



Biokatalyse auf neuen Wegen

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger:

Technische Universität Berlin, Institut für Chemie/Organische Chemie, AK Biokatalyse, Prof.
Dr. Nediljko Budisa

Förderkennzeichen:

0315876A, PT-J

Vorhabenbezeichnung:

BIOKATALYSE2021: P29: Kongenere Lipasen mit verbesserter katalytischer Aktivität und
Substratzugang

Laufzeit des Vorhabens:

3 Jahre

Berichtszeitraum:

01.10.2010 – 30.11.2013

2 Ergebnisse

Aufgrund bereits vorhandener Expertise durch Vorarbeiten an der *Thermoanaerobacter thermohydrosulphuricus* Lipase (TTL) von Seiten der Projektpartner TUB und EMBL wurden erste Einbaustudien von nichtkanonischen Aminosäuren direkt mit diesem Enzym durchgeführt (siehe unten).

Parallel dazu wurden vom Partner TUHH weitere potentiell geeignete Lipasen (und Esterasen) aufgrund einer Vorcharakterisierung ausgewählt (siehe Abschlussbericht TUHH). Die ausgewählten Enzyme (siehe Tabelle 1) wurden fristgerecht für eine weitere Bearbeitung an die TUB übergeben (Arbeitspaket 1).

Tabelle 1. Übersicht über die im Projekt P29 bearbeiteten Enzyme. Zur besseren Zuordnung ist die BCC (Biocat Collection Nummer) der TUHH angegeben.

BCC-Nr.	Enzym	Organismus	Name	Swissprot ID	Kristallstruktur
008	Esterase	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	GTE	Q9AM95	EMBL (im Laufe des vorliegenden geförderten Projekts)
009	Lipase	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	GTL	Q9X6A4	Keine, aber hohe Sequenzsimilarität zu 1J13
010	Lipase	<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulphuricus</i>	TTL	-	EMBL (nicht publiziert)
011	Lipase	<i>Anaerobranca gottschalkii</i>	AGL	-	Keine
013	Lipase	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	TTEL	Q8R921	Keine
036	Lipase	<i>Thermocrispum municipale</i>	TML	-	Keine
064	Lipase	From soil metagenome	LipCE	A7J993	Keine

Um eine hohe Flexibilität bezüglich nutzbarer Einbaumethoden und Expressionsstämme (vor allem Aminosäure auxotrophe Stämme für die supplementations-basierte Einbaumethode) zu erhalten, wurden die erhaltenen Enzyme in das pQE80L Vektorsystem überführt (siehe Abbildung 1). Anschließend wurden die Vollproteinmassen der jeweiligen Wildtypproteine bestimmt, da eine korrekte Ausgangsmasse für die Detektion der Aminosäureeinbauten unerlässlich ist. Für alle gereinigten Proteine konnte die korrekte Wildtyp Masse detektiert werden.

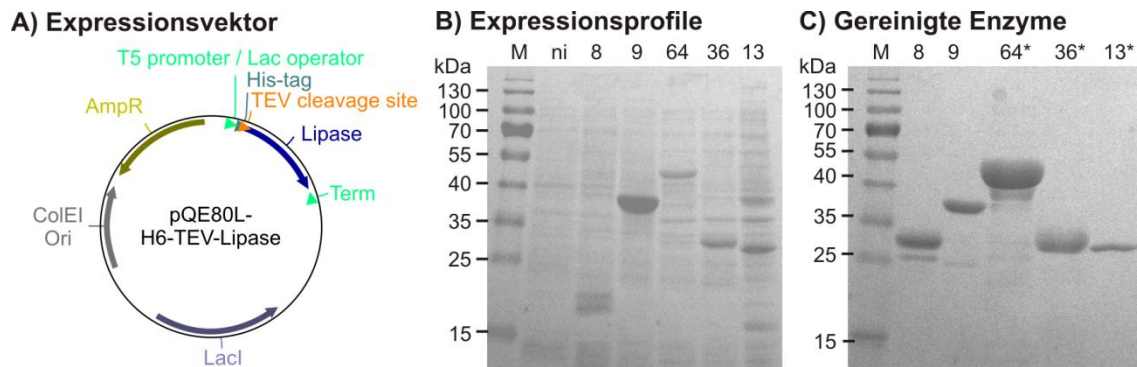


Abbildung 1. **A)** Vektorkarte des Standard-Expressionsvektors, der in den beschriebenen Studien genutzt wurde. **B)** Expressionsprofile der verschiedenen Lipasen BCC8, BCC9, BCC64, BCC36, und BCC13. M: Marker, ni: nicht induziert. **C)** Gereinigte, aktive Lipasen. Die mit * markierten Enzyme wurden in *E. coli* in Einschlusskörpern exprimiert und wurden zurückgefaltet, um aktive Enzyme zu erhalten.

2.1 SPI Einbaustudien

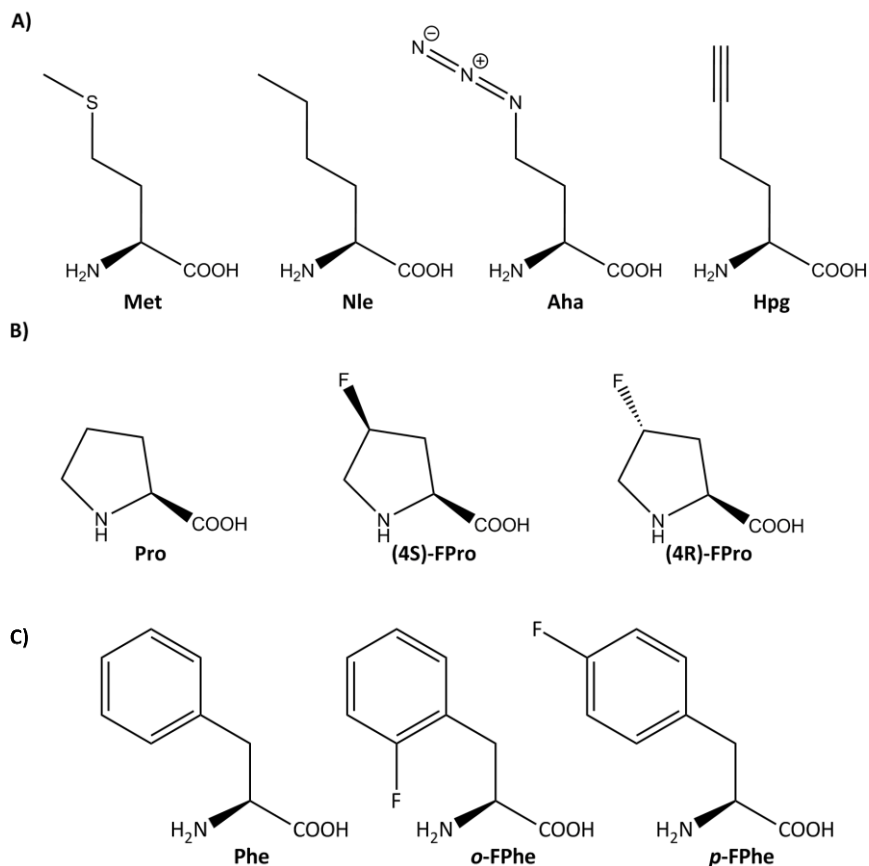


Abbildung 2. Kanonische Aminosäuren und ihre nichtkanonischen Analoga A: Methionin (Met), Norleucin (Nle), Azidohomoalanin (Aha) und Homopropargylglycin (Hpg). B: Prolin (Pro),

(4S)-Fluoroprolin (cFP) und (4R)-Fluoroprolin (tFP) C: Phenylalanin (Phe), o-Fluorophenylalanin (oFF) und p-Fluorophenylalanin (pFF).

2.1.1 GTE

Von der GTE konnten die in Abbildung 3 gezeigten Kongenere in guter Reinheit und Ausbeute mit abgespaltetem His-Tag erhalten werden. Eine analytische Gelfiltrationsanalyse zeigte, dass alle Kongenere wie der Wildtyp als Monomere vorliegen. Die Massenanalyse der Kongenere ergab einen quantitativen Einbau aller Analoga. Bei der GTE[mFF] war dies jedoch stark stammspezifisch (siehe Absatz 3).

