werden alkalische Proteasen aus Bacillus Stämmen verwendet, die seither durch „protein engineering“ verbessert wurden und durch Cellulasen, Lipasen und Amylasen ergänzt werden.

Enzyme in Waschmitteln

- Es werden ausschließlich Serin-Proteasen (Subtilisine) aus Bacillus-Stämmen verwendet. Früher erfolgte die Produkt- und Stammverbesserung durch Mutagenese und Selektion von Hochleistungsmutanten. Heute werden nur noch rekombinante Bacillus-Stämme mit Mehrfachkopien des Protease-Gens und starken Promotoren verwendet. Durch gezielte Mutagenese sind moderne Waschmittel-Proteasen stabiler gegen Komplexbildner. So wurde das oxidationslabile Met222 ausgetauscht.
- Bei der Fermentation wird nach Anzucht der Zellmasse die Protease-Bildung meist durch Zugabe des promoterspezifischen Induktors eingeleitet, und ist nach spätestens 72 Stunden abgeschlossen. Dann kommt die Zellmassenabtrennung durch Separieren und Filtration, und das extrazelluläre Enzym wird durch Fällung und Ultrafiltration konzentriert und partiell gereinigt. Diese Enzyme können nach wiederholter Inhalation allergische Reaktionen auslösen und müssen deshalb als verkapselte und staubfreie Granulate eingesetzt werden. Dazu wird das Enzym mit Zuschlagstoffen wie Salzen, Wachsen oder Stabilisatoren in schnell laufenden Mischern granuliert oder im Wirbelschichtverfahren auf einen Kernpartikel aufgesprüht. Die Granulate werden mit einer Coating-schicht von Wachs und Pigment verkapselt. Dadurch wurde in umfangreichen Hautstudien keine Allergie mehr nachgewiesen. Andere mögliche (nicht) verwendete Proteasen sind Cystin-Proteasen, Carboxy-Proteasen, Metalloproteasen.

