

Jahrbuch der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Heinrich Heine
HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF

2005/2006

Heinrich Heine

**Jahrbuch der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
2005/2006**

**Jahrbuch der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
2005/2006**

**Herausgegeben vom Rektor
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Univ.-Prof. Dr. Dr. Alfons Labisch**

**Konzeption und Redaktion:
em. Univ.-Prof. Dr. Hans Süßmuth**

© Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2006
Einbandgestaltung: Wiedemeier & Martin, Düsseldorf
Titelbild: Schloss Mickeln, Tagungszentrum der Universität
Redaktionsassistentz: Georg Stüttgen
Beratung: Friedrich-K. Unterweg
Satz: Friedhelm Sowa, L^AT_EX
Herstellung: WAZ-Druck GmbH & Co. KG, Duisburg
Gesetzt aus der Adobe Times
ISBN 3-9808514-4-3

Inhalt

Vorwort des Rektors	11
Gedenken	15
Rektorat	17
ALFONS LABISCH (Rektor)	
Die Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ist eine Forschungsuniversität ..	19
HILDEGARD HAMMER	
Der Bologna-Prozess – Chancen und Schwächen einer erzwungenen Studienreform	29
CHRISTOPH AUF DER HORST	
Das Studium Universale der Heinrich-Heine-Universität zwischen „akademeia“ und „universitas“	41
40 Jahre Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
HERMANN LÜBBE	
Universitätsjubiläen oder die Selbsthistorisierung der Wissenschaften	53
Medizinische Fakultät	
<i>Dekanat</i>	65
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	69
WOLFGANG H. M. RAAB (Dekan) und SIBYLLE SOBOLL	
Forschung und Lehre in der Medizinischen Fakultät	73
JÜRGEN SCHRADER	
Systembiologie – Neue Perspektiven für die Medizin?	79
ORTWIN ADAMS und HARTMUT HENGEL	
Husten, Schnupfen, Heiserkeit – Über alte und neue Respirationstraktviren	85
WILFRIED BUDACH und EDWIN BÖLKE	
Strahlende Zukunft – Radioonkologie 2010	103
HILDEGARD GRASS und STEFANIE RITZ-TIMME	
Frauen- und Geschlechterforschung, Gewaltopfer und Rechtsmedizin	107
GESINE KÖGLER und PETER WERNET	
Die José Carreras Stammzellbank Düsseldorf – Entwicklung, klinische Ergebnisse und Perspektiven	119

NIKOLAS HENDRIK STOECKLEIN und WOLFRAM TRUDO KNOEFEL Disseminierte Tumorzellen bei gastrointestinalen Karzinomen – Molekular- genetische Analyse der relevanten Tumorzellen zum Aufsuchen therapeu- tischer Zielstrukturen für effektive adjuvante Therapien	137
---	-----

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

<i>Dekanat</i>	151
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	153
PETER WESTHOFF (Dekan) Die Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät – Der Weg im Jahr 2005	159
JÖRG BREITKREUTZ Arzneizubereitungen für Kinder	161
STEFAN U. EGELHAAF Weiche Materie – Treffpunkt von Physik, Chemie und Biologie	173
THOMAS HEINZEL Nanoelektronik und mesoskopischer Transport	185
MICHAEL LEUSCHEL und JENS BENDISPOSTO Das ProB-Werkzeug zur Validierung formaler Softwaremodelle	199
CHRISTINE R. ROSE Doppelt hält besser – Elektrische und chemische Signalgebung in Gehirnzellen	209

Philosophische Fakultät

<i>Dekanat</i>	227
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	229
BERND WITTE (Dekan) Die Philosophische Fakultät auf dem Weg in die entgrenzte Wissensgesellschaft	231
ANDREA VON HÜLSEN-ESCH, WILHELM G. BUSSE und CHRISTOPH KANN Das Forschungsinstitut für Mittelalter und Renaissance	237
SABINE KROPP Institutionenbildung in postsowjetischen Ländern – Entwurf eines Analysekonzepts	245
KARL-HEINZ REUBAND Teilhabe der Bürger an der „Hochkultur“ – Die Nutzung kultureller Infrastruktur und ihre sozialen Determinanten	263

SHINGO SHIMADA Wozu „Modernes Japan“? Zur Konzeptualisierung des Lehrstuhls „Modernes Japan II mit sozialwissenschaftlichem Schwerpunkt“	285
Wirtschaftswissenschaftliche Fakultät	
<i>Dekanat</i>	293
CHRISTOPH J. BÖRNER (Dekan) Bachelor und Master in der Betriebswirtschaftslehre – Der Düsseldorfer Ansatz	295
HEINZ-DIETER SMEETS und H. JÖRG THIEME Demographische Entwicklung und Globalisierung – Ökonomische Konsequenzen	311
HORST DEGEN und PETER LORSCHIED „Euro = Teuro“ – Lässt sich diese Gleichung statistisch belegen?	329
BERND GÜNTER und LUDGER ROLFES Wenn Kunden lästig werden – Kundenbewertung und Umgang mit unprofitablen Kundenbeziehungen durch Unternehmen	345
BERND GÜNTER Über den Tellerrand hinaus – „Studium laterale“	359
Juristische Fakultät	
<i>Dekanat</i>	367
HORST SCHLEHOFER (Dekan) Das Bachelor-Master-System – Ein Modell für die Juristenausbildung?	369
ANDREAS FEUERBORN Der integrierte deutsch-französische Studiengang der Juristischen Fakultäten der Université de Cergy-Pontoise und der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	379
ULF PALLME KÖNIG Die rechtliche Einordnung der Kooperationsvereinbarung zwischen Uni- versität und Universitätsklinikum nach nordrhein-westfälischem Recht	387
Gesellschaft von Freunden und Förderern der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf e.V.	
GERT KAISER Die Freundesgesellschaft der Heinrich-Heine-Universität	401
OTHMAR KALTHOFF Jahresbericht 2005	405

Sonderforschungsbereiche der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- CHRISTEL M. MARIAN und WILHELM STAHL
 Der Sonderforschungsbereich 663
 „Molekulare Antwort nach elektronischer Anregung“ 409

Forschergruppen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- VICTORIA KOLB-BACHOFEN, MIRIAM CORTESE, JÖRG LIEBMANN,
 SABINE KOCH und NICOLE FITZNER
 Regulation der Entzündungsreaktion –
 Eine wichtige Rolle für Stickstoffmonoxid 421

- DIRK SCHUBERT und JOCHEN F. STAIGER
 Die Analyse von „Was“ und „Wo“ in neuronalen Netzen
 des primären somatosensorischen Kortex 433

Graduiertenkollegs der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- OSWALD WILLI
 Das Graduiertenkolleg 1203
 „Dynamik heißer Plasmen“ 453

- AXEL GÖDECKE
 Proteininteraktionen und -modifikationen im Herzen –
 Das Graduiertenkolleg 1089 auf dem Weg
 in das postgenomische Zeitalter 459

Zentrale wissenschaftliche Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Humanwissenschaftlich-Medizinisches Forschungszentrum

- DIETER BIRNBACHER
 Das Humanwissenschaftlich-Medizinische Forschungszentrum
 der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 475

- DIETER BIRNBACHER und LEONORE KOTTJE-BIRNBACHER
 Ethische Fragen bei der Behandlung von Patienten
 mit Persönlichkeitsstörungen 477

Biotechnologie – Ein gemeinsamer Forschungsschwerpunkt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und des Forschungszentrums Jülich

- KARL-ERICH JAEGER
 Das Zentrum für Mikrobielle Biotechnologie 491

CHRISTIAN LEGGEWIE, THOMAS DREPPER, THORSTEN EGGERT, WERNER HUMMEL, MARTINA POHL, FRANK ROSENAU und KARL-ERICH JAEGER Molekulare Enzymtechnologie – Vom Gen zum industriellen Biokatalysator	501
--	-----

JÖRG PIETRUSZKA, ANJA C. M. RIECHE, NIKLAS SCHÖNE und THORSTEN WILHELM Naturstoffchemie – Ein herausforderndes Puzzlespiel	519
--	-----

Institute an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Institut für umweltmedizinische Forschung

JEAN KRUTMANN Das Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH	535
--	-----

Institute in Zusammenarbeit mit der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Düsseldorfer Institut für Dienstleistungs-Management

WINFRIED HAMEL Das Düsseldorfer Institut für Dienstleistungs-Management – Eine virtuelle Forschungseinrichtung	561
--	-----

Institut für Internationale Kommunikation

CHRISTINE SCHWARZER und MATTHIAS JUNG Universitätsnah wirtschaften – Das Institut für Internationale Kommunikation in Zusammenarbeit mit der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf e.V.	573
---	-----

Zentrale Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Universitäts- und Landesbibliothek