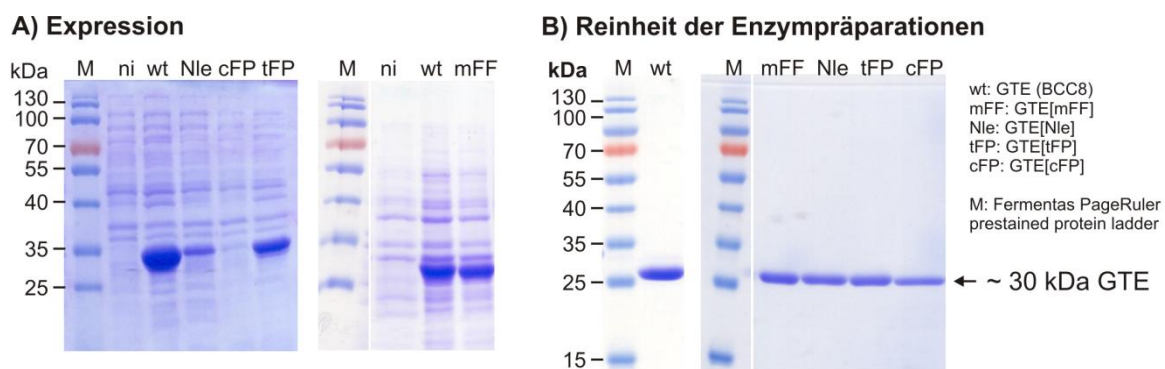


Abbildung 3. Expression (A) und Reinheit (B) von GTE und dessen Kongeneren.

Die Proteine wurden der TUHH zur halbautomatisierten Hochdurchsatzcharakterisierung und dem EMBL zur Kristallisation übergeben. Sowohl der Wildtyp als auch die Kongenere konnten erfolgreich kristallisiert werden. Die Charakterisierung ergab im Unterschied zur TTL (siehe unten) keine außergewöhnlichen positiven Veränderungen bezüglich Substratzugänglichkeit oder Resistenz gegenüber Additiven. Einzig die GTE[Nle] zeigte eine höhere Aktivität als die Wildtyp-GTE auf dem Substrat *p*-Nitrophenylcaprylat. Außerdem konnte ein breiteres pH Optimum und eine erhöhte Resistenz gegenüber 2-Iodoacetat detektiert werden. Details zu den Ergebnissen finden sich in den jeweiligen Abschlussberichten der Projektpartner. Eine weitere Auffälligkeit waren signifikante Unterschiede zwischen den Kongeneren GTE[cFP] und GTE[tFP] in vielen der bestimmten Charakterisierungsparameter. Zum Beispiel war die Expression von GTE[cFP] eher schlecht, während GTE[tFP] zellnormiert wesentlich besser exprimiert wurde (siehe Abbildung 3). In von uns durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen mittels thermischer Denaturierung (auf Basis von CD Spektroskopie) zeigten beide stark verringerte Stabilität im Vergleich zum Wildtyp, während GTE[Nle] und GTE[mFF] in ihrer Stabilität nicht signifikant vom Wildtyp abwichen (siehe Tabelle 2). Die Destabilisierung von GTE[cFP] war jedoch noch wesentlich

ausgeprägter. Unsere Fit-Analysen der chemischen Denaturierungsdaten (Denaturierungsmittel Guanidiniumchlorid) des Projektpartners TUHH ergaben dieselben Tendenzen. Derzeit versuchen wir diese Ergebnisse rational zu begründen und anhand der hochaufgelösten kristallographischen Strukturdaten des EMBL (Wilmanns Group) zu erklären. Die gesammelten GTE Ergebnisse sollen zeitnah publiziert werden (vorläufiger Titel des Papers ist: “*Structural basis for alternation in enzymatic activity of GTE congeners*“).

Tabelle 2. Thermodynamische Parameter von GTE und dessen Kongeneren. Die Daten wurden durch 6 Parameter Fit aus den CD basierten Schmelzkurven der Proteine generiert.

	GTE	GTE[Nle]	GTE[cFP]	GTE[tFP]	GTE[mFF]
$T_M / ^\circ\text{C}$	69	70	61	63	70
$\Delta H_M / \text{kJ/mol}$	31	14	10	17	25
$\Delta G_U^{25^\circ\text{C}}$	-104	-47	-40	-63	-81

2.1.2 GTL

Im Falle der GTL wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Aminosäure-Analoga eingebaut. Es war mit allen Kongeneren eine sehr gute Expression zu beobachten. Mit Ausnahme von GTL[cFP] wurden alle Kongenere wie der Wildtyp löslich exprimiert. Die durchgeführten Rückfaltungsstudien an denaturierend aufgereinigtem GTL[cFP] ergaben kein positives Ergebnis. Generell zeigte sich, dass die GTL nach der Reinigung im Puffer nicht sehr stabil war und zur Präzipitation neigte. Der Einbau von nichtkanonischen Aminosäuren verstärkte diesen Effekt in allen Fällen zusätzlich. Trotz des Tests einer Vielzahl von Pufferbedingungen konnte die Präzipitationstendenz nicht vollständig unterdrückt werden. Auch die vom Kooperationspartner EMBL durchgeführten Thermofluor Screens ergaben keine verbesserten Pufferbedingungen.

Tabelle 3. Übersicht über die hergestellten GTL Kongenere.

Wildtyp/ Kongener	Expression	Reinigung/ Rückfaltung	Quantitativer Einbau	His-Tag Abspaltung	HT Charakter- isierung
Wildtyp	✓	✓	✓	✓	✓
Aha	✓	✓	✓	-	
Hpg	✓	✓	✓	-	
Nle	✓	✓	✓	✓	✓
cFP	✓	X	✓		
tFP	✓	✓	✓	✓	✓
pFF	✓	✓	X		
oFF	✓	✓	X		

An GTL und GTL[Nle] wurden auch dynamische Lichtstreuungsexperimente durchgeführt, die ergaben, dass beide Proteine in Lösung sehr polydispers vorliegen.

Im Falle von GTL[Aha] und GTL[Hpg] führte die Inkubation mit TEV Protease zur His-Tag Abspaltung zur kompletten Präzipitation der Proteine. Letztlich konnten daher nur Präparationen von GTL, GTL[Nle] und GTL[tFP] zur HT Charakterisierung an die TUHH übergeben werden. Diese ergab für alle getesteten Parameter eine geringere Aktivität der Kongenere gegenüber dem Wildtyp Enzym (vergleiche Bericht der TUHH). Am EMBL wurde trotz der schlechten Thermofluor und Lichtstreuungsversuche ein Kristallisationsscreening mit GTL und GTL[Nle] durchgeführt. Dieses führte jedoch auch zu keinem positiven Ergebnis.

Aufgrund des geringen Erfolgs der Arbeiten mit GTL wurde davon abgesehen, weitere Kongenere zu produzieren.

2.1.3 TTL

Mit den Arbeiten an der TTL wurde bereits vor Projektstart begonnen, weshalb die Bearbeitung dieser Enzymserien am weitesten fortgeschritten ist. Insgesamt wurden 13 verschiedene Kongenere hergestellt, die teilweise stark verbesserte Eigenschaften im Vergleich zum Wildtyp-Enzym aufwiesen. Exemplarisch sind in Abbildung 4 einige herausstechende Ergebnisse dargestellt. Die Ergebnisse wurden bereits in Fachartikeln (siehe Ref.: Hoesl et al. und Acevedo Rocha et al.) publiziert. Die Eigenschaften der TTL[Nle], die im Gegensatz zum Wildtyp Enzym keine Hitzeaktivierung mehr benötigt (siehe Abbildung 4), wurden auch patentrechtlich geschützt (EP10177742.3).

2.1.3.1 Kristallisation von TTL und TTL[Nle]

Um die strukturellen Eigenschaften, die zu diesen erstaunlichen Eigenschaften der TTL[Nle] im Vergleich zum Wildtyp Enzym geführt haben, besser verstehen zu können, war es eines der erklärten Ziele dieses Projekts, TTL und TTL[Nle] zu kristallisieren und strukturell zu charakterisieren. Für TTL existiert bereits eine Kristallstruktur (EMBL, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese wurde allerdings unter anderem durch Hitzedenaturierung von *E. coli* Proteinen gereinigt und stellt somit evtl. die bereits aktivierte Form der TTL dar. Daher war es nötig, die TTL nochmals ohne eine Hitzedenaturierung zu reinigen. Zahlreiche verschiedene Konstrukte wurden für die Expression und Reinigung getestet (unter anderem N-term. His Tag mit TEV Schnittstelle, selbstsplicende Inteinstrukture, etc.). Trotz dieser

intensiven Suche scheiterte die Kristallisation jedoch letztlich, da keine TTL Version in den Screens des EMBL zu Kristallen führte.

