

Hydroxynitril-Lyasen für die Biotechnologie

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jan-Karl Guterl

Aus

Essen

Jülich, Oktober 2008

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Frau PD Dr. Martina Pohl

Korreferent: Herr Prof. Dr. Michael Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2005 bis Oktober 2008 am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Frau PD Dr. Martina Pohl angefertigt.

Die Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des Projektes „Biokatalytische Hydrocyanierung und Hydroformylierung (BioHydroForm)“ sowie von der DFG im Rahmen des Graduiertenkollegs „Biocatalysis using non-conventional media (BioNoCo)“ gefördert.

Es könnte alles so einfach sein – isses aber nicht!

(Die Fantastischen Vier, „Einfach sein“)

Wissenschaftliche Veröffentlichungen im Rahmen dieser Promotion

Artikel in Fachjournalen:

„A high-throughput screening assay for hydroxynitrile lyase activity”

Andexer, J.; Guterl, J.-K.; Pohl, M.; Eggert, T.

Chemical Communications 40: 4201 – 4203 (2006)

„Hydroxynitrile lyase catalyzed cyanohydrin synthesis at high pH-values”

von Langermann, J.; Guterl, J.-K.; Pohl, M.; Wajant, H.; Kragl, U.

Bioprocess and Biosystems Engineering 31 (3): 155 – 161 (2008)

„Uneven twins: comparison of the two enantiocomplementary hydroxynitrile lyases with α/β -hydrolase fold”

Guterl, J.-K.; Andexer, J.; Sehl, T.; von Langermann, J.; Frindi-Wosch, I.; Rosenkranz, T.; Fitter, J.; Gruber, K.; Kragl, U.; Eggert, T.; Pohl, M.

Zur Veröffentlichung eingereicht.

„The hydroxynitrile lyase from flax – a lyase that looks like an alcohol dehydrogenase”

Horeis, G.; Guterl, J.-K.; Pohl, M.; Pichler, S.; Wagner, U.; Gruber, K.; Kratky, C.

In Vorbereitung.

Tagungsbeiträge:

„Directed evolution of a plant hydroxynitrile lyase for industrial applications”

Andexer, J.; Guterl, J.-K.; Pohl, M.; Eggert, T.

Posterbeitrag, Industrial Biocatalysis in Pharmacy and Fine Chemistry (Nimes/ Frankreich, 2005).

„High-throughput screening assay for hydroxynitrile lyases”

Andexer, J.; Guterl, J.-K.; Pohl, M.; Eggert, T.

Posterbeitrag, VAAM-Tagung (Jena, 2006)

„Improving the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* by directed evolution for technical applications”

Guterl, J.-K.; Andexer, J.; Eggert, T.; Pohl, M.

Posterbeitrag, Biocat (Hamburg, 2006).

„First steps towards the optimization of the hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum*”

Guterl, J.-K.; Horeis, G.; Gruber, K.; Kratky, C.; Andexer, J.; Eggert, T.; Pohl, M.

Posterbeitrag, Biotrans (Oviedo/ Spanien, 2007).