IRMGARD SIEBERT und CAROLA SPIES Aufbruch in die Zukunft – Der 94. Deutsche Bibliothekartag in Düsseldorf	589
---	-----

Universitätsrechenzentrum

STEPHAN OLBRICH, NILS JENSEN und GABRIEL GAUS EVITA – Effiziente Methoden zur Visualisierung in tele-immersiven Anwendungen	607
---	-----

**CHRISTIAN LEGGEWIE, THOMAS DREPPER, THORSTEN
EGGERT, WERNER HUMMEL, MARTINA POHL,
FRANK ROSENAU und KARL-ERICH JAEGER**

Molekulare Enzymtechnologie – Vom Gen zum industriellen Biokatalysator

Die Weiße Biotechnologie verwendet Mikroorganismen und Enzyme, um chemische Produkte herzustellen. Daher nimmt der Bedarf an neuen Enzymen als Biokatalysatoren für die Biotechnologieindustrie stetig und schnell zu. Am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, das auf dem Gelände des Forschungszentrums Jülich angesiedelt ist, werden neue Enzymgene isoliert, Expressionssysteme und Bakterienstämme konstruiert, aber auch bereits vorhandene Enzyme mit Methoden der gerichteten Evolution optimiert. Daneben werden biotechnologisch relevante Enzymklassen untersucht, die zur Darstellung enantiomerenreiner Verbindungen verwendet werden können.¹

Einleitung

Die Weiße Biotechnologie umfasst die Herstellung einer Vielzahl unterschiedlicher chemischer Produkte mit Hilfe von Mikroorganismen. Die molekularen Werkzeuge der Weißen Biotechnologie sind Enzyme, also Proteine, die innerhalb lebender Zellen sehr spezifische Reaktionen katalysieren, und dies zumeist mit hoher Substratspezifität und Enantioselektivität, gleichzeitig aber in wässriger Umgebung und unter milden Reaktionsbedingungen. Diese Eigenschaften von Enzymen legen nahe, sie als Biokatalysatoren auch in der Chemieindustrie zu nutzen, um (1) chemische Reaktionen zu katalysieren, für die keine geeigneten chemischen Katalysatoren zur Verfügung stehen, und (2) „grüne Chemie“ zu betreiben, d. h., chemische Prozesse, die unter hohem Energieaufwand und unter Entstehung großer Mengen giftiger Abfallstoffe ablaufen, durch umweltschonende Bioprozesse zu ersetzen.

In Deutschland wurde die Weiße Biotechnologie, also der Einsatz biokatalytischer Verfahren in der Chemieindustrie, entscheidend geprägt durch die Arbeiten von Frau Univ.-Prof. Dr. Maria-Regina Kula, emeritierte Direktorin des Instituts für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich. In enger Kooperation mit den benachbarten Jülicher Instituten für Biotechnologie I (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hermann Sahn) und II (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Christian Wandrey) wurden

¹ Vgl. Leggewie *et al.* (2006a).

Enzyme isoliert, charakterisiert und biokatalytische Verfahren sowohl mit isolierten Enzymen wie mit ganzen Mikroorganismen etabliert, die heute eine bedeutsame Rolle in der Biotechnologieindustrie spielen. Das wohl bekannteste Beispiel für biotechnologische Anwendungen ist die kontinuierliche biokatalysierte Regenerierung des Kofaktors NADH mit dem Formiat/Formiatdehydrogenasesystem in einem Membranreaktor.² Industriell verwendet wird diese Reaktion z. B. in Kopplung mit einer NADH-abhängigen Leucindehydrogenase zur Herstellung von *L-tert*-Leucin oder zur Herstellung chiraler Alkohole durch stereoselektive Reduktion von Ketonen mit Alkoholdehydrogenasen (ADHs).

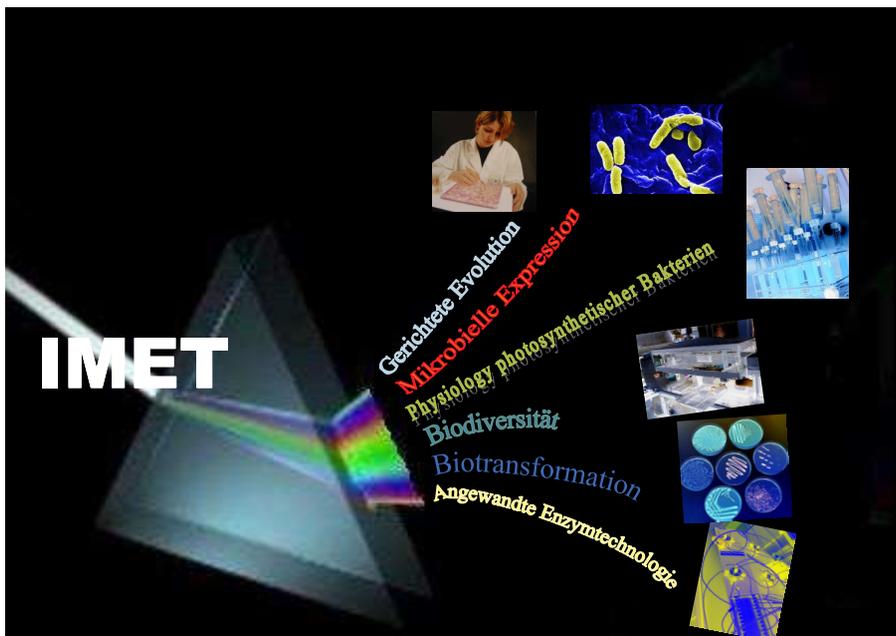


Abb. 1: Die Arbeitsgruppen am Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Heute heißt die ehemalige Wirkungsstätte von Frau Professor Kula „Institut für Molekulare Enzymtechnologie“ und gehört zum neu gegründeten Zentrum für Mikrobielle Biotechnologie (ZMB) im Forschungszentrum Jülich, dem neben den Instituten für Biotechnologie I und II auch das ebenfalls neu gegründete Institut für Bioorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jörg Pietruszka) angehört. Das ZMB repräsentiert eine auf nationaler Ebene einmalige Konzentration von Expertise, Methoden und apparativer Ausstattung auf dem Gebiet der Weißen Biotechnologie. Themenschwerpunkte am Institut für Molekulare Enzymtechnologie sind die Nutzung der Biodiversität, die Entwicklung von Expressionssystemen, die Optimierung

² Vgl. Wichmann *et al.* (1981: 2789).

von Enzymen mit molekularbiologischen Methoden und die Entwicklung von Biotransformationsreaktionen mit industriell relevanten Enzymen. Diese Themenbereiche werden in sechs verschiedenen Arbeitsgruppen bearbeitet (Abb. 1), wobei die verschiedenen Arbeitsfelder an vielen Stellen miteinander vernetzt sind. So werden beispielsweise Enzyme zur Anwendung in Biotransformationen (Arbeitsgruppen „Biotransformation“ und „Angewandte Enzymtechnologie“) zuvor durch Metagenom-Screening identifiziert (Arbeitsgruppe „Biodiversität“). Erfüllen die gefundenen Enzyme in ihrem Anwendungsspektrum nicht die Anforderungen, kann eine Optimierung durch rationale oder evolutive Verfahren erfolgen (Arbeitsgruppen „Gerichtete Evolution“ und „Angewandte Enzymtechnologie“). Voraussetzung für alle dargestellten Arbeitsfelder ist die Verfügbarkeit von Biokatalysatoren, die durch spezielle Expressionssysteme gewährleistet werden kann (Arbeitsgruppe „Mikrobielle Expressionssysteme“).