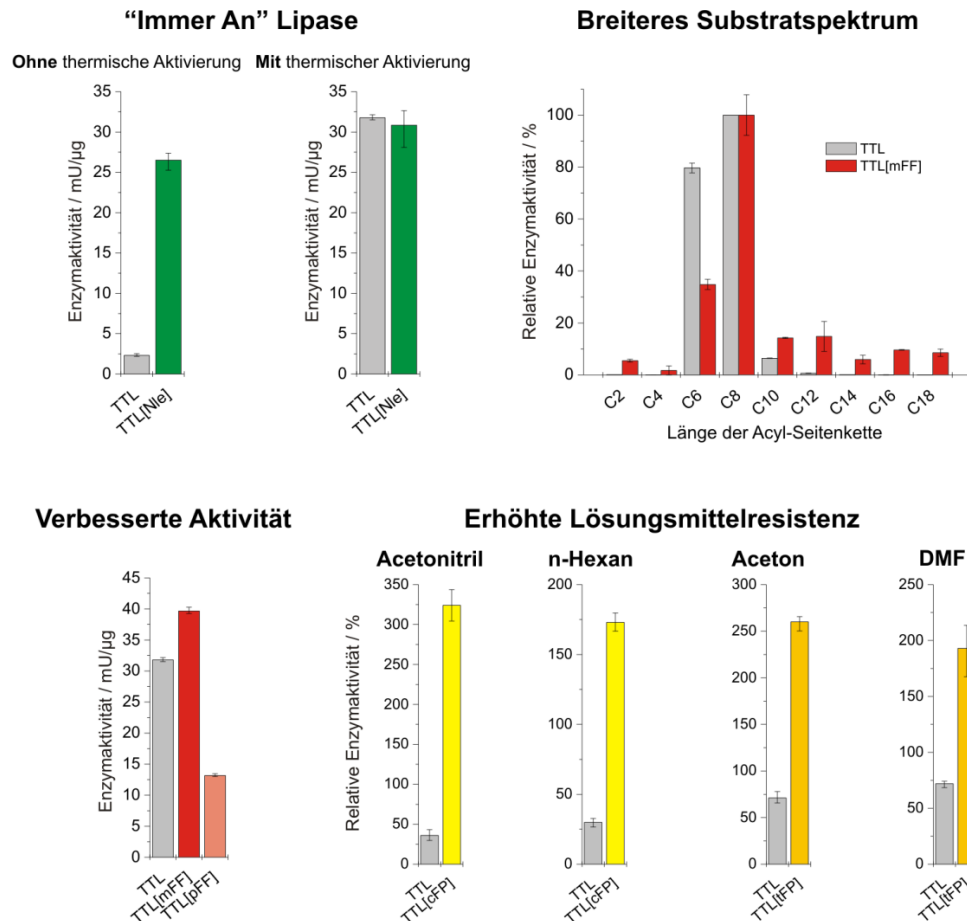


Abbildung 4. Ausgewählte Ergebnisse der Studien an TTL und ihren Kongeneren.

2.1.3.2 Funktionalisierung von TTL mittels Click-Chemie

Weitaus erfolgreicher waren im Kontrast dazu weiterführende Arbeiten an der TTL, die auf posttranslationale Vielfachmodifizierung des Enzyms abzielten. Dafür wurde eine TTL Variante erstellt, die zum einen einen modifizierten N-terminus (Serin an Position 2 der Sequenz) für Oximligation aufwies und zum anderen Azidohomoalanin an den Methioninpositionen enthielt, an die mittels Click-Chemie weitere Liganden konjugiert werden konnten. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Christian Hackenberger (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie) durchgeführt. Konkret wurde der N-Terminus der TTL mit Biotin modifiziert und verschiedene Glykosylierungen an die Aha Reste angebracht. Über das Biotin wurde das Protein für SPR Messungen an eine Gold Oberfläche konjugiert, so dass Lectin-Bindestudien zum Nachweis der geclickten Zucker

durchgeführt werden konnten. Eine Publikation der Ergebnisse ist bereits eingereicht (Mühlberg et al.). Derzeit wird untersucht, inwieweit sich derartige Multikonjugationsstrategien zur Immobilisierung (siehe unten) und Stabilisierung von Enzymen eignen.

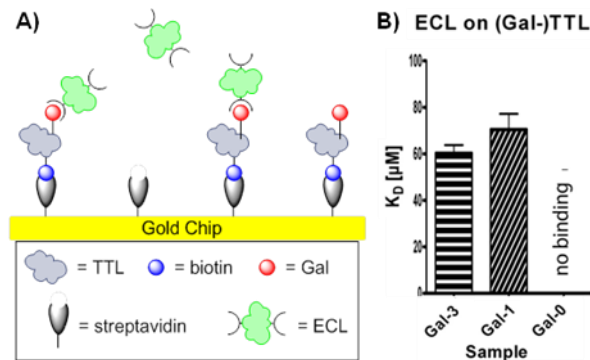


Abbildung 5. A) Generelle Strategie zum Nachweis der einzelnen Funktionalisierungen der TTL. Über das Biotin am N-Terminus wurde die TTL mittels Streptavidin an einen Gold-Chip aufgebracht. **B)** Über SPR Messungen konnten Bindekonstanten von Lectinen zur artifiziiell glykosylierten TTL gemessen werden. Die war für die unglykosylierte Negativkontrolle nicht möglich. Abbildung wurde von C. Hackenberger FMP Berlin zur Verfügung gestellt.

2.1.3.3 Medium Sekretion von TTL

Aus biotechnologischen Gesichtspunkten ist die intrazelluläre Produktion von Enzymen in *E. coli* oft aufwändig und teuer, da das entsprechende Enzym erst gereinigt werden muss. Eine Sekretion ins Medium wie etwa in *Pichia pastoris* basierten Expressionssystemen erhält daher in der Praxis oft den Vorzug. Vor einigen Jahren haben wir bereits an einem System zur Proteinsekretion für *E. coli* gearbeitet (Karbalaei-Heidari, 2008). Mit unserem Kooperationspartner Hamid Karbalaei-Heidari haben wir dieses System im Zuge des P29 Projekts auch auf die Sekretion von Wildtyp TTL ausgeweitet. Die Arbeiten sind bereits zur Publikation akzeptiert und werden in Kürze veröffentlicht ("Protein Expression and Purification" Journal). In der nahen Zukunft planen wir, diese Experimente auch auf Lipase Kongenere auszuweiten.

2.1.4 LipCE

Die LipCE war vor allem aufgrund der Tatsache besonders interessant, dass es die einzige kälteaktive Lipase in unserem Set war. Außerdem weiß sie nur schwache Homologie mit schon bekannten Lipasen auf. Daher war vor allem auch die Kristallisation der LipCE ein interessantes Ziel. Die Expression und Rückfaltung genau wie der quantitative Einbau der

Methioninanaloga Nle und Aha verlief bei der LipCE reibungslos. Allerdings ließ sich keine der Proteinvarianten trotz verschiedenster Aufreinigungsstrategien zur Homogenität reinigen, da immer teilweise proteolytischer Abbau des Proteins auftrat. Zusätzlich dazu lagen die Proteine nach Untersuchungen am EMBL immer in polydispers in Lösung vor. Daher scheiterten auch alle Versuche einer Kristallisierung der LipCE.

Tabelle 4. Übersicht über die hergestellten LipCE Kongenere.

Wildtyp/ Kongener	Expression	Reinigung/ Rückfaltung	Quantitativer Einbau	His-Tag Abspaltung	HT Charakter- isierung
Wildtyp	✓	✓	✓	✓	X
Nle	✓	✓	✓	✓	X
Aha	✓	✓	✓	✓	X

2.1.5 AGL

Die in Tabelle 5 aufgelisteten Proteine wurden produziert und der TUHH zur weiteren Charakterisierung übergeben. Im HT Screening konnte aber bei keinem der Enzyme Aktivität nachgewiesen werden. Wir gehen davon aus, dass die AGL generell relativ schnell ihre Aktivität verliert und daher nach der Expression, dem Reinigen und dem Versand die Aktivität bereits vollständig verloren gegangen war. Daher wurden die Arbeiten an der AGL nicht weiterverfolgt.

Tabelle 5. Übersicht über die hergestellten AGL Kongenere.