Inhalt

Wissenschaftliche Veröffentlichungen im Rahmen dieser Promotion	V
Inhalt.....	VII
Abkürzungen.....	XI
Verzeichnis der Abbildungen & Tabellen.....	XIV
1. Einleitung	1
1.1 Die Anwendung von Enzymen in der Biotechnologie.....	1
1.2 Die Hydroxynitril-Lyasen	2
1.2.1 Durch Hydroxynitril-Lyasen katalysierte Reaktionen: Cyanogenese & Hydrocyanierung.....	2
1.2.1.1 Die Cyanogenese als Abwehrstrategie höherer Pflanzen.....	2
1.2.1.2 Metabolismus der cyanogenen Glycoside.....	3
1.2.2 HNLs sind durch konvergente Evolution entstanden.....	6
1.2.2.1 FAD-abhängige HNLs: Struktur, Substratspektrum und Verbreitung.....	8
1.2.2.2 FAD-unabhängige HNLs: ein kurzer Überblick.....	10
1.2.3 Die HNL aus <i>Manihot esculenta</i> : eine S-selektive α/β -Hydrolase.....	11
1.2.4 Die HNL aus <i>Arabidopsis thaliana</i> – Der ungleiche Zwilling der MeHNL.....	13
1.2.5 Die HNL aus <i>Linum usitatissimum</i> ähnelt Zn^{2+} -abhängigen Alkoholdehydrogenasen.....	14
1.2.6 Biotechnologische Nutzung der HNLs	16
1.2.7 Cyanhydrine sind vielseitige Bausteine in der organischen Synthese	17
1.2.8 Randbedingungen für die technische Herstellung enantiomerenreiner Cyanhydrine	18
1.3 Stabilität von Enzymen	20
1.3.1 Allgemeine Aspekte der Stabilität von Enzymen	20
1.3.2 Kinetische und Thermodynamische Stabilität.....	21
1.3.3 Allgemeine Aspekte der Inaktivierung von Enzymen	23
1.3.4 Einfluss der Temperatur auf die Enzymstabilität.....	24
1.3.5 Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymstabilität.....	25
1.3.6 Möglichkeiten zur Stabilisierung von Enzymen	27
1.3.6.1 Rationales Protein-Design.....	28
1.3.6.2 Gerichtete Evolution und semi-rationale Ansätze.....	29
1.3.6.3 Stabilisierung durch chemische Additive.....	33
1.3.6.4 Stabilisierung durch Immobilisierung.....	34
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	36
2. Material & Methoden.....	38
2.1 Material	38
2.1.1 Chemikalien & Enzyme	38
2.1.2 Geräte & Software.....	38
2.1.3 Verwendete Bakterienstämme.....	40
2.1.4 Verwendete Plasmide	41
2.1.5 Oligonukleotide.....	41
2.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	42
2.2.1 Nährmedien	42
2.2.2 Antibiotika.....	44
2.2.3 Plattenkulturen	44
2.2.4 Kultivierung in Flüssigmedien	44
2.2.5 Hochzelldichte-Kultivierung.....	45
2.2.6 Bestimmung der Zelldichte	45
2.2.7 Lagerung von Bakterienkulturen.....	45

2.3 Molekularbiologische Methoden.....	46
2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	46
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	46
2.3.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	46
2.3.4 Elution von DNA aus Agarosegelen.....	47
2.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	47
2.3.5.1 Standard-PCR (nach Saiki <i>et al.</i> , 1988).....	47
2.3.5.2 Ortsspezifische Mutagenese.....	47
2.3.5.3 Ungerichtete Mutagenese mittels epPCR.....	48
2.3.6 <i>In vitro</i> -Rekombination von DNA-Fragmenten.....	48
2.3.6.1 Restriktion von DNA.....	48
2.3.6.2 Ligation von DNA.....	49
2.3.6.3 Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA.....	49
2.3.7 Transformation von <i>E. coli</i>	49
2.3.7.1 Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	49
2.3.7.2 Elektroporation von <i>E. coli</i>	50
2.3.8 Sequenzierung von DNA.....	50
2.3.9 Synthese von DNA-Doppelsträngen.....	51
2.4 Proteinchemische Methoden.....	51
2.4.1 Zellaufschlussverfahren.....	51
2.4.1.1 Zellaufschluss durch Sonifikation.....	51
2.4.1.2 Chemo-enzymatischer Zellaufschluss.....	51
2.4.1.3 Fraktionierung von Zell-Lysaten.....	51
2.4.2 Chromatographische Verfahren.....	52
2.4.2.1 Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose.....	52
2.4.2.2 Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie an NiNTA-Agarose.....	52
2.4.2.3 Größenausschlusschromatographie an Sephadex G-25.....	53
2.4.2.4 Größenausschlusschromatographie an PD-10-Säulen.....	53
2.4.2.5 Größenausschlusschromatographie an Superdex G-200.....	53
2.4.2.6 Größenausschlusschromatographie mittels HPLC.....	54
2.4.3 Ultrafiltration.....	55
2.4.4 Lagerung von Proteinen.....	55
2.4.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
2.4.6 Färbung von SDS-Gelen.....	56
2.4.7 Quantitative Proteinbestimmung (nach Bradford).....	56
2.4.8 Präzipitation von Proteinen.....	57
2.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	57
2.5.1 Photometrischer Nachweis von Mandelonitrilspaltung.....	57
2.5.2 Photometrischer Nachweis von Cyanid-Ionen.....	58
2.5.3 Bestimmung des Effektes von Puffer, pH-Wert und Temperatur auf die Enzymaktivität.....	59
2.5.4 Durchführung von Stabilitätsmessungen.....	60
2.6 Spektroskopische Methoden.....	61
2.6.1 Circular Dichroismus (CD-Spektroskopie).....	61
2.6.2 Fluoreszenz-Spektroskopie.....	62
2.6.3 Statische Lichtstreuung.....	63
2.7 Screening von Mutantenbanken.....	63
3. Die HNL aus <i>Manihot esculenta</i>	65
3.1 Klonierung, Expression und Reinigung der MeHNL.....	65
3.1.1 Klonierung der MeHNL.....	65
3.1.2 Expression der MeHNL.....	65