Die Biosphäre als Ressource für neue Biokatalysatoren

Enzyme mit neuen und definierten Eigenschaften zu identifizieren ist oftmals ebenso schwierig, wie die sprichwörtliche Stecknadel im Heuhaufen zu finden. Über viele Jahrzehnte wurden Mikroorganismen isoliert und im Labor kultiviert, die biotechnologisch interessante Biokatalysatoren produzierten. Jedoch konnte in den letzten Jahren mit neuen Nachweismethoden gezeigt werden, dass nur etwa ein Prozent aller in einer Umweltprobe vorhandenen Mikroorganismen unter Standardlaborbedingungen kultivierbar ist.³ Das genetische Potenzial der verbleibenden nicht kultivierbaren Mikroorganismen (bis zu 500.000 Arten in einem Gramm Boden) kann aber dennoch für die Biotechnologie genutzt werden. Die Gesamtheit der in einem definierten Habitat (z. B. in einer Bodenprobe) vorhandenen DNA wird als Metagenom bezeichnet; die DNA eines solchen Metagenoms kann unter Umgehung der Anzucht von Mikroorganismen im Labor direkt isoliert werden (Abb. 2). Die isolierte metagenomische DNA wird enzymatisch in passende Fragmentgrößen geschnitten, in geeignete Vektorsysteme kloniert und dann in einen heterologen Wirtsorganismus eingebracht; dies ist meistens das Darmbakterium *Escherichia coli*. So erhält man so genannte „Metagenombibliotheken“, bestehend aus vielen Tausend Klonen, die auf eine gesuchte Enzymaktivität untersucht werden können. Bei diesem Ansatz gibt es allerdings auch einige limitierende Faktoren. So ist das heterologe Wirtsbakterium *E. coli* oft nicht in der Lage, die „fremde“ DNA in ein aktives Enzym zu „übersetzen“, weil sich die physiologische Ausstattung von *E. coli* von der des unbekanntes Herkunftsorganismus unterscheidet. In den letzten Jahren wurden deshalb molekularbiologische Hilfsmittel entwickelt, die es ermöglichen, Enzyme aus Metagenomen entweder sequenzabhängig oder -unabhängig zu identifizieren. Hierzu können folgende Methoden eingesetzt werden: (1) Unter Umgehung eines Aktivitäts-Screenings können definierte Bereiche metagenomischer DNA mit Hilfe bekannter, konservierter Regionen eines Enzyms, der so genannten *metagenome sequence tags* (MSTs), im Reagenzglas mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt werden. Mit dieser Technik wurden erfolgreich neue Nitrilhydratasen und Lipasen identifiziert.⁴ Allerdings lassen sich mit diesem Ansatz nur solche Biokatalysatoren finden, die bereits Ähnlichkeit zu bekannten Enzymen besitzen.

³ Vgl. Amann *et al.* (1995: 143).

⁴ Vgl. Bell *et al.* (2002: 2283) und Liebeton und Eck (2004: 557).

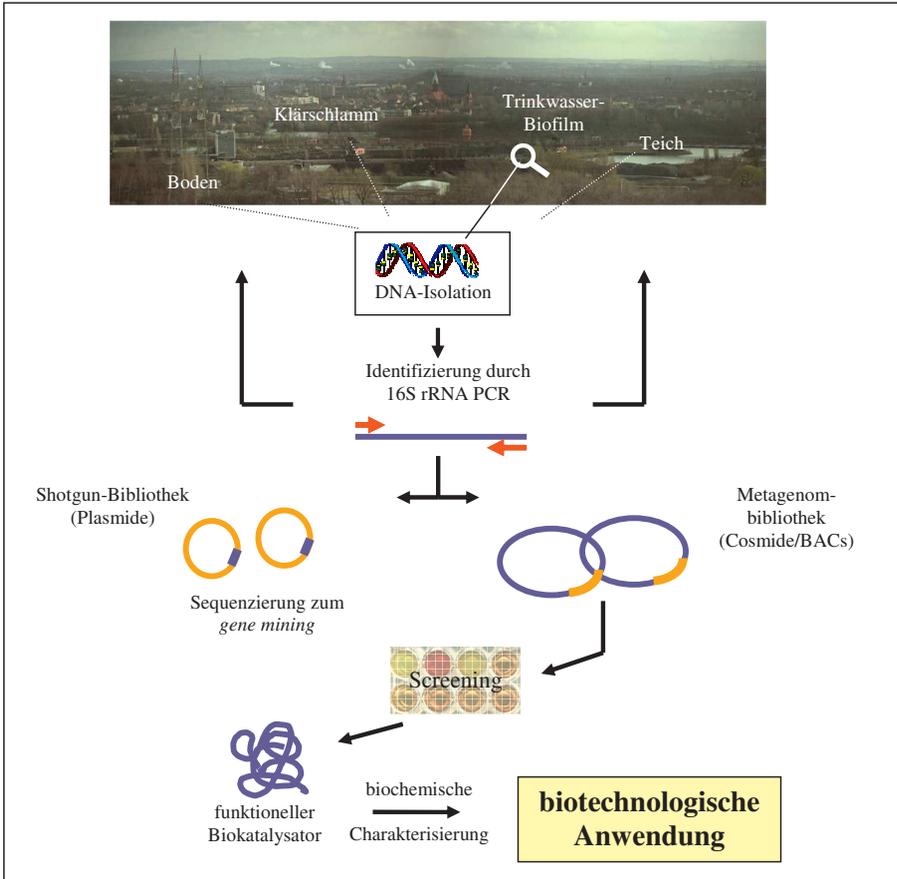


Abb. 2: Schematische Darstellung der Isolierung von Biokatalysatoren aus dem Metagenom. Die Gesamt-DNA aus verschiedenen Habitats, wie beispielsweise aus einem Trinkwasserbiofilm, wird zunächst isoliert und mittels 16S-rRNA-PCR die mikrobielle Zusammensetzung des Habitats analysiert. Anschließend wird die DNA partiell verdaut und entweder in Plasmide zur Sequenzierung oder in Cosmide bzw. BACs (*bacterial artificial chromosomes*) kloniert. Die Cosmid/BAC-Metagenombibliotheken werden auf verschiedene Biokatalysatoraktivitäten untersucht, wozu neue Hochdurchsatzverfahren und Expressionssysteme entwickelt und verwendet werden. Die identifizierten und enzymatisch aktiven Biokatalysatoren werden biochemisch charakterisiert und zur biotechnologischen Anwendung vorbereitet.

(2) Zur Steigerung der Effizienz bei der Produktion heterologer Enzyme in *E. coli* wurde ein Transposon (ein „springendes genetisches Element“) konstruiert.⁵ Dieses Transposon, das sich selbsttätig in metagenomische DNA inseriert, trägt einen starken Promotor, der die Expression der gesuchten Biokatalysatorgene entweder verstärkt oder überhaupt erst ermöglicht. (3) Zur Identifizierung gesuchter Biokatalysatoraktivitäten ist es erforderlich, effiziente Screeningsysteme einzusetzen. Hochdurchsatz-Screeningsysteme sind hierfür am besten geeignet, da Metagenombibliotheken sehr umfangreich sein können (eine Million Klone sind keine Seltenheit) und oftmals nur eine geringe Ausbeute an Klonen mit enzymatischer Aktivität zu erwarten ist.⁶ (4) Eine Alternative zum Hochdurchsatz-Screening ist der Einsatz von Selektionssystemen. Dazu werden Mikroorganismenstämme konstruiert, die nur dann wachsen können, wenn sie eine gesuchte Enzymaktivität besitzen. Hierbei kann ein entstehendes Produkt beispielsweise als alleinige Kohlenstoffquelle für den Produktionswirt *E. coli* dienen.

Nach der Identifizierung neuer Enzyme beginnt der zeitaufwändigste Teil auf dem Wege zum biotechnologisch verwendbaren Biokatalysator: Es erfolgt die Sequenzierung der Enzymgene, deren Klonierung und Überexpression und schließlich die Reinigung und Charakterisierung der Enzymproteine. Bisher sind nur wenige Enzyme metagenomischer Herkunft genauer untersucht worden; hierzu zählen verschiedene Esterasen, die wir in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. W. Streit (Universität Hamburg) biochemisch charakterisiert haben.⁷ In Kooperation mit Professor B. W. Dijkstra (Universität Groningen, Niederlande) gelang es uns kürzlich, die dreidimensionale Struktur einer dieser metagenomischen Esterasen zu bestimmen.

Die vergleichsweise noch sehr junge Metagenomforschung wird in Zukunft eine immer bedeutendere Rolle in der Weißen Biotechnologie spielen. Dabei wird die Weiterentwicklung und Verfeinerung der Methoden zur Identifizierung, Klonierung, funktionellen Überexpression und biochemischen Charakterisierung von neuen Biokatalysatoren es ermöglichen, in immer kürzerer Zeit neue Biokatalysatoren mit gewünschter Aktivität, Spezifität und Stabilität bereitzustellen.

Neue Expressionssysteme

Neue Biokatalysatoren können nur dann für die Weiße Biotechnologie nutzbar gemacht werden, wenn es gelingt, sie in ausreichender Menge herzustellen, um ihre Eignung unter Prozessbedingungen zu untersuchen. Deshalb befasst sich unser Institut mit mikrobieller Expressionstechnologie. Mögliche zelluläre Limitierungen für die Synthese von Biokatalysatoren werden identifiziert und anschließend optimiert, um eine effizientere Produktion heterologer Proteine zu ermöglichen.

Maßgeschneiderte Expressionsorganismen (*designer bugs*)

Die Überproduktion eines heterologen Biokatalysators stellt für die produzierende Zelle eine nicht-natürliche Stresssituation dar, deshalb erfordert die Optimierung der Proteinausbeuten oftmals umfangreiche genetische und physiologische Manipulationen. Klassi-

⁵ Vgl. Leggewie *et al.* (2006b: 281).