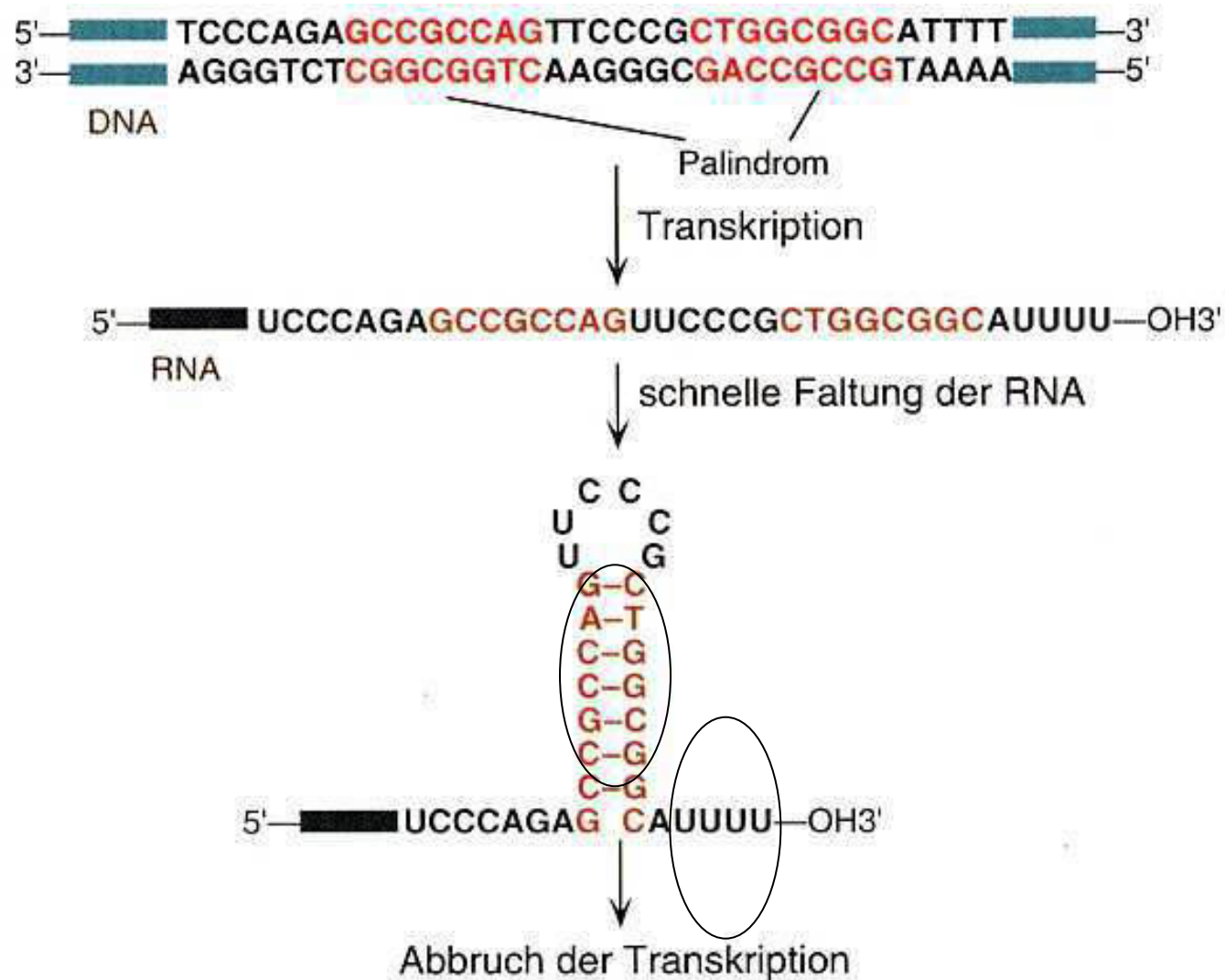
Bakterielle Promotoren



Bakterielle Promotoren

- Der Promotor ist eine kurze Sequenz vor dem Zielgen, damit die bakterielle RNA-Polymerase binden kann (Transkriptionskontrolleinheit, Promotor). Der Promotor gibt vor wie stark die RNA-Polymerase gebunden wird (Affinität), und das Gen entsprechend effizienter abgelesen wird.
- Das erste nt, das in RNA überschrieben wird bezeichnet man als +1 Initiationsnukleotid, die Nukleotide, die stromaufwärts davon liegen werden entsprechend dem Zahlenstrahl nummeriert.
- Ein typischer E.coli Promotor:
 - Die -10 Region (upstream von der Transkriptionsinitiation) ist bei allen E.coli Promotoren sehr ähnlich (Konsensus-Sequenz) und lautet 5'-TATATT-3' (TATA-Box, oder Pribnow-Box). Veränderungen in der Konsensus Sequenz beeinträchtigen die Promotorstärke.
 - Die Konsensus-Sequenz für die -35 Region lautet 5'-TTGACA-3'.
- Ein Promotor ist ein typische Beispiel für ein Cis-wirksames Kontrollelement. Das Element muss sich immer in einer ganz bestimmten Position relativ zu dem Bereich befinden, den es kontrolliert.
- Andere Kontrollelemente können ein Gen von Außen beeinflussen. Das sind Repressoren. Ein Repressor entfaltet seine Wirkung als Protein, das an eine Transkriptionseinheit bindet, sodass diese nicht mehr exprimiert werden kann.