Wildtyp/ Kongener	Expression	Reinigung/ Rückfaltung	Quantitativer Einbau	His-Tag Abspaltung	HT Charakter- isierung
Wildtyp	✓	✓	✓	✓	X
Nle	✓	✓	✓	✓	X
cFP	✓	✓	✓	✓	X
tFP	✓	✓	✓	✓	X
mFF	✓	✓	X	✓	X

2.1.6 TTEL

Es wurden Wildtyp sowie die Fluoroprolin Kongenere TTEL[cFP] und TTEL[tFP] exprimiert, zurückgefaltet und der TUHH zur HT Charakterisierung übergeben. Erste Ergebnisse zeigen starke Veränderungen der Enzymeigenschaften und verbesserte Aktivität z.B. gegen 4-Nitrophenylbutyrat (nähere Informationen im Bericht der TUHH). Insgesamt sind die ersten Ergebnisse hier sehr positiv, weshalb wir die Charakterisierung auch über die Projektlaufzeit

hinaus fortführen werden. Die Erstellung weiterer Kongenere ist aber erst einmal nicht geplant.

Tabelle 6. Übersicht über die hergestellten TTEL Kongenere.

Wildtyp/ Kongener	Expression	Reinigung/ Rückfaltung	Quantitativer Einbau	HT Charakter- isierung	Kristallisierung
Wildtyp	✓	✓	✓	✓	gestartet
cFP	✓	✓	✓	✓	
tFP	✓	✓	✓	✓	

3 Stammengineering für verbesserte Aminosäure auxotrophe Expressionsstämme

Zur weiteren Verbesserung der Einbaueffizienz der SPI Methode haben wir im Laufe des Projekts eine große Zahl von verschiedenen Stämmen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen auf verbesserten Einbau evaluiert. Dabei wurden teilweise sehr unterschiedlich ausgeprägte Einbaueffizienzen gefunden. Ein Beispiel ist in Abbildung 6 dargestellt. Während der Stamm *E. coli* CAG12158 eine große Verteilung von verschiedenen mFF Einbauspezies zeigt, ist es mit dem Stamm *E. coli* ME5355 möglich, ein uniform gelabeltes Protein zu produzieren.

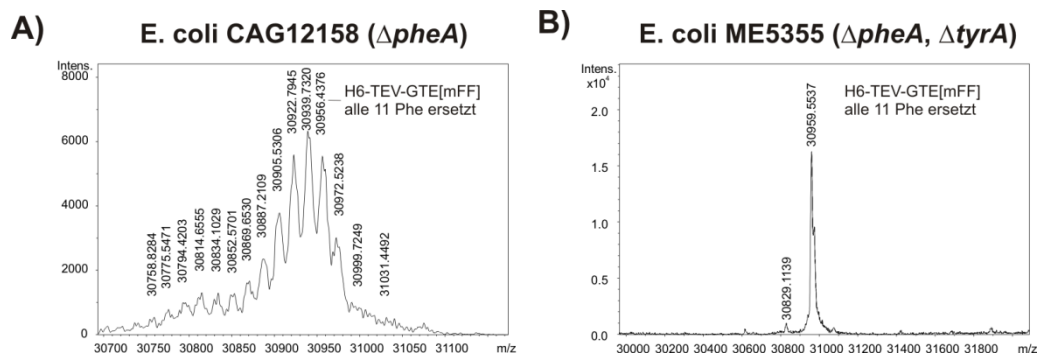


Abbildung 6. Massenspektren von GTE aus einem SPI Versuch in A) *E. coli* CAG12158 und B) ME5355.

Um diese Ergebnisse zu rationalisieren und herauszufinden, welche Determinanten für einen Volleinbau bei den einzelnen Auxotrophien nötig sind, haben wir gezielt bestimmte Biosynthesegene aus dem Genom entfernt und den Effekt auf den Einbau studiert. Ausgehend vom Ergebnis aus Abbildung 6 erstellten wir einen BL21(DE) $\Delta pheA, \Delta tyrA$ Stamm, da der ME5355 diese beiden Gene deletiert hatte und daher der Verdacht nahe lag,

dass durch die Doppelmutation ein verbesserter Einbau erreicht werden kann. Die Einbaueffizienz war in der Tat besser als die der Einzeldelation, eine Masse analog des ME5355 konnte aber bisher nicht erzielt werden. Wir prüfen derzeit schrittweise weitere Deletionen, um die effizienteste Kombination zu isolieren. Durch die im Vergleich zu Einzel-Knockout Stämmen verbesserter Einbaueffizienz und den BL21(DE3) Hintergrund haben wir den Stamm den Kooperationspartner der TUHH zur Verfügung gestellt, um damit Fermenterexperimente durchführen zu können (Für Phe und Tyr Auxotrophien war vorher kein geeigneter Stamm vorhanden, der im Fermenter gute Wachstumseigenschaften zeigte). Dieselben Arbeiten haben wir parallel in MG1655 mit Prolin Auxotrophien durchgeführt. Dies ist jedoch ungleich komplexer, da z.B. viele verschiedene potentielle Querverbindungen zwischen Arg und Pro Biosyntheseweg bestehen (z.B.: (Itikawa et al. 1968)). Der derzeit beste Stamm enthält bereits sieben Deletionen im Genom.

4 Stoppcodon-Suppressionsstudien

Zu Beginn der Förderperiode im Jahr 2010 konnte die Stoppcodonsuppressionsmethode bei weitem nicht die Anzahl der einbaubaren nichtkanonischen Aminosäuren pro Protein erreichen, die durch die SPI Methode erzielt werden kann. Selbst der ortsspezifische Einbau einer einzelnen nichtkanonischen Aminosäure per SCS führte je nach Position des Stoppcodon in der Sequenz zu teilweise sehr starken Einbußen in der Ausbeute. Der Grund wurde vor allem dem Problem der Konkurrenz zwischen Freisetzungsfaktor 1 (RF1) und dem orthogonalen Paar, das zur Stoppcodon-Suppression benutzt wurde, zugeschrieben. Mehrere Drehschrauben boten hier Verbesserungspotential:

1. Verbesserte Plasmidsysteme zur optimalen Koexpression der orthogonalen Paare
2. Verbesserte tRNA und aaRS Sequenzen
3. Stämme mit reduziertem/fehlendem RF1 Level evtl. zusätzlich mit entfernten Amber Stopp Codons im Genom.

Unsere Arbeiten konzentrierten sich hier auf die ersten beiden Punkte (siehe Abschnitt 4.1). In Bezug auf Punkt 3 wurden im Projektzeitraum von anderen Gruppen teilweise erhebliche Fortschritte erzielt. Die Gruppen von Yokoyama und Wang erreichten auf verschiedenen Wegen eine Deletion des RF1, was ihrer Aussage nach zu einer stark verbesserten Effizienz von Multieinbauten per SCS führte (Mukai et al. 2010, Johnson et al. 2011, Johnson et al. 2012). Die Stämme waren jedoch stark wachstumseingeschränkt und es dieses war abhängig vom benutzten orthogonalen Paar (Heinemann et al. 2012, Ohtake et al. 2012). Daher schien die ultimative Lösung, die TAG Codons + RF1 komplett aus dem Genom zu entfernen, um die Querreaktion von eingeführten, TAG lesenden, orthogonalen Paar und

dem Wirtsgenom komplett zu verhindern. Dies erreichte die Gruppe von George Church im vergangenen Jahr (Lajoie et al. 2013). Allerdings wurde die wirkliche Anwendbarkeit dieses Stammes für den effizienten Einbau von nichtkanonischen Aminosäuren an TAG Stellen bisher nicht überzeugend gezeigt. Außerdem enthält der Stamm durch seine Herstellungsmethode (MAGE) eine Vielzahl von ungewollten Mutationen und Einschränkungen (Antibiotika- Resistenzkassetten im Genom etc.), die die praktische Anwendung erschweren. Im Laufe des Projekts erhielten wir die Stämme JX33 (RF1 aus dem Genom entfernt) und C321.ΔA.exp (RF1 und alle TAG Codons aus dem Genom entfernt), um sie mit unseren Systemen zu testen (siehe Abschnitt 4.2). Alle Arbeiten an der SCS Methode waren unmittelbar mit einem praktischen Beispiel verknüpft: der Oberflächenmodifizierung von TTL. Analog dem beschriebenen Beispiel in Abschnitt 2.1.3.2 (Click-Chemie an SPI eingeführten Aha Resten in Kombination mit klassischer Konjugationschemie) sollten mittels SCS verschiedene Oberflächenaminosäurereste ortsspezifisch als Einzelreste und in Kombination gelabelt werden. Die Einzeleinbauten können in der Folge zur spezifischen Kopplung der Proteine an Oberflächen benutzt werden, der Mehrfacheinbau z.B. zur artifiziellen Glykosylierung/PEGylierung für Stabilitätsstudien. Es ist bekannt, dass derartige Modifikationen an der Oberfläche oft zu Proteinstabilisierung beitragen (Tang et al. 2001, Srimathi and Jayaraman 2005, Cummings et al. 2013).