⁶ Vgl. Henne *et al.* (2000: 3113).

⁷ Vgl. Elend *et al.* (2006: 3637).

sche Veränderungen sind die Optimierung von Plasmidkopienzahlen und Promotorstärken sowie die Anpassung heterologer Gene an die Codon-Benutzung des verwendeten Wirtsstamms („Codon-Optimierung“). Weiterhin kann die Proteinproduktion individuell optimiert werden durch Inaktivierung „negativer“ Zellfunktionen (z. B. die Deletion von Proteasegenen) oder Überproduktion „positiver“ Faktoren (z. B. zellulärer Faltungshelfer, der so genannten Chaperone).⁸ Ein Beispiel für die Konstruktion eines maßgeschneiderten Expressionsorganismus ist ein genetisch veränderter Stamm des gramnegativen Bakteriums *Pseudomonas putida*, der in der Lage ist, eine biotechnologisch relevante Lipase aus dem pathogenen Bakterium *P. aeruginosa* heterolog zu sekretieren (Abb. 3). Hierzu wurden die Gene aller akzessorischen Proteine, die zur Produktion dieser Lipase im Ausgangsstamm notwendig sind, in den nicht-pathogenen Stamm *P. putida* transferiert, in diesem Falle ein spezifisches Chaperon-Gen und zwölf weitere Gene, die zur Bildung eines kompletten Sekretionsapparats vom Typ II erforderlich sind. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Koexpression dieser Gene zur Sekretion der Lipase in das Kulturmedium führt.⁹

Der Einsatz genombasierter Analysetechniken wie Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics erlaubt in Zukunft die effiziente und schnelle Parallelanalyse zahlreicher physiologischer Vorgänge innerhalb einer Zelle als Stressreaktion auf die Proteinüberproduktion. Solche Analysen werden genutzt für eine gezielte Optimierung der Wirtsorganismen im Hinblick auf die Überproduktion von Biokatalysatoren.

Neue mikrobielle Expressionsstämme

Ein entscheidendes Kriterium für die erfolgreiche Anwendung eines Biokatalysators in der Weißen Biotechnologie ist die Identifizierung eines zur Überexpression geeigneten Mikroorganismus. Neben dem „klassischen“ Wirtsorganismus *E. coli*, der vor allem zur Expression löslicher Proteine verwendet wird, finden grampositive Bakterien wie *Bacillus subtilis* oder *B. licheniformis* Verwendung; vor allem, wenn die Sekretion des Biokatalysators aus der Bakterienzelle erwünscht ist. Viele Biotechnologieunternehmen verwenden ein Portfolio aus verschiedenen Expressionsstämmen bestehend aus bakteriellen und eukaryontischen Mikroorganismen. Schon aus Kostengründen muss hierbei die Zahl der verwendeten Expressionsstämme möglichst klein gehalten werden, daher sind Stämme mit einem breiten Spektrum an metabolischen und physiologischen Fähigkeiten besonders attraktiv. Hierzu zählen zweifellos die gramnegativen Bakterien der Gattungen *Pseudomonas* und *Burkholderia*, deren Genomsequenzen entweder schon bekannt sind¹⁰ oder zurzeit mit Beteiligung unserer Arbeitsgruppe sequenziert werden.¹¹ Eine sehr interessante Eigenschaft dieser Bakterien, die sie von Standard-Expressionswirten wie *E. coli* unterscheidet, ist das Vorhandensein mehrerer komplexer Maschinerien zur Sekretion von Proteinen,¹² die prinzipiell genutzt werden können, um produzierte Biokatalysatoren in das Kulturmedium auszuschleusen, was eine einfache Abtrennung von den produzierenden Zellen ermöglicht und zu einer signifikanten Reduktion der Kosten für die Gewinnung

⁸ Vgl. Rosenau *et al.* (2004: 152).

⁹ Vgl. Rosenau und Jaeger (2004: 491).

¹⁰ *Pseudomonas putida* KT2440; vgl. Nelson *et al.* (2002: 799).

¹¹ *Burkholderia glumae* PG1, http://www.g2l.bio.uni-goettingen.de/projects/c_projects.html (18.09.2006).

¹² Vgl. Rosenau und Jaeger (2004: 491) und Rosenau und Jaeger (2003: 617).

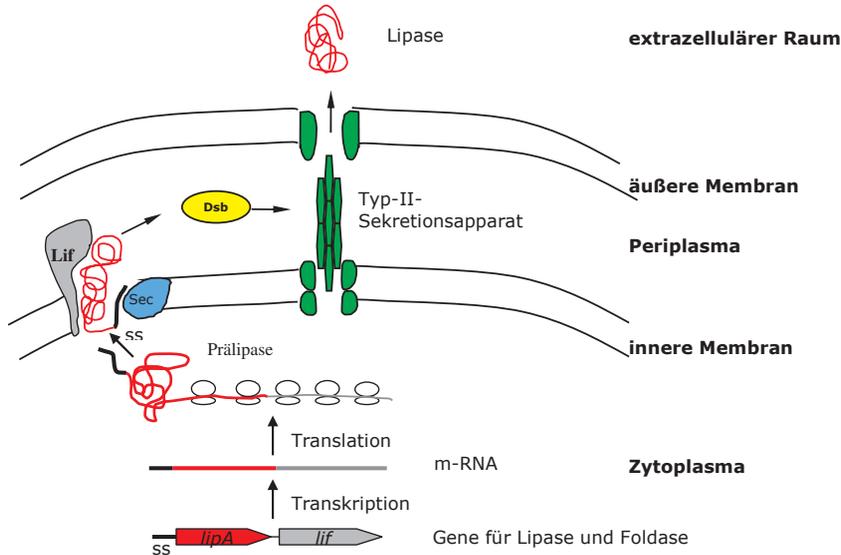


Abb. 3: Die Bildung und Freisetzung einer extrazellulären Lipase durch das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist ein komplizierter Prozess. Das Enzym wird von einem Lipasegen *lipA* kodiert, das zusammen mit einem zweiten Gen *lif*, das eine für diese Lipase spezifische Foldase kodiert, ein Operon bildet. Nach der Transkription dieser Gene erfolgt die Translation der entstehenden mRNA, d.h. deren Übersetzung in das Lipaseprotein an den Ribosomen. Dann erfolgt die Sekretion des bis dahin noch ungefalteten Lipaseproteins durch die Zytoplasmamembran der Bakterien, wobei die so genannte Signalsequenz (schwarz) abgespalten wird. Beim Durchtritt durch die Zytoplasmamembran erfolgt der Kontakt des Lipaseproteins mit der Foldase Lif, die in dieser Membran verankert ist. Das Enzym wird dann im Periplasma (dem Raum zwischen der Zytoplasmamembran und der äußeren Membran) in seine enzymatisch aktive Konformation überführt, wobei ein so genanntes Dsb-Protein eine Disulfidbrücke knüpft; dann wird die Lipase in das umgebende Medium sekretiert. Hierzu ist ein komplexer Sekretionsapparat erforderlich, der aus zwölf verschiedenen Proteinen besteht (der so genannte Typ-II-Sekretionsapparat). Aus dem Kulturüberstand kann die Lipase dann isoliert und für biotechnologische Anwendungen verwendet werden.

eines Biokatalysators führt. Dies ist einer der Gründe, weshalb das Bakterium *B. glumae* zur industriellen Produktion einer Lipase eingesetzt wird.¹³

Die heterologe Produktion von Membranproteinen und Enzymen, die komplexe Redox-Kofaktoren benötigen, ist nach wie vor sehr schwierig. In diesem Zusammenhang weist das phototrophe Bakterium *Rhodobacter capsulatus* aufgrund seiner besonderen Physiologie gegenüber anderen mikrobiellen Expressionswirten entscheidende Vorteile auf, die die

¹³ Vgl. Schmid *et al.* (2001: 258).

Überexpression der genannten Problemproteine in aktiver Form ermöglichen (Abb. 4):¹⁴ Unter phototrophen Wuchsbedingungen bildet *R. capsulatus* ein enorm vergrößertes vesikuläres Membransystem aus, das eine hohe intrinsische Aufnahmekapazität für Membranproteine aufweist. Darüber hinaus ist das Bakterium unter diesen Bedingungen in der Lage, nahezu alle beschriebenen Redox-Kofaktoren in großen Mengen zu synthetisieren und in entsprechende (heterologe) Proteine einzubauen. Maßgeschneiderte Überexpressionsvektoren mit *Rhodobacter*-spezifischen Kontrollelementen sowie zielgerichtet optimierte Expressionsstämme, die am Institut für Molekulare Enzymtechnologie entwickelt wurden, erlauben zudem die koordinierte Induktion der Membran- oder Kofaktorsynthese zusammen mit der effizienten Synthese des entsprechenden heterologen Zielproteins.