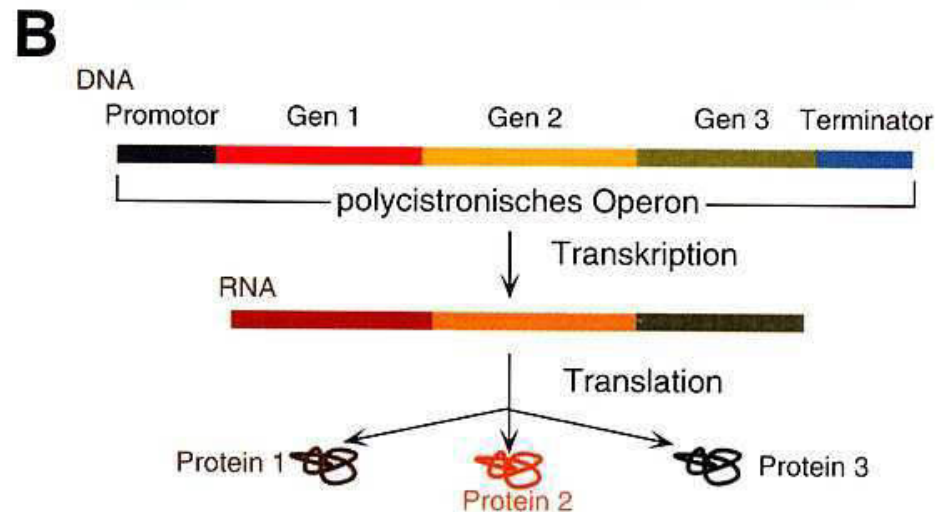
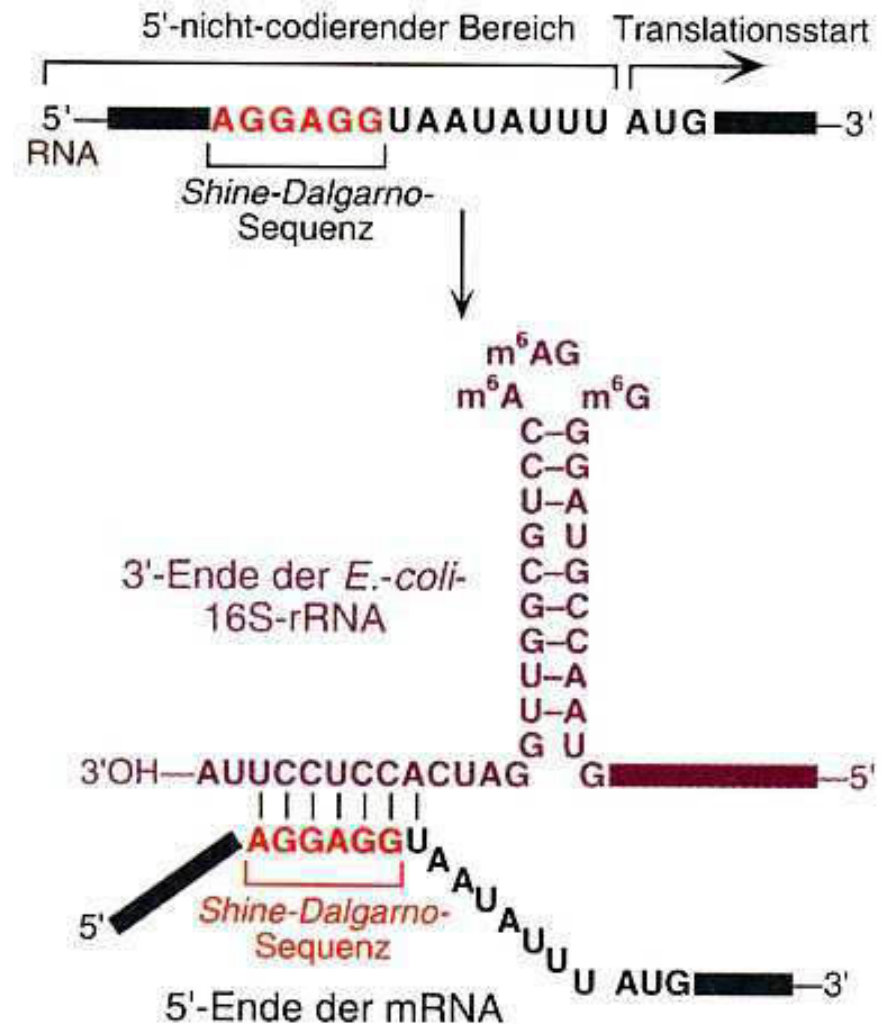
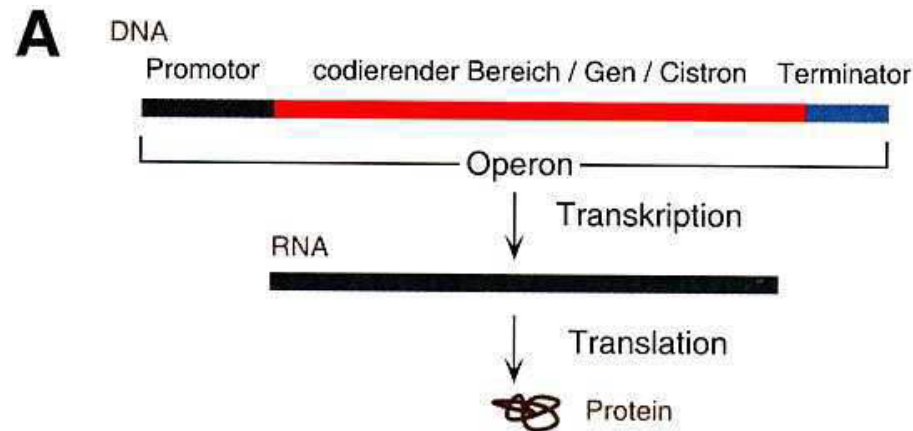
Transkriptions-Termination