3.1.3	Reinigung der <i>MeHNL</i>	66
3.2	Die <i>MeHNL</i> liegt als Homotetramer vor	68
3.3	Der Einfluss des Puffers auf die Aktivität der <i>MeHNL</i>	69
3.3.1	Die <i>MeHNL</i> wird durch Acetat inhibiert	69
3.3.2	Acetat wird im aktiven Zentrum der <i>MeHNL</i> gebunden	70
3.3.3	Auch die Variante C81A wird durch Acetat inhibiert.....	72
3.4	Der Einfluss des pH-Wertes auf Aktivität und Stabilität der <i>MeHNL</i>	74
3.4.1	Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der <i>MeHNL</i>	74
3.4.2	Die <i>MeHNL</i> ist im sauren pH-Bereich stabil	75
3.4.3	Die Sekundärstruktur der <i>MeHNL</i> bleibt bei niedrigem pH-Wert weitgehend erhalten.....	77
3.4.4	Mittels Fluoreszenzspektroskopie kann eine strukturelle Veränderung beobachtet werden	79
3.4.5	Ein niedriger pH-Wert bewirkt eine Aggregation der <i>MeHNL</i>	82
3.4.6	Der Effekt eines niedrigen pH-Wertes auf die Struktur der <i>MeHNL</i>	84
3.5	Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität der <i>MeHNL</i>	85
3.5.1	Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der <i>MeHNL</i>	86
3.5.2	Der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der <i>MeHNL</i>	87
3.5.3	Die <i>MeHNL</i> entfaltet bei erhöhter Temperatur	88
3.5.4	Bestimmung der Schmelztemperatur der <i>MeHNL</i>	90
3.6	Stabilisierung der <i>MeHNL</i> bei niedrigen pH-Werten	91
3.6.1	Stabilisierung durch niedermolekulare Zusätze	91
3.6.1	Stabilisierung durch gerichtete Evolution	92
3.6.1.1	Etablierung eines Hochdurchsatz-Screening-Systems	92
3.6.1.2	Die <i>MeHNL</i> ist unter Screeningbedingungen stabil	96
4.	Die HNL aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	100
4.1	Der Einfluss des Puffers auf die Aktivität der <i>AtHNL</i>	100
4.2	Der Einfluss des pH-Wertes auf Aktivität und Stabilität der <i>AtHNL</i>	100
4.2.1	Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der <i>AtHNL</i>	101
4.2.2	Der Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der <i>AtHNL</i>	101
4.2.3	Die <i>AtHNL</i> entfaltet bei niedrigem pH-Wert.....	103
4.2.4	Die strukturellen Änderungen der <i>AtHNL</i> sind im Fluoreszenz-spektrum nicht sichtbar	104
4.2.5	Die <i>AtHNL</i> aggregiert bei schwach saurem pH	106
4.2.6	Effekt eines niedrigen pH-Wertes auf die Struktur der <i>AtHNL</i>	107
4.3	Stabilisierung der <i>AtHNL</i> durch niedermolekulare Zusätze und Zell-Lysate.....	109
4.4	Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität der <i>AtHNL</i>	110
4.3.1	Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der <i>AtHNL</i>	110
4.3.2	Der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der <i>AtHNL</i>	111
4.3.3	Die thermische Inaktivierung der <i>AtHNL</i> geht mit einer Entfaltung einher	112
4.3.4	Bestimmung der Schmelztemperatur der <i>AtHNL</i>	114
5.	Die HNL aus <i>Linum usitatissimum</i>	115
5.1	Klonierung, Expression und Reinigung der <i>LuHNL</i>	115
5.2	Der Einfluss des Puffers auf die Aktivität der <i>LuHNL</i>	116
5.3	Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität und Stabilität der <i>LuHNL</i>	117
5.3.1	Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der <i>LuHNL</i>	117
5.3.2	Der Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der <i>LuHNL</i>	118
5.4	Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität der <i>LuHNL</i>	119
5.4.1	Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der <i>LuHNL</i>	119
5.4.2	Der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der <i>LuHNL</i>	120
5.5	Erweiterung des Substratspektrums	121