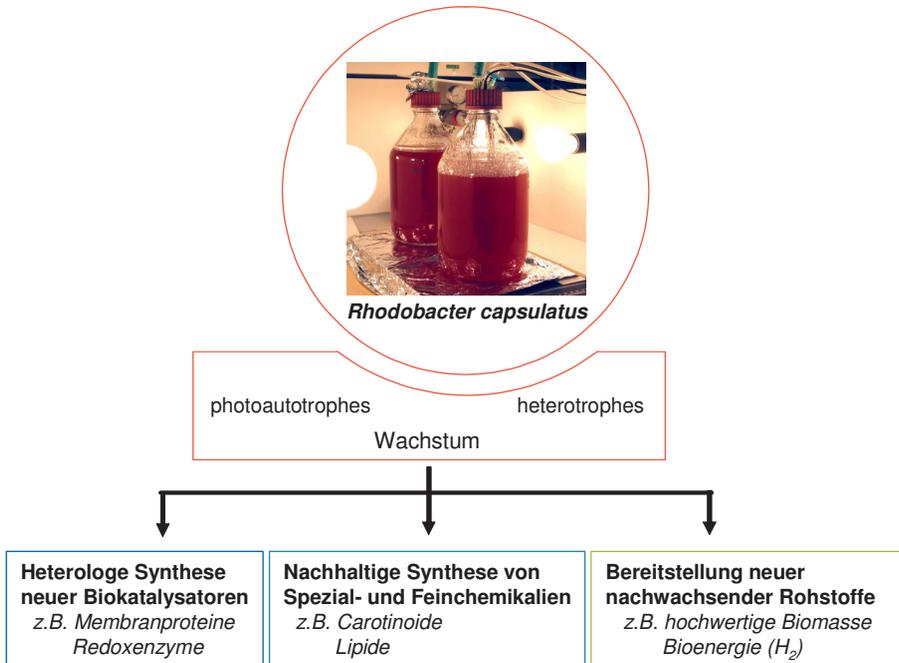


Abb. 4: Einsatzmöglichkeiten des phototrophen Bakteriums *Rhodobacter capsulatus* für die Weiße Biotechnologie.

Phototrophe Bakterien für eine nachhaltige Weiße Biotechnologie

Anoxygen-phototrophe Mikroorganismen wie das gramnegative Purpurbakterium *R. capsulatus* werden trotz ihres vielseitigen Zellstoffwechsels und des großen Potenzials für biotechnologische Produktionsverfahren bislang kaum eingesetzt. Dabei bieten phototrophe

¹⁴ Vgl. Drepper *et al.* (2005: 56).

Bakterien im Gegensatz zu herkömmlichen Mikroorganismen einige Vorteile. Beispielsweise kann *R. capsulatus* unter phototropen Wuchsbedingungen mit Licht als einziger Energiequelle auskommen. Das Bakterium vereint dabei auf hocheffiziente Weise energetische und stoffliche Kreisläufe, was es zu einem idealen Modellorganismus für eine zukunftsweisende phototrophe Biotechnologie macht. Unsere Forschungs- und Entwicklungsziele im Bereich der phototropen Biotechnologie umfassen die nachhaltige Produktion von (1) chemischen Produkten und (2) nachwachsenden Rohstoffen (Abb. 4).

Verwendung von *R. capsulatus* als lichtbetriebene Zellfabrik für die nachhaltige Produktion von Wertstoffen

Grundsätzlich ähnelt das Konzept, phototrophe Bakterien wie *R. capsulatus* für biotechnologische Anwendungen zu nutzen, Zielen der konventionellen Landwirtschaft: Elementare Stoffwechselleistungen wie die Photosynthese und CO₂-Fixierung werden hier genau wie bei herkömmlichen Nutzpflanzen eingesetzt, um Biomasse Energie sparend und CO₂-neutral zu erzeugen. Zusätzlich bietet *R. capsulatus* gegenüber Pflanzen und Algen den Vorteil, Luftstickstoff (N₂) biologisch fixieren zu können.¹⁵ Ein Entwicklungsziel am Institut für Molekulare Enzymtechnologie ist somit, *R. capsulatus* für die photobiotechnologische Produktion von Spezial- und Feinchemikalien sowie für die Erzeugung von Biowasserstoff als erneuerbare Energiequelle einzusetzen: (1) Mit Hilfe von Metabolic Design werden neue *R. capsulatus* Produktionsstämme erzeugt, die speziell lipophile Verbindungen wie z. B. Carotinoide oder Lipide in großen Mengen synthetisieren und im photosynthetischen Membransystem speichern können. (2) *R. capsulatus* ist ein idealer Organismus, um mit Hilfe von Nitrogenasen¹⁶ und Hydrogenasen¹⁷ aus Sonnenenergie Biowasserstoff als alternative Energiequelle zu erzeugen. Auch hier können durch konsequente Stammverbesserungen verschiedene physiologische Engpässe, die die Effizienz der Wasserstoffsynthese deutlich herabsetzen, überwunden werden,¹⁸ was in Zukunft eine hocheffektive H₂-Produktion mit *R. capsulatus* ermöglichen wird.

Molekulares Enzymdesign durch gerichtete Evolution

Enzyme wurden als zelluläre Biokatalysatoren im Rahmen natürlicher Evolutionsprozesse an ihre natürliche Umgebung angepasst; diese ist normalerweise ein wässriges Milieu bei neutralem pH-Wert sowie Normaldruck und moderaten Temperaturen. Der Einsatz von Biokatalysatoren für die Weiße Biotechnologie erfordert aber Umsetzungen mit nicht-natürlichen Substraten unter ebenfalls nicht-natürlichen Reaktionsbedingungen. Ein Beispiel ist die chirale Synthese von Hydroxynitrilen: Die durch die Oxynitrilase katalysierte Addition von Blausäure an Aldehyde oder Ketone muss in saurem Milieu (pH-Wert kleiner als 5,5) durchgeführt werden, um der Stabilität der Produkte Rechnung zu tragen; entsprechende Anforderungen sind an die pH-Stabilität der Enzyme zu stellen. Ein anderes häufig auftretendes Problem ist die fehlende Löslichkeit von Edukten und Produkten in Wasser.

¹⁵ Vgl. Masepohl *et al.* (2004: 141).

¹⁶ Vgl. Masepohl *et al.* (2004: 141).

¹⁷ Vgl. Vignais und Colbeau (2004: 159).

¹⁸ Vgl. Drepper *et al.* (2003: 2203).

Hier muss eine Biokatalysereaktion in organischen Lösungsmitteln stattfinden; auch dafür sind natürliche Enzyme oftmals ungeeignet.

Lösungen zu diesen Fragestellungen bieten die Techniken des *Enzyme Engineering*, wobei die räumliche Struktur eines Enzyms aufgeklärt und dann mit molekularbiologischen Methoden zielgerichtet manipuliert wird, um gewünschte neue Eigenschaften zu entwickeln. Allerdings ist nur für wenige Enzyme die dreidimensionale Struktur bekannt, so dass rationales Enzymdesign in der Mehrzahl der Fälle nicht angewendet werden kann. Ein alternativer molekularbiologischer Lösungsansatz kommt prinzipiell ohne jegliche Struktur und Funktionskenntnis aus und ist dem natürlichen Evolutionsprinzip aus zufälliger Mutation und anschließender Selektion nachempfunden. Dieser Ansatz wird analog zu seinem natürlichen Vorbild als gerichtete Evolution bezeichnet. Die Anwendung des „Mutations-Selektions-Prinzips“ wird im Labor durch zahlreiche Methoden zur zufälligen Mutagenese von Gensequenzen, der Selektion oder dem Screening zum Auffinden verbesserter Enzymvarianten möglich. Die Nachahmung des natürlichen Evolutionsprozesses im Labor ermöglicht zumindest theoretisch, durch Ausüben eines entsprechenden „Selektionsdrucks“ Biokatalysatoren mit jeder gewünschten Eigenschaft herzustellen. Tatsächlich konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass Enzyme mit veränderter Substratspezifität, Thermostabilität, Lösungsmittelstabilität und Enantioselektivität im Labor evolviert werden können.¹⁹