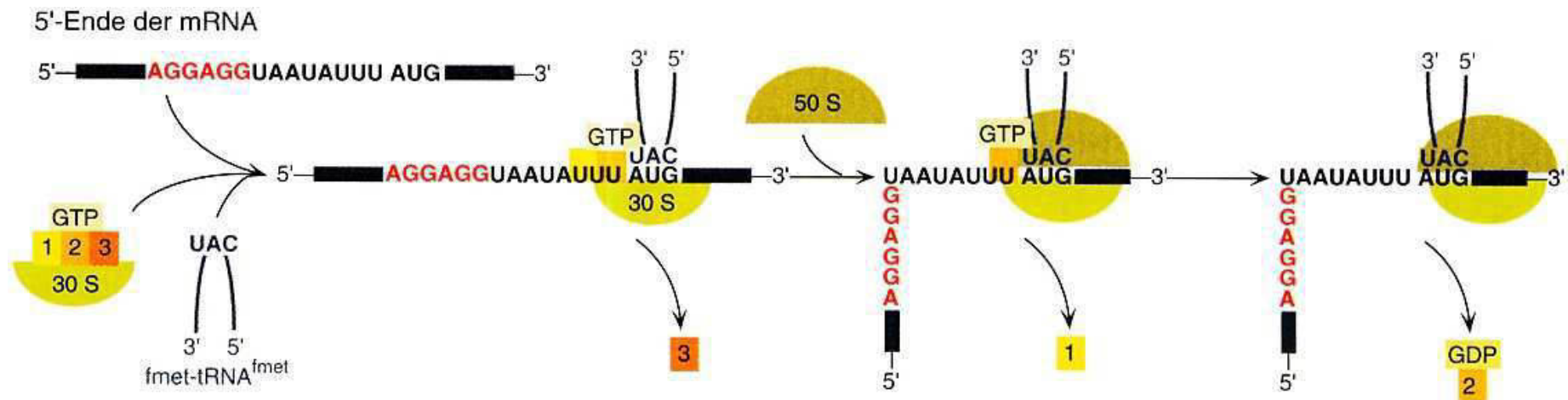
Transkriptions-Termination

- Die Transkription verläuft vom Nukleotid +1 bis zu der Stelle, die von der RNA-Polymerase als Transkriptions-Termination erkannt wird;
- dort fällt die RNA-Polymerase von der Matrizen-DNA ab und steht für eine neue Transkriptionsrunde zur Verfügung.
- Als Transkriptionsterminator wird in E.coli eine Sequenz erkannt die aus einer Palindromsequenz, gefolgt von mehreren U-Nukleotiden (auf der synthetisierten RNA) besteht.
- Promotor, codierende Region und Terminator gemeinsam heißen Operon (genetische Arbeitseinheit, die DNA in RNA übersetzt).
- In Prokaryonten werden oft mehrere Gene von einem Promotor und einem Terminator kontrolliert (polycistronisch).
- Die mRNA ist dann entsprechend länger und das Gen heißt auch Cistron.