5.5.1 Erweiterung des Substratspektrums durch gerichtete Evolution.....	121
5.5.1.1 Validierung des Screening-Systems.....	122
5.5.1.2 Erzeugung von Variantenbanken und Screening.....	123
5.5.2 Erweiterung des Substratspektrums der <i>LuHNL</i> durch rationales Design.....	124
5.5.2.1 Validierung des katalytischen Mechanismus.....	124
5.5.2 Die Erweiterung des Substratspektrums der <i>LuHNL</i>	126
5.6 Die <i>LuHNL</i> : ein stabiles Enzym mit beschränktem Substratspektrum.....	129
6. Zusammenfassung.....	130
7. Summary.....	133
8. Literatur.....	136
9. Anhang.....	151
9.1 Sequenzen der verwendeten Enzyme.....	151
9.2 Verwendete Vektoren.....	152
Danksagung.....	155

Abkürzungen

Aminosäuren wurden nach dem gebräuchlichen Ein- oder Drei-Buchstabencode (entsprechend IUPAC-IUB-Vereinbarung von 1969) abgekürzt.

<i>A. dest</i>	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ADH	Alkohol Dehydrogenase
AEC	Anionenaustausch-Chromatographie
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
<i>AtHNL</i>	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
AU	Relative Einheiten
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Circular Dichroismus
Da	Dalton
DIPE	Diisopropylether
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DW-MTP	<i>Deepwell</i> -Mikrotiterplatte
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuß
epPCR	Fehlerhafte PCR
EZ	Zentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße
FAD	Flavinadenosin-Dinukleotid
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Gramm
GnHCl	Guanidinium-Hydrochlorid
h	Stunde(n)
<i>HbHNL</i>	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Hevea brasiliensis</i>
HNL	Hydroxynitril-Lyase
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie
HZD	Hoch-Zelldichte
IMAC	Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
K	Kalium
Kana	Kanamycin
KPi	Kalium-Phosphat (-Puffer)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
L	Liter
LB	Luria-Bertani (-Medium)
Lsg.	Lösung