Umfangreiche Studien zur Entwicklung enantioselektiver Lipasen mittels gerichteter Evolution wurden und werden an unserem Institut in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Univ.-Prof. Dr. M. T. Reetz und Univ.-Prof. Dr. W. Thiel (Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim an der Ruhr) durchgeführt. Durch aufeinander folgende Runden von Zufallsmutagenese und Hochdurchsatz-Screening (Abb. 5) konnten die extrazellulären Lipasen aus *Pseudomonas aeruginosa* (PAL) und *Bacillus subtilis* (BSL) gegenüber interessanten Modellsubstraten hinsichtlich ihrer Enantioselektivitäten optimiert werden.²⁰ Schrittweise konnten so aus dem nicht-enantioselektiven PAL-Wildtyp-Enzym Varianten mit hoher Enantioselektivität sowohl gegenüber dem *S*-Enantiomer wie dem *R*-Enantiomer des Substrats 2-Methyldekansäure-*p*-Nitrophenylester entwickelt werden. Außerdem wurden durch Anwendung komplexer theoretischer Methoden wie quanten- und molekularmechanischer Computermodellierungen rationale Erklärungen für die veränderten Enantioselektivitäten dieser Lipasevarianten abgeleitet.²¹ Die Enantioselektivität der BSL in der Desymmetrisierung von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten wurde schrittweise verbessert. Interessanterweise zeigte sich hier, dass mit zunehmender Anzahl von Aminosäureaustauschen im Enzym dessen Stabilität signifikant abnahm.²² Daher wurde für dieses Enzym eine neue Evolutionsstrategie erprobt, die in einer Kombination aus rationalem und evolutivem Design besteht und als „rationale Evolution“ beschrieben werden kann. Zunächst wurden basierend auf der Kenntnis der räumlichen BSL-Struktur²³ zusätzliche Proteindomänen eingefügt, die das katalytische Zentrum des Enzyms flankieren.²⁴

¹⁹ Vgl. Jaeger und Eggert (2004: 305) sowie Bloom *et al.* (2005: 447).

²⁰ Vgl. Liebeton *et al.* (2000: 709) sowie Funke *et al.* (2003: 67).

²¹ Vgl. Bocola *et al.* (2004: 214).

²² Vgl. Funke *et al.* (2003: 67).

²³ Vgl. van Pouderoyen *et al.* (2001: 215).

²⁴ Vgl. Eggert *et al.* (2004: 139).

Im zweiten Schritt, der Evolutionsphase, wurden nun Mutationen in diese zusätzlichen Elemente eingefügt mit dem Ziel, in räumlicher Nähe des katalytischen Zentrums Aminosäureaustausche einzubringen, die eine Erhöhung der Enantioselektivität bewirken, ohne das Enzymrückgrat zu destabilisieren.

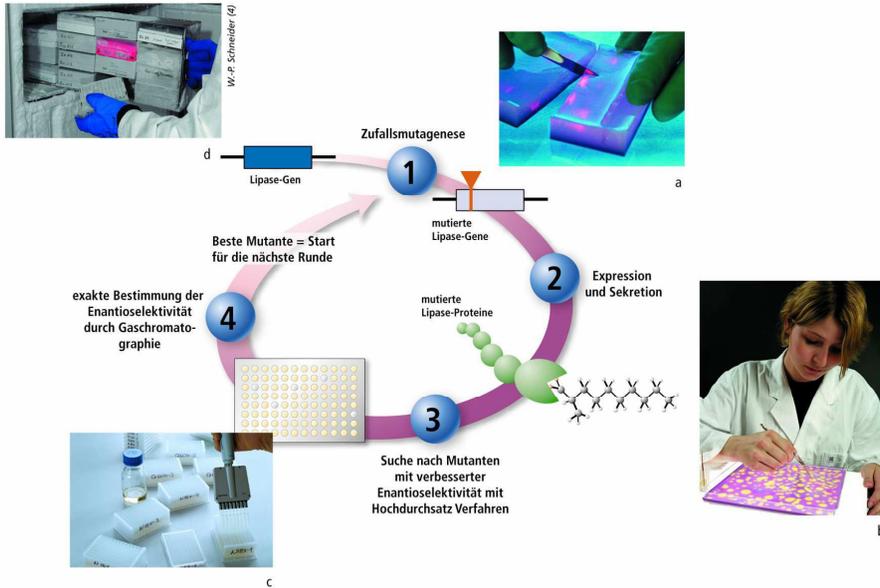


Abb. 5: Gerichtete Evolution zur Optimierung von Biokatalysatoren. (1) Durch Zufallsmutagenese eines Ausgangsgens entsteht eine so genannte Mutantenbibliothek. (2) Die Mutantengene werden in Bakterien vermehrt und in Enzyme übersetzt. (3) Mit verschiedenen Hochdurchsatz-Screeningmethoden werden die entstandenen Enzybibliotheken auf verbesserte Varianten durchmustert und (4) abschließend genauer charakterisiert, bevor sie als Ausgangsmaterial in neue Evolutionsrunden wieder eingebracht werden. (Bildquelle: Forschungszentrum Jülich).

Die gerichtete Evolution als Kombination von effizienten Mutagenese- und Identifizierungsmethoden wird für die zukünftige Weiße Biotechnologie unverzichtbar sein, weil sie eine schnelle und kostengünstige Optimierung von Biokatalysatoren für unterschiedliche industrielle Einsatzgebiete ermöglicht.

Neue Biokatalysatoren für die Chemie

Für spezifische biokatalysierte Reaktionen können entweder isolierte Enzyme oder ganze Zellen eingesetzt werden; die Produkte sind Ausgangsverbindungen oder Zwischenstoffe für chemische Synthesen.

Enzyme zur Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen

Eine Gruppe von Biokatalysatoren mit enormer Bedeutung für die Chemieindustrie sind Enzyme, die den Aufbau von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (C-C-Bindungen) katalysieren. Besonderes Interesse gilt dabei solchen Biokatalysatoren, die chirale Verbindungen als Bausteine für bioaktive Substanzen wie Pharmazeutika zugänglich machen. Da die verschiedenen Enantiomere eines Moleküls oft sehr unterschiedliche Wirkungen ausüben können, wird heute gefordert, dass jeweils beide Enantiomere eines Moleküls getrennt hergestellt und auf ihre Wirkung untersucht werden. Mit klassischen chemischen Methoden ist die Herstellung einzelner Enantiomere oftmals schwierig; hier sind Biokatalysatoren überlegen, die aufgrund der eigenen Chiralität ihrer aktiven Zentren diese Aufgabe in vielen Fällen sehr leicht lösen können. Wertvolle Bausteine für die bioorganische Synthese sind z. B. 2-Hydroxyketone, die durch Folgereaktionen an der Carbonyl- und der Hydroxylfunktion und auch an den Seitenketten R_1 und R_2 (Abb. 6) vielseitig modifiziert werden. Sie sind Bausteine z. B. der Taxolseitenkette, des Ephedrins und des Bupropions, dem Wirkstoff der „Raucherentwöhnungspille“.

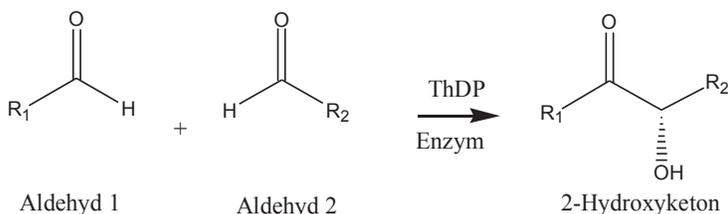


Abb. 6: Schematische Darstellung der Verknüpfung zweier Aldehyde zu einem chiralen 2-Hydroxyketon. Diese Reaktion kann von Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen katalysiert werden.

Geeignete Biokatalysatoren für den Aufbau solcher Moleküle enthalten den Kofaktor Thiamindiphosphat. Dieser ermöglicht durch eine „Umpolungsreaktion“ der Reaktivität an der Carbonylfunktion die C-C-Verknüpfung zwischen zwei Aldehyden zu chiralen 2-Hydroxyketonen (Abb. 6).²⁵ Sowohl die Chiralität als auch die Art und Größe der Seitenketten können durch die Wahl des entsprechenden Biokatalysators beeinflusst werden. Bedingt durch Unterschiede in der Größe und Form der aktiven Zentren, die tief im Inneren dieser Enzyme liegen und durch einen schmalen Kanal zugänglich sind, ändern sich das Substratspektrum und auch die Enantioselektivität. Das Spektrum der enzymatisch zugänglichen 2-Hydroxyketone ist somit unmittelbar von der Diversität der verfügbaren Biokatalysatoren abhängig. Durch Kombination geeigneter Enzyme kann daher ein „Baukasten“ zur Herstellung vieler verschiedener Zwischenstufen für die organische Synthese bereitgestellt werden. Mit drei bereits gut charakterisierten Enzymen – der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*, der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* und der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* – sowie diversen Varianten dieser Biokatalysatoren konnte bereits ein wesentlicher Grundstein für den Aufbau eines solchen Baukastens gelegt werden.²⁶ Dieser wird stetig erweitert durch die konti-

²⁵ Vgl. Pohl *et al.* (2002: 5288) sowie Pohl *et al.* (2004: 335).