4.1 Neue Plasmidsysteme und orthogonale Paare

Zur Durchführung der SCS Experimente sind orthogonale aaRS:tRNA Paare nötig. Entsprechende Plasmide für die Koexpression der beiden Komponenten sind zwar in der Literatur mannigfaltig beschrieben (z.B. von den Gruppen von Peter Schultz, Jason Chin, Lei Wang und weiteren). Allerdings fehlt all diesen Plasmiddesigns der ganzheitliche, modulare Ansatz, um leicht verschiedene Plasmide miteinander kombinieren zu können (verschiedene Origins of replication und Antibiotika-Resistenzen), die Expressionsstärken von aaRS und tRNA zu modulieren (versch. Promoter und RBS Sequenzen) und Zwei-Plasmidsysteme leicht in Ein-Plasmidsysteme überführen zu können, wenn nötig.

Daher haben wir im Zuge dieses Projekts ein modulares Plasmidsystem auf Basis der pSEVA Plasmidreihe entwickelt (Silva-Rocha et al. 2013, Durante-Rodriguez et al. 2014). Diese erlaubt es uns, nicht nur die verschiedensten Origins of replication und Antibiotika-Resistenzen zu nutzen (diese sind auch geeignet für die Erweiterung der Einbausysteme auf andere Spezies), sondern auch von uns neu entwickelte und charakterisierte Teile mit der wissenschaftlichen Gemeinschaft zu teilen. Alle Teile können durch die vorgegebenen

Restriktionsschnittstellen in einem einzigen Schritt ausgetauscht werden. Im Laufe der Arbeiten haben wir die in Tabelle 7 aufgelisteten Module sequenzminimiert, von nicht kompatiblen Restriktionsschnittstellen bereinigt, deren Funktionalität getestet und der SEVA Bibliothek hinzugefügt. Die einzelnen Module sind als Plasmide beim Entwicklerteam am Centro Nacional de Biotecnología in Madrid hinterlegt und der wissenschaftlichen Gemeinde frei zugänglich. Eine Veröffentlichung dieses „pSEVA *E. coli* Toolkits“ ist geplant.

Tabelle 7. Module für die SEVA Bibliothek.

Origins of Replication	Promoter
pUC	<i>tac/lacO + lacI</i>
pBR322 mit ROP	T5/ <i>lacO+ lacI</i>
p15A	T7/ <i>lacO+ lacI</i>
pSC101	pBAD + <i>araC</i>

Eine große Zahl von aaRS:tRNA Paaren, unter anderem auf Basis des *Methanocaldococcus jannaschii* TyrRS und des *Methanosarcina mazei* PylRS Systems, wurde mittlerweile ebenfalls in dieses System überführt. Zur Evaluierung der Einbaueffizienz und für weiterführende Einbaustudien wurden das *Mj*TyrRS System und die *Mm*PylRS verwendet.

4.2 Test von RF1 freien / TAG freien Stämmen auf Effizienzverbesserung der Stopcodonsuppression

Der Stamm JX33 (RF1 Knockout Stamm) wurde mit dem *Mj*TyrRS System und dem *Mm*PyIRS im Vergleich zu einem konventionellen Expressionsstamm BL21(DE3) getestet. Dabei zeigte sich, dass die in der Literatur beschriebene Suppressionsverbesserung durch den RF1 Knockout selbst bei nur einem Stop-Codon in der Sequenz nur für das PyIRS System reproduziert werden kann (siehe

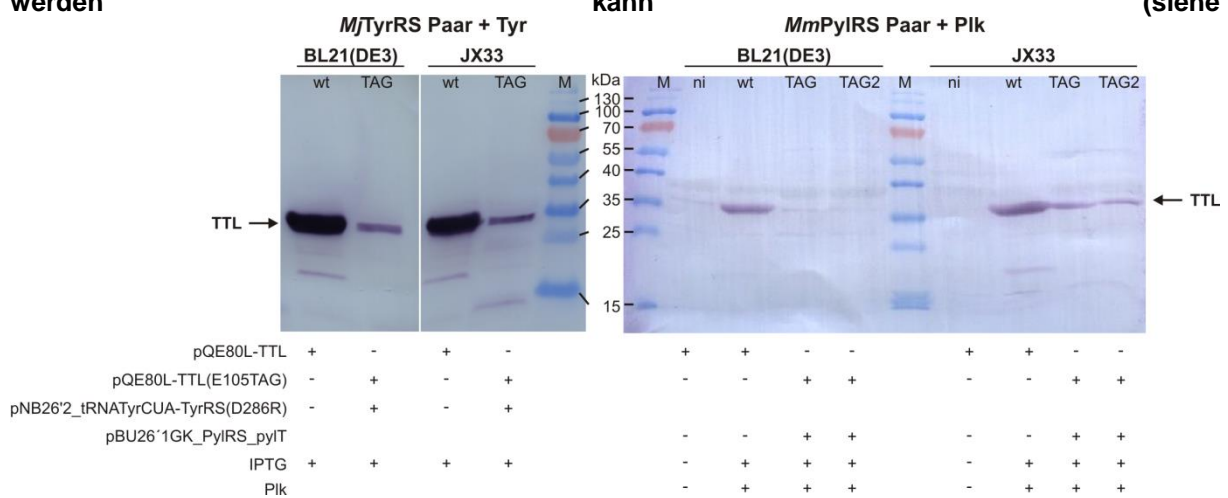


Abbildung 7. Western Blots der Suppressionstests des *Mj*TyrRS Systems mit Tyr (A) und des *Mm*PyIRS Systems mit Pik (B) jeweils im Vergleich in BL21(DE3) und dem RF1 Ko Stamm JX33.

).

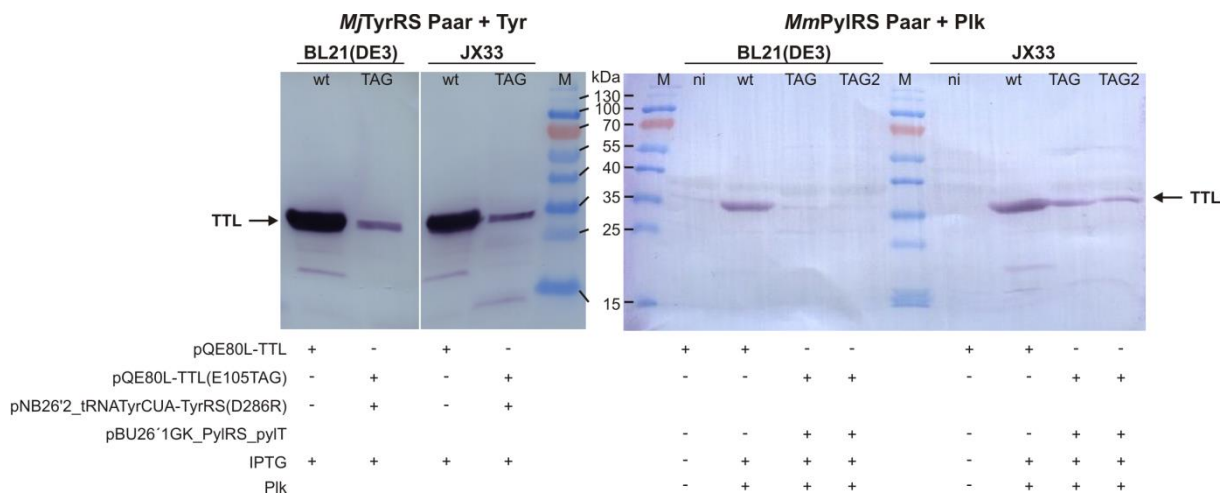


Abbildung 7. Western Blots der Suppressionstests des *Mj*TyrRS Systems mit Tyr (A) und des *Mm*PyIRS Systems mit Pik (B) jeweils im Vergleich in BL21(DE3) und dem RF1 Ko Stamm JX33.