<i>Lu</i> HNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Linum usitatissimum</i>
M	Molar
m	Meter
MCS	<i>multiple cloning site</i>
<i>Me</i> HNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Manihot esculenta</i>
Mg	Magnesium
min.	Minute(n), minütig
ml	Milliliter
M_r	Molekulargewicht
MTP	Mikrotiterplatte
NaDOC	Natriumdesoxychololat
NiNTA	Nickel-Nitrilotriacetat
O.D.	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
p. A.	<i>per analyse</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>Pa</i> HNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Prunus amygdalus</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
RBS	Ribosomenbindestelle
RMSD	<i>Root Mean Squared Deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>Sb</i> HNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Sorghum bicolor</i>
SCP	Serin-Carboxypeptidase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SEC	Größenausschlusschromatographie
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TB	Terrific Broth (-Medium)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N', Tetramethylethyldiamin
TMF	Transformationspuffer für <i>E. coli</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTN	Total Turnover Number
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
TZ	Tischzentrifuge
U	Enzymeinheit(en)
UDPG	Uridindiphosphatglukose
ÜK	Übernachtkultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen

X-Gal 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Verzeichnis der Abbildungen & Tabellen

Abbildungen:	Seite	
Abb. 1.1	Von HNLs katalysierte Reaktionen	2
Abb. 1.2	Anabolismus, Katabolismus und Entgiftungsmechanismen cyanogener Glycoside am Beispiel des Linamarins aus <i>Manihot esculenta</i>	5
Abb. 1.3	Schematische Abbildung einer Blatt-Mesophyllzelle aus <i>Manihot esculenta</i>	5
Abb. 1.4	Theorie zur Entstehung der HNLs durch konvergente Evolution	8
Abb. 1.5	Die HNL aus <i>Prunus amygdalus</i>	10
Abb. 1.6	Die Struktur der MeHNL	11
Abb. 1.7	Vorgeschlagene Katalysemechanismen für die MeHNL und die HbHNL	12
Abb. 1.8	Vorgeschlagener Katalysemechanismus der AtHNL	14
Abb. 1.9	Die Kristallstruktur der LuHNL	15
Abb. 1.10	Putativer Katalysemechanismus der LuHNL	16
Abb. 1.11	Wichtige Folgereaktionen der Synthese von chiralen Cyanohydrinen	18
Abb. 1.12	Schematische Darstellung freier Energien bei der Faltung thermodynamisch und kinetisch stabiler Proteine	22
Abb. 1.13	Erweitertes Lumry-Eyring-Modell zur Inaktivierung von Proteinen	23
Abb. 1.14	Prinzip der gerichteten Evolution	30
Abb. 2.1	Kalibrierung der Superdex-G200-Säule	54
Abb. 2.2	Kalibrierung der TOSOH-TSKgel-G2000SWXL-Säule	55
Abb. 3.1	SDS-PAGE-Analyse der MeHNL-Expression	67
Abb. 3.2	Reinigungsprofil und SDS-PAGE-Analyse der MeHNL-Reinigung durch AEC	68
Abb. 3.3	Aktivität der MeHNL in verschiedenen Puffern bei pH 5,0	71
Abb. 3.4	Überlagerung der Kristallstrukturen 1dwo und 1dwp / 1dwp und 1yb6	72
Abb. 3.5	Primärstrukturen der MeHNL, der HbHNL und der AtHNL	73
Abb. 3.6	Aktivität der MeHNL-C81A in Citrat-Phosphat- und Acetat-Puffer	74
Abb. 3.7	Stabilisierung der Substrate im aktiven Zentrum der AtHNL und der MeHNL/HbHNL	75
Abb. 3.8	Anfangsreaktionsaktivität der MeHNL in Abhängigkeit des pH-Wertes	76
Abb. 3.9	Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der MeHNL in Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 4,0 und pH 6,0	77
Abb. 3.10	Charakteristische CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturelemente	78
Abb. 3.11	CD-Spektren der MeHNL im nativen und denaturierten Zustand/ Kalibrationsgerade zur Bestimmung des α -helicalen Proteinanteils relativ zum nativen und denaturierten Zustand	79
Abb. 3.12	Einfluss von pH 6,0 auf die Sekundärstruktur der MeHNL	80
Abb. 3.13	Einfluss von pH 4,0 auf die Sekundärstruktur der MeHNL	80
Abb. 3.14	Lage der Tryptophanreste in der MeHNL	81
Abb. 3.15	Fluoreszenzspektren der MeHNL im nativen und denaturierten	82