²⁶ Vgl. Iding *et al.* (2000: 1483), Dünkemann *et al.* (2002: 12084) sowie Lingen *et al.* (2002: 585).

nuiერიliche Untersuchung und Optimierung neuer ThDP-abhängiger Enzyme hinsichtlich ihres Potenzials zur C-C-Verknüpfung und deren Optimierung im Hinblick auf technisch relevante Aspekte wie Stabilität und Substratspektrum. Hierzu werden einerseits molekularbiologische Methoden wie die gerichtete Evolution und das rationale Proteindesign eingesetzt, andererseits werden die Selektivität und Stabilität dieser Biokatalysatoren durch reaktionstechnische Anpassung der jeweiligen biokatalytischen Reaktionen optimiert. Ziel ist der Aufbau einer Enzybibliothek, durch die eine enantiomere Hydroxyketonbibliothek mit maximaler Diversität zugänglich ist. Auf diesem Weg sollen neue Syntheserouten zu interessanten Produkten aufgezeigt werden, die den Anteil biokatalytischer Teilschritte beim Aufbau komplexer Moleküle weiter steigern sollen.

Ganzzellbiokatalyse zur Synthese chiraler Alkohole

Die asymmetrische Reduktion prochiraler Ketone ist eine der wichtigsten Reaktionen in der organischen Synthese. Enantiomerenreine Alkohole sind bedeutende chirale Bausteine der industriellen Spezial- und Feinchemie, deren Darstellung mit chemischen oder biokatalytischen Methoden erfolgen kann. Nachteile von chemischen Verfahren sind häufig extreme Reaktionsbedingungen sowie unzureichende optische Ausbeuten. Der Einsatz von Enzymen und dabei vor allem von ADHs hat entscheidende Vorteile, zu nennen ist hier insbesondere die Durchführung der Reaktionen unter milden Bedingungen und in wässrigen Systemen. Viele ADHs sind abhängig von den Nicotinamid-Kofaktoren NAD oder NADP und katalysieren den reversiblen Transfer eines Hydridions von NAD(P)H auf eine Carbonylverbindung. Aufgrund des hohen Preises ist die Regenerierung der oxidierten Kofaktoren sehr wichtig, die durch den Zusatz eines zweiten Substrats oder aber durch ein zweites Enzym (Abb. 7) erfolgen kann.

Zwei für industrielle Anwendungen sehr interessante ADHs wurden in unserem Institut isoliert und charakterisiert: eine (*R*)-spezifische, NADP-abhängige ADH aus *Lactobacillus*- und ein (*S*)-spezifisches NAD-abhängiges Enzym aus *Rhodococcus*-Stämmen. Diese Enzyme setzen ein breites Spektrum an Ketonen und Ketoestern stereospezifisch um und zeigen beide als gereinigte Proteine hohe Aktivitäten.²⁷ Beide Enzyme sind auch rekombinant verfügbar, so dass eine praktisch unbegrenzte Enzymversorgung gewährleistet ist. Tabelle 1 zeigt einige Produkte, die mit diesen beiden Enzymen präpariert werden können, wobei die Substrate auch bei hohen Konzentrationen (bis zu 1M) mit hoher Enantioselektivität reduziert werden.

Eine elegante Methode zur Produktion großer Mengen an ADH mit simultaner Kofaktorregenerierung stellt die Koexpression von ADH mit einem kofaktorregenerierendem Enzym dar.²⁸ Aus diesem Grund wurde die (*R*)-spezifische NADP-abhängige ADH aus *Lactobacillus kefir*²⁹ mit einer Reihe von Enzymen koexprimiert, die NADPH regenerieren.³⁰ Als kofaktorregenerierende Enzyme wurden Glucose-Dehydrogenase (GDH) aus *B. subtilis*, Malic Enzyme (MAE) aus *E. coli*, Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) aus *B. subtilis*, Formiat-Dehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* sowie FDH gekoppelt mit Pyridin-

²⁷ (*R*)-ADH: 350 U/mg; (*S*)-ADH: 1.000 U/mg.

²⁸ Vgl. Kataoka *et al.* (1997: 699).

²⁹ Vgl. Weckbecker und Hummel (im Druck), Hummel (1990: 15) sowie Bradshaw *et al.* (1992: 1532).

³⁰ Vgl. Weckbecker (2005).

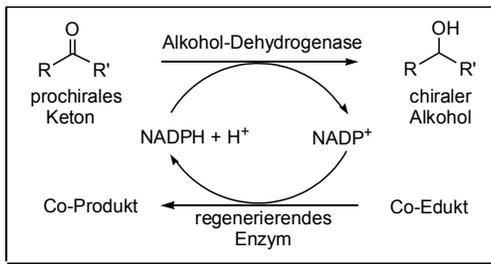


Abb. 7: Prinzip der enzymgekoppelten NADPH-Regenerierung.

(<i>R</i>)-Alkohol-Dehydrogenase (<i>Lactobacillus</i> sp.)	(<i>S</i>)-Alkohol-Dehydrogenase (<i>Rhodococcus</i> sp.)
 (<i>S</i>)-2-Bromo-1-(4-bromo-phenyl)-ethanol (97 % ee)	 (<i>S</i>)-4-Cl-Phenylethanol (> 99 % ee)
 (<i>R,R</i>)-2,5-Hexandiol (> 99 % ee)	 (<i>S</i>)-4-Br-Phenylethanol (97 % ee)
 (<i>S</i>)-6-Cl-5-hydroxy-3-oxo-hexansäure- <i>tert</i> -butylester (> 99,5 % ee)	 (<i>S</i>)-2-Cl-Phenylethanol (> 99 % ee)
 (<i>R</i>)-4-Hydroxy-6-trimethylsilylanyl-hex-5-ensäure-methylester (97 % ee)	 (<i>R</i>)-2-Hydroxy-4-phenyl-buttersäure-ethylester (96 % ee)
 (<i>R</i>)-1-(4-Phenoxy-phenyl)-ethanol (> 99 % ee)	 (<i>S</i>)-1-Phenoxy-propan-2-ol (> 99 % ee)

Tabelle 1: Beispiele für Produkte, die mit der (*R*)- bzw. (*S*)-ADH durch Reduktion der Ketonvorstufe entsprechend Abbildung 7 hergestellt werden können.

Nucleotid-Transhydrogenase (PNT) aus *E. coli* verwendet.³¹ Im Gegensatz zu den anderen regenerierenden Enzymen ist die FDH strikt NAD-abhängig. Sie wurde gewählt, um die geringe NAD-Nebenaktivität der ADH auszunutzen. Das System mit PNT, die den Transfer von Redoxäquivalenten zwischen NADPH und NAD katalysiert, beruht dagegen wiederum auf der NADP-Abhängigkeit der ADH.

Nach der Konstruktion und Charakterisierung der Ganzzellbiokatalysatoren wurden verschiedene prochirale Ketone als Substrate in Ganzzellbiotransformationen eingesetzt. Als Beispiel wird hier Acetophenon, das Standardsubstrat der ADH aus *L. kefir*, beschrieben. Die spezifischen Zellaktivitäten, die bei der Reduktion von 10 mM Acetophenon mit den unterschiedlichen Systemen erreicht wurden, lagen im Bereich von ein bis 3.000 Enzymeinheiten pro Gramm Zellfeuchtmasse, wobei mit dem System ADH-GDH mit Abstand die besten Ausbeuten erreicht wurden. Das System GDH-ADH enthält zwar die gleichen Enzyme, allerdings ist die Reihenfolge der Gene auf dem Plasmid umgekehrt. Dieses Konstrukt lieferte deutlich schlechtere Zellaktivitäten (1.500 Enzymeinheiten pro Gramm Zellfeuchtmasse), was ein Beweis dafür ist, dass nicht nur die Expression der jeweiligen Enzyme, sondern auch deren Verhältnis zueinander eine wichtige Rolle spielt. Die beiden Systeme, die die FDH enthalten, lieferten dagegen vergleichsweise schlechte Ausbeuten (ein bis drei Enzymeinheiten pro Gramm Zellfeuchtmasse).

Die hohen erreichten Zellaktivitäten der meisten Systeme sind ein Maß für die Qualität dieser Ganzzellbiokatalysatoren und zeigen, dass mit diesen Stämmen effiziente asymmetrische Reduktionen möglich sind. Alle Reaktionen verliefen zudem mit ausgezeichneten Enantioselektivitäten von mehr als 99,9 Prozent *ee*. Dieses biokatalytische Verfahren ist also ein Paradebeispiel für die Effizienz der Weißen Biotechnologie zur Herstellung einer Vielzahl chiraler Verbindungen mit hohen optischen Ausbeuten und unter milden Reaktionsbedingungen.