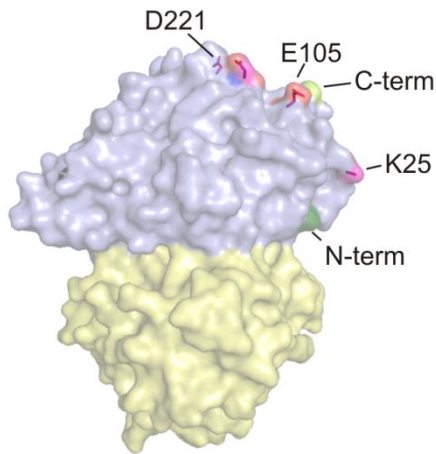
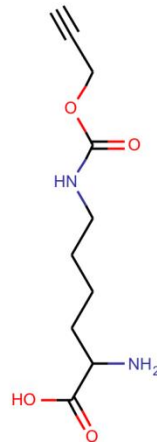
Weitere Studien in unserem Labor haben gezeigt, dass eine erhöhte Anzahl von Stopcodons mit diesem Stamm auch nur sehr ineffizient überlesen wird. Im Gegensatz dazu funktioniert der Stamm C321.ΔA.exp in Kombination mit dem PyIRS System wesentlich effizienter als in

einem konventionellen Suppressionsstamm auch bei mehreren Stopcodons in einer Sequenz (Heuchel et al., In Vorbereitung; vorläufiger Titel: „*Critical evaluation of orthogonal translation at different genomic backgrounds*“). Mit dem *MjTyrRS* System ist jedoch auch hier die Effizienz wesentlich geringer. Es bleibt jedoch festzustellen, dass auch mit diesen verbesserten Stämmen die Proteinausbeute deutlich hinter den Wildtyp Proteinen ohne Stopcodons zurückliegt. Dies liegt zum großen Teil ein der geringen katalytischen Effizienz der orthogonalen Paare an sich. Daher haben wir im Projektzeitraum eine Vielzahl von rationalen Mutagenesebibliotheken der einzelnen aaRS:tRNA paare erstellt, um die Effizienz (Aminosäure Erkennung und Beladung, aaRS – tRNA Erkennung, aaRS – TAG Codon Erkennung, etc.) weiter zu verbessern. Diese Experimente sind jedoch aufgrund der Vielzahl der Faktoren im Translationsapparat sehr komplex und haben bisher noch keine publizierbaren Ergebnisse erbracht.

Im Allgemeinen haben die Entwicklungen der letzten drei Jahre aber einen großen Beitrag zur Effizienzsteigerung der SCS Methode in *E. coli* gebracht. Der Stamm C321.ΔA.exp ermöglicht es, signifikante Mengen an 5 – 6 fach modifizierten Proteinen mit der Stopcodonsuppressionsmethode zu produzieren (Heuchel et al., In Vorbereitung vorläufiger Titel: „*Critical evaluation of orthogonal translation at different genomic backgrounds*“). Die Anwendung der neuen Stämme auf die Oberflächenmodifizierung mit mehreren Resten in einem Protein konnte im Projektzeitraum nicht abgeschlossen werden. Aufgrund der sehr positiven Entwicklung in diesem Bereich werden die Arbeiten aber über den Projektzeitraum hinaus weitergeführt.

4.3 Ortsspezifisches Labeling von TTL zur Oberflächenkonjugation

Es wurden aber bereits einige Einzeleinbauten an Oberflächenpositionen der TTL durchgeführt (siehe Abbildung 8). Die Proteinausbeute war hier für die verschiedenen Oberflächenpositionen sehr unterschiedlich, ein Effekt, der bei beim SCS allgemein sehr stark auftritt (Hoesl and Budisa 2011).

A) TTL Struktur und Oberflächenpositionen**B) Struktur von ϵ -N-Propargyloxy-carbonyl-lysine (PIK)****C) Proteinausbeute**

Protein	Ausbeute / mg/L
TTL	21.6
TTL(K25PIk)	16.8
TTL(E105PIk)	6.2
TTL(D221PIk)	11.9

Abbildung 8. **A)** TTL Struktur mit markierten verwendeten Oberflächenpositionen, **B)** Struktur des eingebauten Pyl Analog ϵ -N-Propargyloxy-carbonyllysine (PIk) und **C)** Ausbeute der Proteinvarianten. Die Expression erfolgte im RF1 defizienten Stamm JX33, in dem die Proteinausbeute für Einzelbauten mit dem PylRS System deutlich erhöht war.

In der Folge wurde versucht, die TTL Varianten mittels Click-Chemie direkt an Azid haltige Agarose-Beads zu koppeln. Dies scheiterte jedoch vermutlich an einer nicht ausreichenden Linkerlänge der der Azidreste auf den Beads. Um dies zu umgehen wurde ein Azidderivat von Biotin für die Clickreaktion verwendet und die Biotin-TTL (analog der oben genannten am N-Terminus mit Biotin versehenen TTL) über Streptavidin an Agarose-Beads geheftet. Dies gelang für TTL(E105PIk) außerordentlich gut und ohne jegliche Aktivitätseinbußen (siehe Abbildung 9). Daher führen wir derzeit Aktivitätsstudien (vorläufige Ergebnisse sind auf Abbildungen 10 und 11 dargestellt).

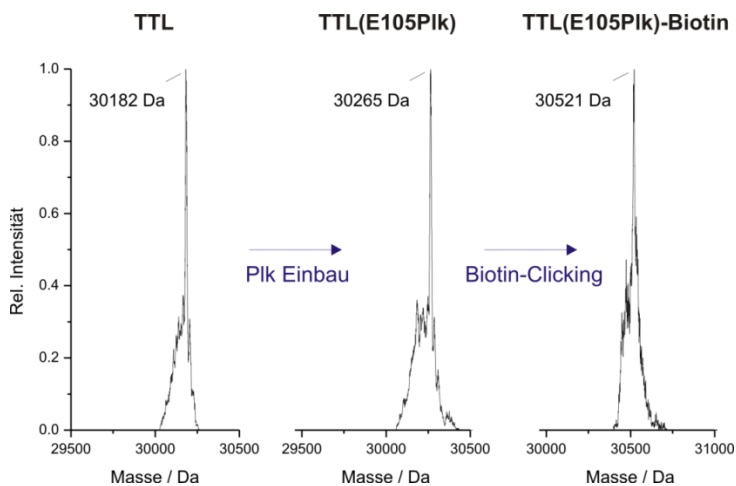


Abbildung 9. Massenspektren der TTL, TTL(E105PIk), TTL(E105PIk)-Biotin. Die theoretischen Massen sind TTL: 30185 Da, TTL(E105PIk): 30266 Da, und TTL(E105PIk) mit geklicktem Biotin: 30520 Da.

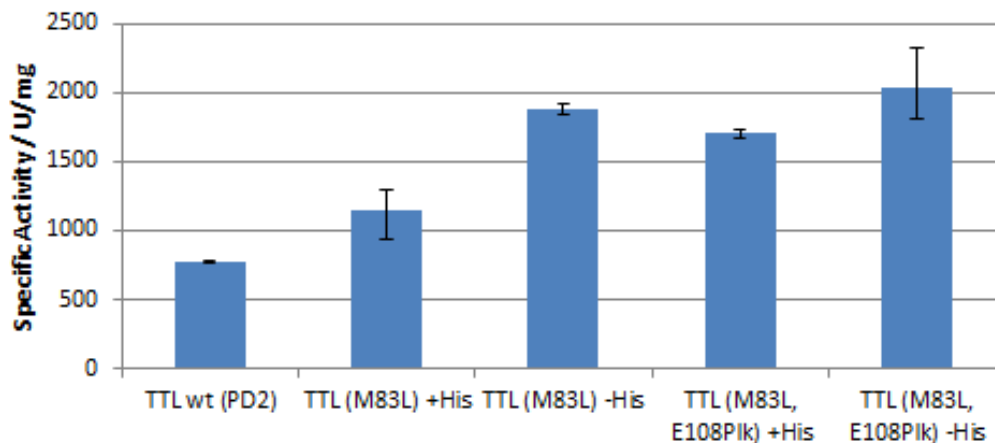


Abbildung 10. Enzymatische Aktivität verschiedener TTL Kongenere, gemessen bei 75°C für jeweils 10 Minuten. Beachtenswert ist, dass der Einbau von PIk auf der Position E 108 nicht die enzymatische Aktivität ändert. Alle Werte wurden in drei voneinander unabhängigen Messungen ermittelt.