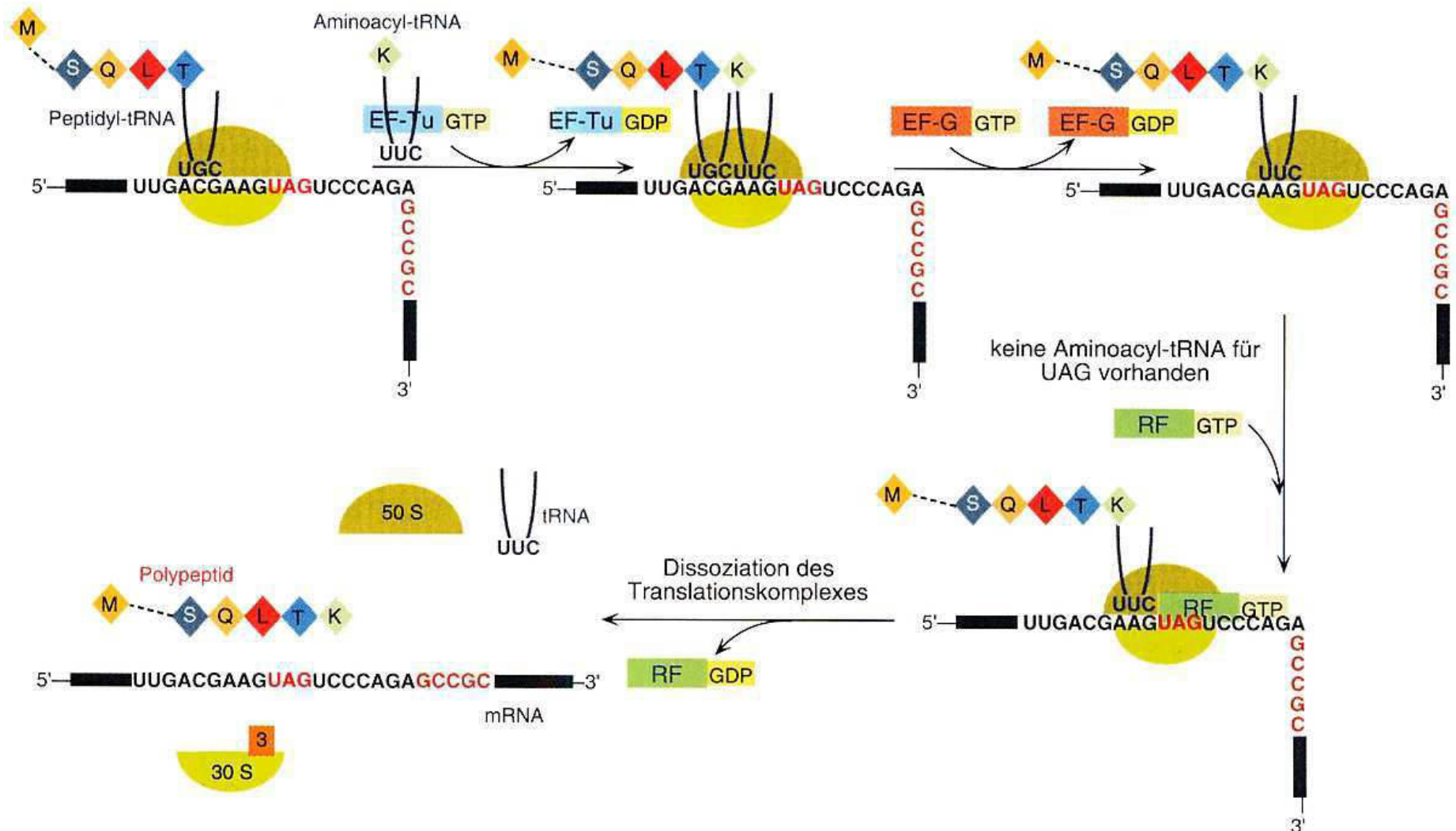
Translations-Initiation



Die Translationsinitiation



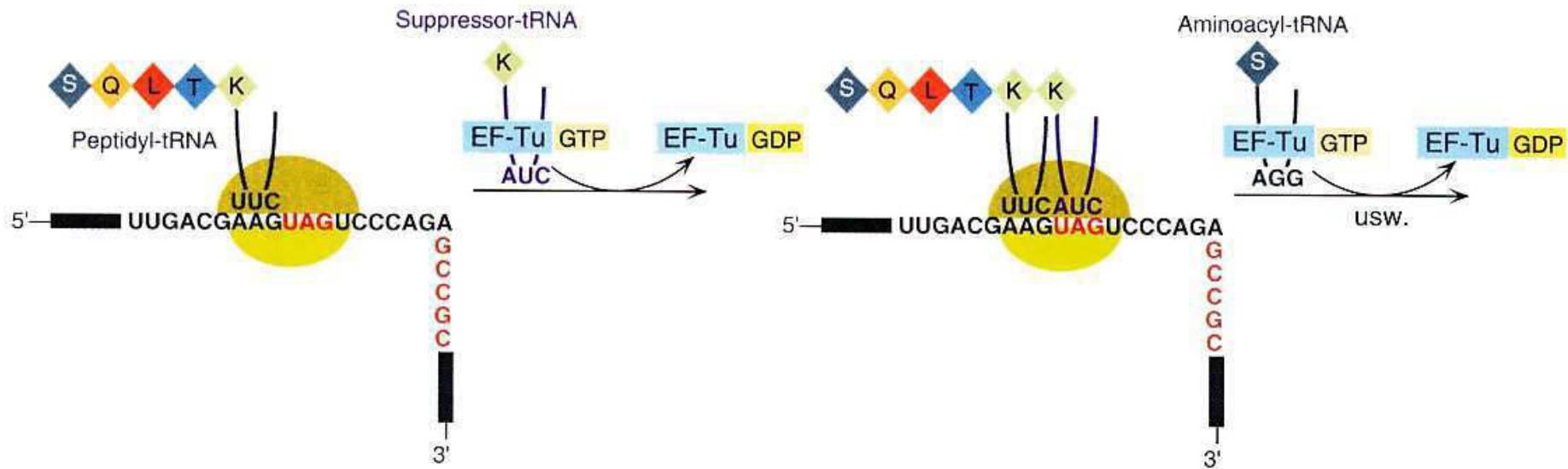
Die Translationselongation



Translationsinitiation, -elongation

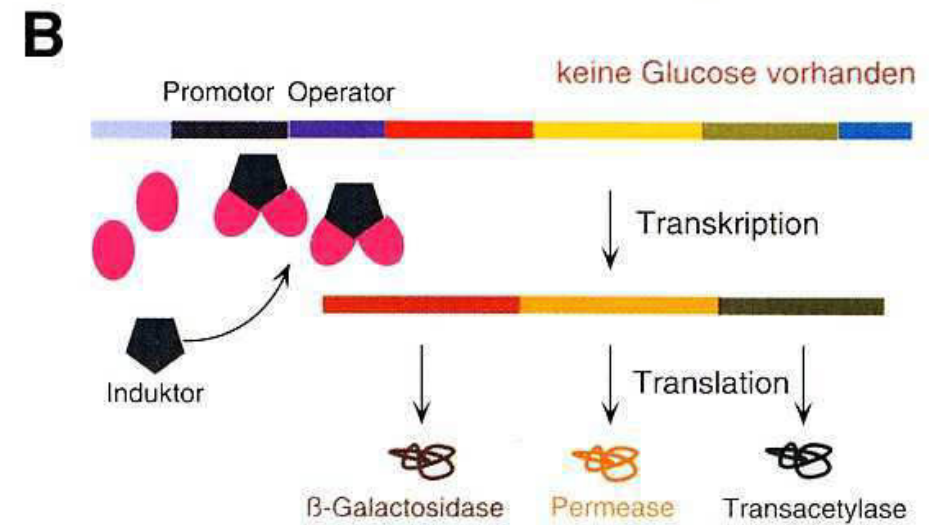
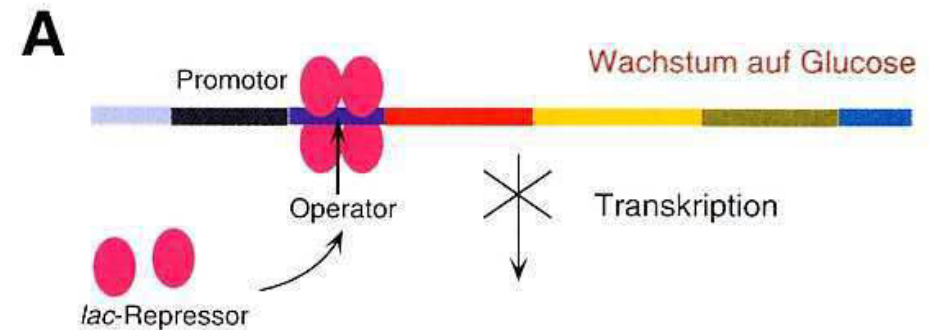
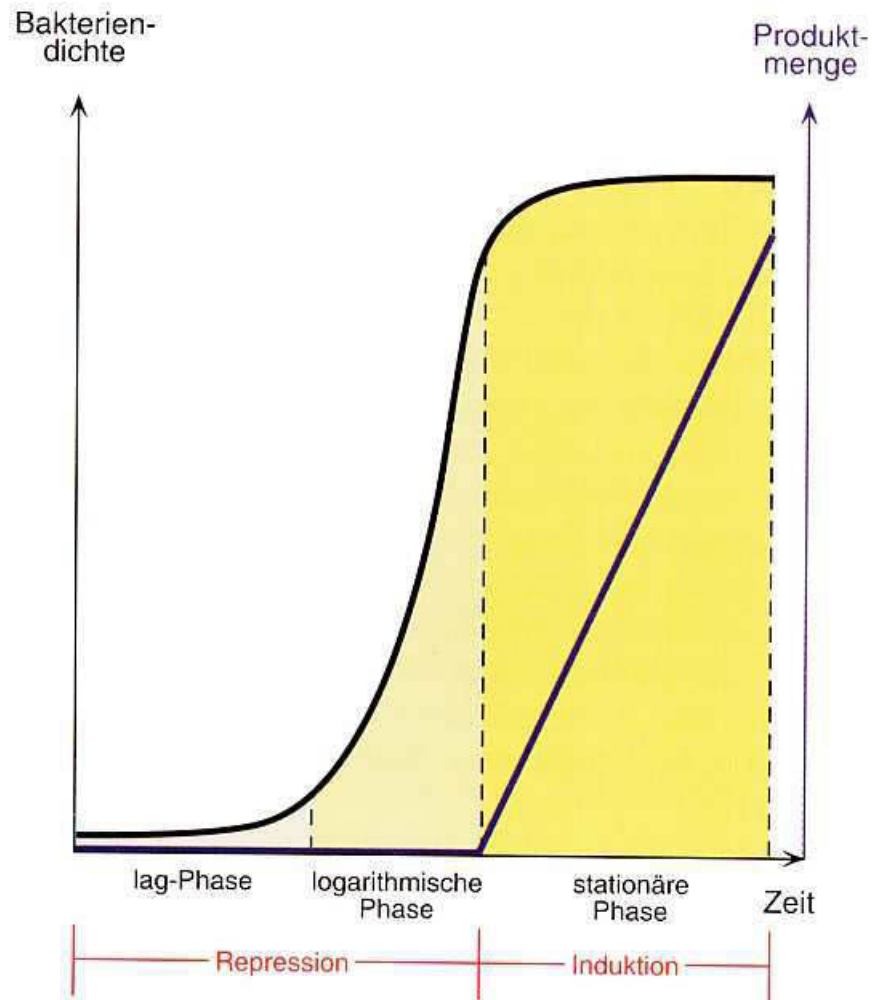
- Neben der Transkription in RNA brauchen wir anschließend die Translation zur Übersetzung in Proteine.
- Auch hier gibt es Kontrollelemente, die 1974 entdeckt wurden.
- Die Shine-Dalgarno-Sequenz sind 8 Nukleotide oberhalb des Translationsinitiations-Codons und ist die ribosomale Bindungsstelle (Cis-acting sequence).
- Die Konsensus-Sequenz (5'-AGGAGG-3') sollte möglichst exakt stimmen, aber auch der Abstand zum Translationsstart ist wichtig.
- Die S/D Sequenz ist komplementär zu einem Sequenzbereich in der 16S-ribosomalen RNA (rRNA).
- Über diese Komplementarität werden die Ribosomen gewissermaßen auf die mRNA aufgefädelt.
- Durch Transacylierung wird die AS Methionin von der fmet-tRNA an die alpha-Aminogruppe der benachbarten Aminosäure ankondensiert. Die deacylierte tRNA_{fmet} dissoziiert von der P-Stelle (Peptidylstelle) des Ribosoms ab, und das Ribosom bewegt sich auf der mRNA um ein Codon weiter. Die Translokation verbraucht ein weiteres Molekül GTP und wird durch den Elongationsfaktor G katalysiert. Nun befindet sich eine tRNA mit einem Dipeptid an seinem 3'-Ende an der ribosomale P-Stelle, und die A-Stelle ist für die nächste beladene tRNA geräumt.