Danksagung

Die Arbeiten am Institut für Molekulare Enzymtechnologie werden gefördert von der Europäischen Kommission, den Bundesministerien für Bildung und Forschung (BMBF) sowie Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), dem Deutschen Akademischen Austausch Dienst (DAAD) und der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU).

Wir danken zahlreichen Kooperationspartner aus Forschung und Industrie, insbesondere den Professoren Gerhard Gottschalk (Universität Göttingen), Wolfgang Streit (Universität Hamburg), Manfred T. Reetz, Walter Thiel (beide Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim an der Ruhr) und Michael Müller (Universität Freiburg).

³¹ Vgl. Weckbecker und Hummel (2004: 1739).

Literatur

- AMANN, R. I., W. LUDWIG und K. H. SCHLEIFER. „Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation“, *Microbiological Reviews* 59 (1995), 143-169.
- BELL, P. J., A. SUNNA, M. D. GIBBS, N. C. CURACH, H. NEVALAINEN und P. L. BERGQUIST. „Prospecting for novel lipase genes using PCR“, *Microbiology* 148 (2002), 2283-229.
- BLOOM, J. D., M. M. MEYER, P. MEINHOLD, C. R. OTEY, D. MACMILLAN und F. H. ARNOLD. „Evolving strategies for enzyme engineering“, *Current Opinion in Structural Biology* 15 (2005), 447-452.
- BOCOLA, M., N. OTTE, K.-E. JAEGER, M. T. REETZ und W. THIEL. „Learning from directed evolution: theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity“, *Chembiochem* 5 (2004), 214-223.
- BRADSHAW, C. W., W. HUMMEL und C.-H WONG. „*Lactobacillus kefir* alcohol dehydrogenase: a useful catalyst for synthesis“, *Journal of Organic Chemistry* 57 (1992), 1532-1536.
- DREPPER, T., S. GROSS, A. F. YAKUNIN, P. C. HALLENBECK, B. MASEPOHL und W. KLIPP. „Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*“, *Microbiology* 149 (2003), 2203-2212.
- DREPPER, T., S. ARVANI, F. ROSENAU, S. WILHELM und K.-E. JAEGER. „High-level transcription of large gene regions: a novel T(7)RNA-polymerase-based system for expression of functional hydrogenases in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*“, *Biochemical Society Transaction* 33 (2005), 56-58.
- DÜNKELMANN, P., D. KOLTER-JUNG, A. NITSCHKE, A. S. DEMIR, P. SIEGERT, B. LINGEN, M. BAUMANN, M. POHL und M. MÜLLER. „Development of a donor-acceptor concept for enzymatic cross-coupling reactions of aldehydes: the first asymmetric cross-benzoin condensation“, *Journal of the American Chemical Society* 124 (2002), 12084-12085.
- EGGERT, T., C. LEGGEWIE, M. PULS, W. STREIT, G. VAN POUDEROYEN, B. W. DIJKSTRA und K.-E. JAEGER. „Novel biocatalysts by identification and design“, *Biocatalysis and Biotransformation* 22 (2004), 139-144.
- ELEND, C., C. SCHMEISSER, C. LEGGEWIE, P. BABIAK, J. D. CARBALLEIRA, H. L. STEELE, J.-L. REYMOND, K.-E. JAEGER und W. R. STREIT. „Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases“, *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2006), 3637-3645.
- FUNKE, S. A., A. EIPPER, M. T. REETZ, N. OTTE, W. THIEL, G. VAN POUDEROYEN, B. W. DIJKSTRA, K.-E. JAEGER und T. EGGERT. „Directed evolution of an enantioselective *Bacillus subtilis* lipase“, *Biocatalysis and Biotransformation* 21 (2003), 67-73.
- HENNE, A., R. A. SCHMITZ, M. BOMEKE, G. GOTTSCHALK und R. DANIEL. „Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*“, *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000), 3113-3116.
- HUMMEL, W. „Reduction of acetophenone to R(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*“, *Applied Microbiology and Biotechnology* 34 (1990), 15-19.
- IDING, H., T. DÜNNWALD, L. GREINER, A. LIESE, M. MÜLLER, P. SIEGERT, J. GRÖTZINGER, A. S. DEMIR und M. POHL. „Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones“, *Chemical European Journal* 6 (2000), 1483-1495.
- JAEGER, K.-E. und T. EGGERT. „Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution“, *Current Opinion in Biotechnology* 15 (2004), 305-313.

- KATAOKA, M., L. P. ROHANI, K. YAMAMOTO, M. WADA, H. KAWABATA, K. KITA, H. YANASE und S. SHIMIZU. „Enzymatic production of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate: asymmetric reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by an *Escherichia coli* transformant expressing the aldehyde reductase gene from yeast“, *Applied Microbiology and Biotechnology* 48 (1997), 699-703.
- LEGGEWIE, C., T. DREPPER, T. EGGERT, W. HUMMEL, M. POHL, F. ROSENAU und K.-E. JAEGER. „Weiße Biotechnologie“, *Chemie Ingenieur Technik* 78 (2006a), 1-10.
- LEGGEWIE, C., H. HENNING, C. SCHMEISSER, W. R. STREIT und K.-E. JAEGER. „A novel transposon for functional expression of DNA libraries“, *Journal of Biotechnology* 123 (2006b), 281-287.
- LIEBETON, K., A. ZONTA, K. SCHIMOSSEK, M. NARDINI, D. LANG, B. W. DIJKSTRA, M. T. REETZ und K.-E. JAEGER. „Directed evolution of an enantioselective lipase“, *Chemistry & Biology* 7 (2000), 709-718.
- LIEBETON, K. und J. ECK. „Identification and Expression in *E. coli* of novel nitrile hydratases from the metagenome“, *Engineering in Life Sciences* 4 (2004), 557-562.
- LINGEN, B., J. GRÖTZINGER, D. KOLTER, M.-R. KULA und M. POHL. „Improving the carboxylase activity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by a combination of directed evolution and site-directed mutagenesis“, *Protein Engineering* 15 (2002), 585-593.
- MASEPOHL, B., T. DREPPER und W. KLIPP. „Nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*“, in: W. KLIPP, B. MASEPOHL, J. R. GALLON und W. E. NEWTON (Hrsg.). *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria*. Bd. II. Dordrecht u. a. 2004, 141-173.
- NELSON, K. E., C. WEINEL, I. T. PAULSEN, R. J. DODSON *et al.* „Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440“, *Environmental Microbiology* 4 (2002), 799-808.
- POHL, M., B. LINGEN und M. MÜLLER. „Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: new aspects of asymmetric C-C bond formation“, *Chemistry* 8 (2002), 5288-5295.
- POHL, M., G. A. SPRENGER und M. MÜLLER. „A new perspective on thiamine catalysis“, *Current Opinion in Biotechnology* 15 (2004), 335-342.
- ROSENAU, F. und K.-E. JAEGER. „Design of systems for overexpression of *Pseudomonas* lipases“, in: A. SEVENDSEN (Hrsg.). *Enzyme Functionality: Design, Engineering, and Screening*. New York 2003, 617-631.
- ROSENAU, F. und K.-E. JAEGER. „Overexpression and Secretion of *Pseudomonas* Lipases“, in: J. L. RAMOS (Hrsg.). *Pseudomonas*. Bd. 3. New York 2004, 491-508.
- ROSENAU, F., J. TOMMASSEN und K.-E. JAEGER. „Lipase-specific foldases“, *Chembiochem* 5 (2004), 152-161.
- SCHMID, A., J. S. DORDICK, B. HAUER, A. KIENER, M. WUBBOLTS und B. WITHOLT. „Industrial biocatalysis today and tomorrow“, *Nature* 409 (2001), 258-268.
- VAN POUDEROYEN, G., T. EGGERT, K.-E. JAEGER und B. W. DIJKSTRA. „The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme“, *Journal of Molecular Biology* 309 (2001), 215-226.
- VIGNAIS, P. M. und A. COLBEAU. „Molecular biology of microbial hydrogenases“, *Current Issues in Molecular Biology* 6 (2004), 159-188.
- WECKBECKER, A. und W. HUMMEL. „Improved synthesis of chiral alcohols with *Escherichia coli* cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP+-dependent alcohol dehydrogenase and NAD+-dependent formate dehydrogenase“, *Biotechnological Letters* 26 (2004), 1739-1744.

WECKBECKER, A. *Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese von chiralen Alkoholen*. Dissertation. Düsseldorf 2005.

WECKBECKER, A. und W. HUMMEL. „Enzyme-catalyzed regeneration of nicotinamide coenzymes“, *Biocatalysis and Biotransformation*(im Druck).

WICHMANN, R., C. WANDREY, A. F. BÜCKMANN und M.-R. KULA. „Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration“, *Biotechnology and Bioengineering* 23 (1981), 2789-2802.