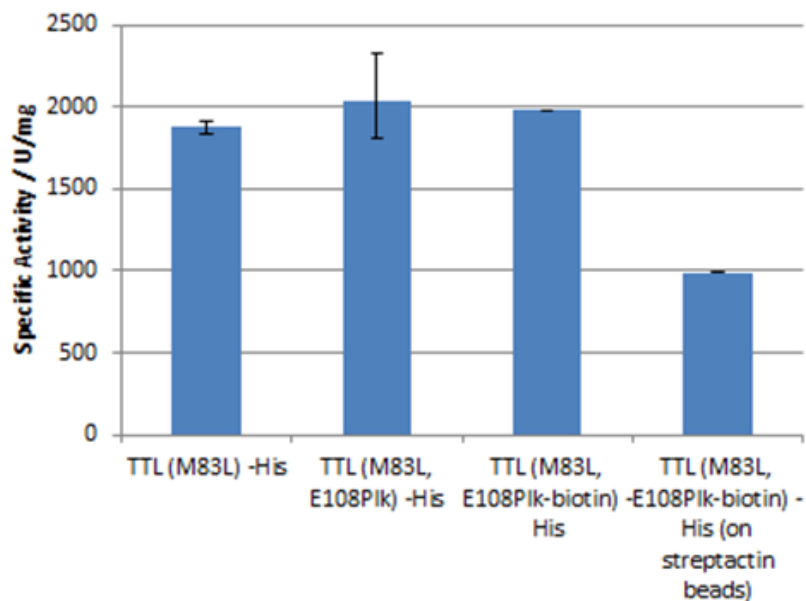


Abbildung 11. Enzymatische Aktivität von biotinylierter TTL (in Lösung) und immobilisierte TTL Kongenere (auf Streptactin Beads). Im Vergleich mit TTL (M83L) mit oder ohne PIk (ersten beiden Balken) hat das biotinylierte Enzym seine Aktivität beibehalten. Das pNPP Assay wurde bei 75°C für 10 Min. durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass diese Temperatur die Bindung zwischen Streptactin und Biotin destabilisieren könnte, daher musste die Aktivität des immobilisierten Enzyms nochmals bei niedrigerer Temperatur gemessen werden musste. Alle Werte wurden in drei voneinander unabhängigen Messungen ermittelt.

5 Publikationen, Poster, Vorträge, Patente

5.1.1 Poster

- Synthetic Biology in Europe, Feb. 2012, Barcelona, Spanien
Poster: Hoesl, MG, Krüger, A, Winkelmann, N, Elleuche, S, Wiltschi, B, Antranikian, G, Budisa, N. Enhancing industrially relevant enzymes with an expanded genetic code

5.1.2 Vorträge

- IBN 2013 International Symposium, Jun. 2013, Hamburg. Vortrag: Zukunftsdisziplinen der Synthetischen Biologie: Von verbesserten Enzymen und Flüssen zu neuen Formen der biologischen Informationsübertragung.
- Biokatalyse2021 Cluster-Workshop, Feb. 2012, Hamburg (Mitorganisatoren)
Vortrag: Potentials of noncanonical amino acids in biocatalysis
- 3. Biokatalyse2021 Cluster Jahrestreffen, Okt. 2010, Kiel
Vortrag: Kongenere Lipasen mit verbesserter katalytischer Aktivität und Substratzugang

5.1.3 Publikationen

- Acevedo-Rocha, CG*, Hoesl, MG*, Nehring, S*, Royter, M, Wolschner, C, Wiltschi, B, Budisa, N, Antranikian, G. Non-canonical amino acids as a useful synthetic biological tool for lipase-catalysed reactions in hostile environments. *Catal. Sci. Technol.* 2013, epub: DOI: 10.1039/C3CY20712A. * gleichberechtigte Erstautoren
- Hoesl, MG*, Acevedo-Rocha, CG*, Nehring, S*, Royter, M, Wolschner, C, Wiltschi, B, Budisa, N, Antranikian, G. Lipase congeners designed by genetic code engineering. *ChemCatChem* 2011, 3, 213-221. * gleichberechtigte Erstautoren
- Hoesl, MG, Budisa, N. Code Engineering: Techniken und Anwendungen, in *Synthetische Biologie – acatech Diskussion* (Ed.: Pühler, A, Müller-Röber, B, Weitze, MD), Springer Verlag, Heidelberg, 2011, 39-51.
- Molecular cloning and sequence analysis of a novel zinc-metalloprotease gene from the *Salinivibrio* sp. strain AF-2004 and its extracellular expression in *E. coli*. Karbalaeei-Heidari HR, Ziaee AA, Amoozegar MA, Cheburkin Y, Budisa N. *Gene*. 2008 Jan 31;408(1-2):196-203.

5.1.4 Publikationen in Druck und Vorbereitung

- Pournajati, R., Karbalaeei-Heidari H.R.*, Budisa, N. Secretion of Recombinant Archeal lipase Mediated by SVP2 Signal Peptide in *Escherichia coli* and its optimization by RSM. *Protein Expression and Purification*, 2014 in Press

- Heuchel, M., Hoesl, M., Budisa, N. Critical evaluation of orthogonal translation at different genomic backgrounds. 2014 Manuscript in preparation.
- Chatziefthimiou, S.D., Krüger, A., Hoesl, M., Antranikian, G., Budisa, N., Wilmanns, M., Structural basis for alternation in enzymatic activity of GTE congeners. 2014 Manuscript in preparation.

5.1.5 Patente

- Budisa, N., Royter, M., Grote, R., Wiltschi, B., Antranikian, G. (2010). Lipase congeners with enhanced substrate access. (TuTech Innovation GmbH, TUHH; EP10177742.3).

Literatur

- Cummings, C., H. Murata, R. Koepsel and A. J. Russell (2013). "Tailoring enzyme activity and stability using polymer-based protein engineering." *Biomaterials* **34**(30): 7437-7443.
- Durante-Rodriguez, G., V. de Lorenzo and E. Martinez-Garcia (2014). "The Standard European Vector Architecture (SEVA) Plasmid Toolkit." *Methods Mol Biol* **1149**: 469-478.
- Heinemann, I. U., A. J. Rovner, H. R. Aerni, S. Rogulina, L. Cheng, W. Olds, J. T. Fischer, D. Soll, F. J. Isaacs and J. Rinehart (2012). "Enhanced phosphoserine insertion during Escherichia coli protein synthesis via partial UAG codon reassignment and release factor 1 deletion." *FEBS Lett* **586**(20): 3716-3722.
- Hoesl, M. G. and N. Budisa (2011). "Expanding and engineering the genetic code in a single expression experiment." *Chembiochem* **12**(4): 552-555.
- Itikawa, H., S. Baumberg and H. J. Vogel (1968). "Enzymic basis for a genetic suppression: accumulation and deacylation of N-acetylglutamic gamma-semialdehyde in enterobacterial mutants." *Biochim Biophys Acta* **159**(3): 547-550.
- Johnson, D. B., C. Wang, J. Xu, M. D. Schultz, R. J. Schmitz, J. R. Ecker and L. Wang (2012). "Release factor one is nonessential in Escherichia coli." *ACS Chem Biol* **7**(8): 1337-1344.
- Johnson, D. B., J. Xu, Z. Shen, J. K. Takimoto, M. D. Schultz, R. J. Schmitz, Z. Xiang, J. R. Ecker, S. P. Briggs and L. Wang (2011). "RF1 knockout allows ribosomal incorporation of unnatural amino acids at multiple sites." *Nat Chem Biol* **7**(11): 779-786.
- Lajoie, M. J., A. J. Rovner, D. B. Goodman, H. R. Aerni, A. D. Haimovich, G. Kuznetsov, J. A. Mercer, H. H. Wang, P. A. Carr, J. A. Mosberg, N. Rohland, P. G. Schultz, J. M. Jacobson, J. Rinehart, G. M. Church and F. J. Isaacs (2013). "Genomically recoded organisms expand biological functions." *Science* **342**(6156): 357-360.
- Mukai, T., A. Hayashi, F. Iraha, A. Sato, K. Ohtake, S. Yokoyama and K. Sakamoto (2010). "Codon reassignment in the Escherichia coli genetic code." *Nucleic Acids Res* **38**(22): 8188-8195.
- Ohtake, K., A. Sato, T. Mukai, N. Hino, S. Yokoyama and K. Sakamoto (2012). "Efficient decoding of the UAG triplet as a full-fledged sense codon enhances the growth of a prfA-deficient strain of Escherichia coli." *J Bacteriol* **194**(10): 2606-2613.
- Silva-Rocha, R., E. Martinez-Garcia, B. Calles, M. Chavarria, A. Arce-Rodriguez, A. de Las Heras, A. D. Paez-Espino, G. Durante-Rodriguez, J. Kim, P. I. Nikel, R. Platero and V. de Lorenzo (2013). "The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes." *Nucleic Acids Res* **41**(Database issue): D666-675.
- Srimathi, S. and G. Jayaraman (2005). "Effect of glycosylation on the catalytic and conformational stability of homologous alpha-amylases." *Protein J* **24**(2): 79-88.
- Tang, S. J., J. F. Shaw, K. H. Sun, G. H. Sun, T. Y. Chang, C. K. Lin, Y. C. Lo and G. C. Lee (2001). "Recombinant expression and characterization of the Candida rugosa lip4 lipase in Pichia pastoris: comparison of glycosylation, activity, and stability." *Arch Biochem Biophys* **387**(1): 93-98.