Translationstermination und -suppression



- UAG, UGA und UAA besitzen keine passenden tRNAs, daher kommt es zum Kettenabbruch
- Suppressorstämme besitzen mutierte tRNAs, die diese Codons als „sense-codons“ erkennen können

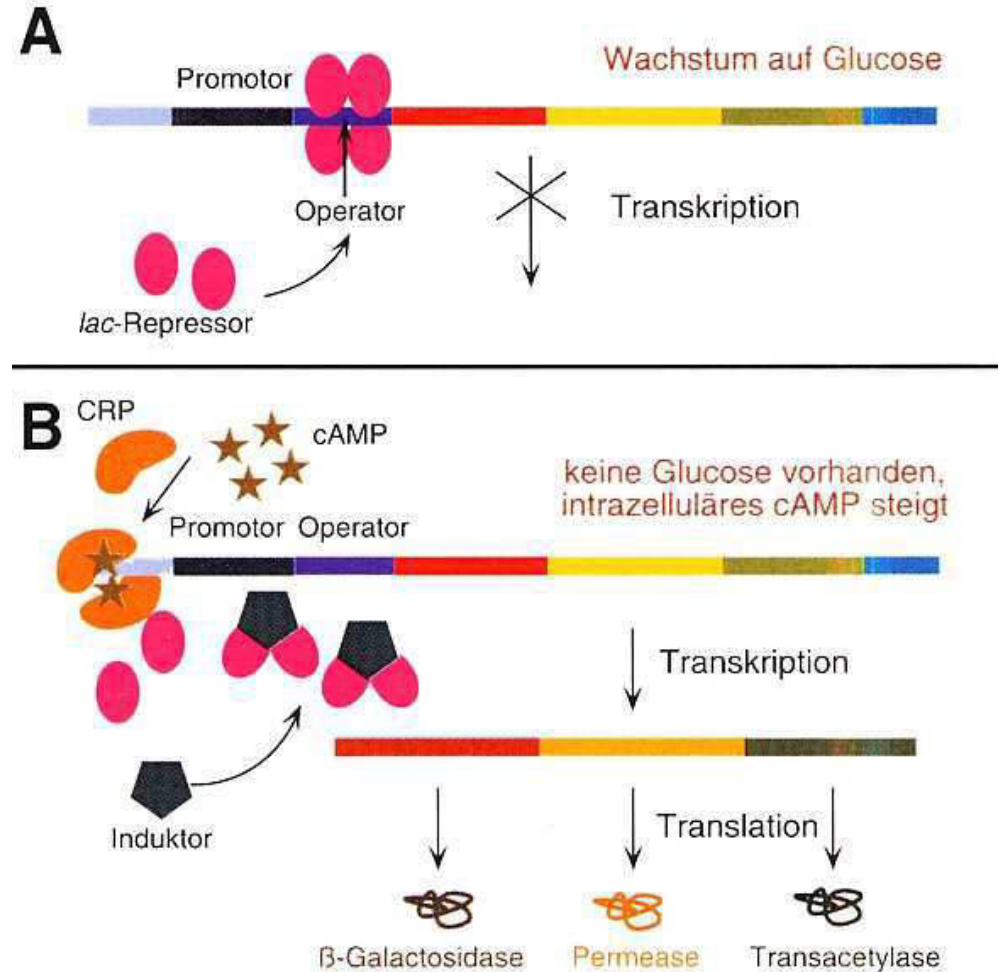
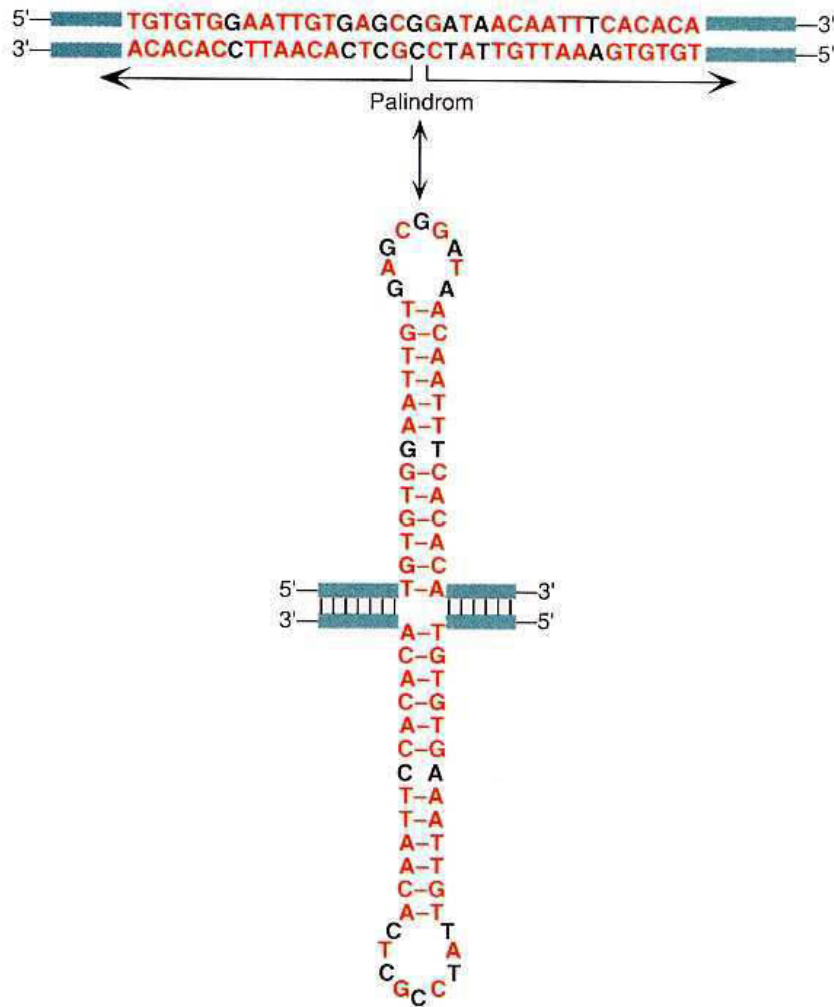
Regulierbare Promotoren