Berichtsblatt

Zuwendungsempfänger:

**Technische Universität Berlin, Institut für Chemie/Organische Chemie, AK Biokatalyse,
Prof. Dr. Nediljko Budisa**

Förderkennzeichen:

0315876A, PT-J

Vorhabenbezeichnung:

**BIOKATALYSE2021: P29: Kongenere Lipasen mit verbesserter katalytischer Aktivität
und Substratzugang**

Laufzeit des Vorhabens:

3 Jahre

Berichtszeitraum:

01.10.2010 – 30.11.2013

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Veröffentlichung
3. Titel Lipase Congeners Designed by Genetic Code Engineering	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Michael G. Hoesl, Carlos G. Acevedo-Rocha ¹ , Sebastian Nehring, Dr. Marina Royter, Dr. Christina Wolschner, Dr. Birgit Wiltschi, Prof. Dr. Nediljko Budisa, Prof. Dr. Garabed Antranikian	5. Abschlussdatum des Vorhabens Dezember 2010
	6. Veröffentlichungsdatum Februar 2011
	7. Form der Publikation Fachzeitschrift
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Department of Biocatalysis, Berlin Institute of Technology, Müller-Breslau-Straße 10/Sekr. L1, 10623 Berlin (Germany) Institute of Technical Microbiology, Hamburg University of Technology, Kasernenstrasse 12, 21073 Hamburg (Germany)	9. Ber. Nr. Durchführende Institution TUB/TUHH
	10. Förderkennzeichen 0315876A, PT-J
	11. Seitenzahl 9 (+ 14 Seiten Supplement)
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 53
	14. Tabellen 1
	15. Abbildungen 4 (+ 7 im Supplement)
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung Classical enzyme optimization exploits the chemistry confined to the 20 canonical amino acids encoded by the standard genetic code. 'Genetic code engineering' allows the global substitution of particular residues with synthetic analogues, endowing proteins with chemical diversity not found in nature. These proteins are congeners of the parent protein because they originate from the same gene sequence, but contain a fraction of noncanonical amino acids. Global substitutions of methionine, proline, phenylalanine, and tyrosine have been carried out with related analogues in <i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> lipase. This study represents the first extensive report of an important biocatalyst substituted with a high number of noncanonical amino acids. The generated lipase congeners displayed special features such as enhanced activation, elevated enzyme activity (by up to 25%) and substrate tolerance (by up to 40%), and changes in optimal temperature (by up to 208C) and pH (by up to 3). These emergent features achieved by genetic code engineering might be important not only for academic research, but also for numerous economical applications in the food, detergent, chemical, pharmaceutical, leather, textile, cosmetic, and paper industries.	
19. Schlagwörter Aminosäuren, Biotechnologie, Enzymkatalyse, Engineering des genetischen Codes, Lipasen	
20. Verlag Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim	21. Preis

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Veröffentlichung	
3. Titel Non-canonical amino acids as a useful synthetic biological tool for lipase-catalysed reactions in hostile environments		
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Carlos G. Acevedo-Rocha, Michael G. Hoesl, Sebastian Nehring, Marina Royter, Christina Wolschner, Birgit Wiltschi, Garabed Antranikian, Nediljko Budisa	5. Abschlussdatum des Vorhabens Oktober 2012	
	6. Veröffentlichungsdatum Februar 2013	
	7. Form der Publikation Fachzeitschrift	
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Department of Biocatalysis, Berlin Institute of Technology, Müller-Breslau-Straße 10/Sekr. L1, 10623 Berlin (Germany) Institute of Technical Microbiology, Hamburg University of Technology, Kasernenstrasse 12, 21073 Hamburg (Germany)	9. Ber. Nr. Durchführende Institution TUB/TUHH	
	10. Förderkennzeichen 0315876A, PT-J	
	11. Seitenzahl 4 (+ 11 Seiten Supplement)	
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 18 (+ 16 im Supplement)	
	14. Tabellen 4 im Supplement	
	15. Abbildungen 2 (+ 7 im Supplement)	
16. Zusätzliche Angaben		
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)		
18. Kurzfassung The incorporation of several non-canonical amino acids into the Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus lipase confers not only activity enhancement upon treatment with organic solvents (by up to 450%) and surfactants (resp. 1630%), but also protective effects against protein reducing (resp. 140%), alkylating (resp. 160%), and denaturing (resp. 190%) agents as well as inhibitors (resp. 40%). This approach offers novel chemically diversified biocatalysts for hostile environments.		
19. Schlagwörter Aminosäuren, Biotechnologie, Enzymkatalyse, Engineering des genetischen Codes, Lipasen, Lösungsmittelinfluss		
20. Verlag The Royal Society of Chemistry Publishing	21. Preis Open Access	

1. ISBN oder ISSN 978-3-642-22353-2	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Veröffentlichung	
3. Titel Code Engineering: Techniken und Anwendungen		
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Michael G. Hoesl, Nediljko Budisa	5. Abschlussdatum des Vorhabens Mai 2011	
	6. Veröffentlichungsdatum 2011	
	7. Form der Publikation Buch	
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Department of Biocatalysis, Berlin Institute of Technology, Müller-Breslau-Straße 10/Sekr. L1, 10623 Berlin (Germany)	9. Ber. Nr. Durchführende Institution TUB/TUHH	
	10. Förderkennzeichen 0315876A, PT-J	
	11. Seitenzahl 13	
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 8	
	14. Tabellen -	
	15. Abbildungen 4	
16. Zusätzliche Angaben		
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)		
18. Kurzfassung Anhand ausgewählter Daten diskutieren wir die derzeit vorhandenen Techniken zum Einbau nichtkanonischer Aminosäuren in Proteine und skizzieren deren Einsatzmöglichkeiten in den Bereichen Strukturanalyse, Arzneimittel, Diagnostik, Biomaterialien und der industriellen Biotechnologie.		
19. Schlagwörter Nichtkanonische Aminosäuren, Engineering und Erweiterung des genetischen Codes, Lipasen, Enzymverbesserung		
20. Verlag Springer Verlag	21. Preis 29,95 €	

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Veröffentlichung	
3. Titel Orthogonal Dual-Modification of Proteins by Oxime Ligation and Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition		
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Michaela Mühlberg, Michael G. Hoesl, Christian Kuehne, Jens Dervedde, Nediljko Budisa, Christian P. R. Hackenberger	5. Abschlussdatum des Vorhabens Oktober 2013	
	6. Veröffentlichungsdatum geplant	
	7. Form der Publikation Fachzeitschrift	
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Robert-Roessle-Str. 10, 13125 Berlin, Germany Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie, Takustr. 3, 14195 Berlin, Germany Technische Universität Berlin, AK Biokatalyse, Institut für Chemie, Müller-Breslau-Str. 10, 10623 Berlin, Germany Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany Humboldt Universität zu Berlin, Institut für Organische und Bioorganische Chemie, Institut für Chemie, Brook-Taylor-Str. 2, 12489 Berlin, Germany	9. Ber. Nr. Durchführende Institution TUB/TUHH	
	10. Förderkennzeichen 0315876A, PT-J	
	11. Seitenzahl 4 (+ 16 Seiten Supplement)	
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 20 (+ 10 im Supplement)	
	14. Tabellen 4 im Supplement	
	15. Abbildungen 3 (+ 15 im Supplement)	
16. Zusätzliche Angaben		
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) 10th German Peptide Symposium, Berlin, Mar 2011		
18. Kurzfassung We have developed a novel dual-labeling strategy for proteins that combines residue-specific incorporation of unnatural amino acids with chemical oxidative aldehyde formation at the N-terminus of a protein. Our approach allows the selective introduction of two different functional moieties at distinct sites in a protein by mutually orthogonal copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and oxime ligation. The general applicability of our method was demonstrated on a thermophilic lipase, which was first biotin-labeled and conjugated with β -linked galactose residues, and subsequently submitted to SPR binding studies to reveal specific binding to Erythrina Cristagalli Lectin.		
19. Schlagwörter Nichtkanonische Aminosäuren, Konjugationschemie, Click Chemie, orthogonale Funktionalisierung, Lipasen, posttranslationale Modifizierung, Lectinbindung		
20. Verlag Veröffentlichung geplant	21. Preis Veröffentlichung geplant	