Der lac-Promotor

- Oft ist es nicht erwünscht, dass Fremdproteine in allen Wachstumsphasen der Wirtszelle exprimiert werden.
- Durch Einsatz regulierbarer Promotoren kann die Transkriptionsrate von Aussen gesteuert werden und entweder angeschaltet (induziert) oder abgedreht (reprimiert) werden.
- Promotoren die ständig angeschaltet sind heißen konstitutive Promotoren.
- Regulierbare Promotoren erlauben eine wachstumsunabhängige Expression eines rekombinanten Proteins.
- Einer der bekanntesten regulierbaren Promotoren ist der Promotor des Laktose-Operons (lac-Operon).
- Das Lac-Operon ist ein polycistronisches Operon, das für drei Enzyme codiert, die E.coli für die Verwertung von Laktose benötigt.
- Solange Glucose als C-Quelle vorhanden ist werden keine Enzyme synthetisiert, die andere Zucker abbauen können. Das lac-Operon ist eine genetische Informationseinheit, die für Zucker verwertende Enzyme, die beta-Galaktosidase codiert. Erst wenn keine Glc mehr vorhanden ist wird Lac verwertet.
- Das lac-Operon wird sowohl negativ als auch positiv reguliert.
- Die negativ-Regulation basiert auf DNA Ebene, über ein palindromisches Sequenzmotiv aus 35 Basenpaaren das tw mit dem Promotor des lac-Operons überlappt. An dieses Motiv binden als Tetramer vier Kopien des sogenannten lac-Repressors, der immer vorhanden ist (konstitutiv gebildet). Durch die Bindung des lac-Repressors an den lac-Operator wird die Transkription des lac-Operons verhindert; es ist unter normalen Bedingungen abgeschaltet.

Regulation des lac-Operons



Der lac-Promotor - Induktion

- Der Induktor signalisiert der Zelle, dass die Aktivierung eines reprimierten Operons erforderlich ist.
- Der Induktor erkennt den Repressor, der das Operon blockiert, bindet an ihn und ändert dadurch die Konformation des Repressors.
- Dadurch verliert der Repressor die Affinität zum Operator, dissoziiert von seiner Bindungsstelle ab und gibt das Operon zur Transkription frei. Als Induktor für das lac-Operon dient Lactose bzw Allolactose (1-6-O-beta-D-Galactopyranosyl-D-glucose) oder andere Galaktoside, also Substrate der beta-Galaktosidase. Es gibt auch Induktoren für das lac-Operon, die dem Enzym ein Substrat vortäuschen, die aber von ihm nicht gespalten werden können. Der stärkste Induktor ist ein solches Pseudosubstrat, Isopropyl-beta-D-thiogalactosid (IPTG), das wegen seiner thioglykosidischen Bindung nicht gespalten werden kann.
- Neben der negativ-Regulation unterliegt das lac-Operon aber auch einer positiven Regulation.
- Diese heißt Katabolit-Aktivierung. Sie beruht darauf, dass in Abwesenheit von Glucose die intrazelluläre Konzentration von cAMP (Adenosin-3',5'-Monophosphat) ansteigt.
- In jedem Hungerzustand steigt die cAMP Konzentration an, daher kann man cAMP auch als ubiquitäres Hungersignal bezeichnen. Ein Teil dieses cAMP bindet an das 210 AS lange CRP (cAMP-Rezeptorprotein), wobei 2 dieser mit cAMP beladenen Proteinkopien oberhalb des lac-Promotors binden.

Regulation des lac-Promotors

- Induktoren für die Konformationsänderung des Repressors
 - Lactose
 - Allolactose
 - andere Galactoside, die Substrate der beta-Galaktosidase sind
 - IPTG, als Induktor der nicht verbraucht wird, da er nicht gespalten werden kann
- Positive Regulation des lac-Operons
 - cAMP ist ein ubiquitäres Hungersignal, und steigt bei Glc-Mangel an
 - cAMP bindet an das CRP (cAMP-Rezeptorprotein), und erhöht die Affinität der RNA-Polymerase zum lac-Promotor