	Zustand / Kalibrationsgerade zur Bestimmung des nativen Proteinteils	
Abb. 3.16	Einfluss von pH 6,0 auf die Struktur der <i>MeHNL</i>	83
Abb. 3.17	Einfluss von pH 4,0 auf die Struktur der <i>MeHNL</i>	83
Abb. 3.18	Entwicklung der Streulichtintensität bei 500 nm in Abhängigkeit des pH-Wertes	84
Abb. 3.19	Der Einfluss von pH 4,0 auf die strukturelle Integrität und das Aggregationsverhalten der <i>MeHNL</i>	85
Abb. 3.20	Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der <i>MeHNL</i> in Abhängigkeit von der Temperatur	87
Abb. 3.21	Arrhenius-Plot zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der <i>MeHNL</i>	88
Abb. 3.22	Zeitliche Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der <i>MeHNL</i> in Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0, bei 50°C und 22°C	89
Abb. 3.23	Ausgewählte CD-Spektren der <i>MeHNL</i> bei 50°C und pH 6,0 über einen Zeitraum von 220 min. / Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei 50°C	90
Abb. 3.24	Der Einfluss der Temperatur auf die strukturelle Integrität und den löslichen Proteinanteil der <i>MeHNL</i>	90
Abb. 3.25	CD-spektroskopische Bestimmung der Schmelztemperatur der <i>MeHNL</i>	91
Abb. 3.26	SDS-PAGE der DW-MTP-Expression der <i>MeHNL</i>	94
Abb. 3.27	Effekt der Zell-Lyse auf die Aktivität der <i>MeHNL</i> unter Screening-Bedingungen	95
Abb. 3.28	Festlegung der Minimalaktivität für Treffer beim Hochdurchsatz-Screening	97
Abb. 3.29	Zeitliche Entwicklung der Aktivität und des löslichen Proteingehaltes von <i>MeHNL</i> -enthaltenden Zell-Lysaten bei pH 4,0 und pH 5,4	98
Abb. 3.30	Kopplung von Aktivität und Proteingehalt bei der Inkubation der <i>MeHNL</i> -enthaltenden Zell-Lysate bei pH 4,0	100
Abb. 4.1	Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der <i>AtHNL</i> in verschiedenen Puffern bei pH 5,0	101
Abb. 4.2	Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der <i>AtHNL</i> in Abhängigkeit des pH-Wertes	102
Abb. 4.3	Zeitliche Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der <i>AtHNL</i> in Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 5,4 und pH 6,0	103
Abb. 4.4	CD-Spektren der <i>AtHNL</i> im nativen und denaturierten Zustand / Kalibrationsgerade zur Bestimmung des α -helikalen Proteinanteils relativ zum nativen und denaturierten Zustand	104
Abb. 4.5	Einfluss von pH 6,4 auf die Sekundärstruktur der <i>AtHNL</i>	105
Abb. 4.6	Einfluss von pH 5,4 auf die Sekundärstruktur der <i>AtHNL</i>	105
Abb. 4.7	Fluoreszenzspektren der <i>AtHNL</i> im nativen und denaturierten Zustand	106
Abb. 4.8	Einfluss von pH 6,4 auf die Struktur der <i>AtHNL</i>	107
Abb. 4.9	Einfluss von pH 5,4 auf die Struktur der <i>AtHNL</i>	107
Abb. 4.10	Zeitliche Entwicklung der Streulichtintensität der <i>AtHNL</i> bei 500 nm in Abhängigkeit des pH-Wertes	108
Abb. 4.11	Der Einfluss von pH 5,4 auf die strukturelle Integrität und das Aggregationsverhalten der <i>AtHNL</i>	109
Abb. 4.12	Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der <i>AtHNL</i> in Abhängigkeit	111

	von der Temperatur	
Abb. 4.13	Arrhenius-Plot zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der <i>AtHNL</i>	112
Abb. 4.14	Zeitliche Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der <i>AtHNL</i> in Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,0) bei 4°C und 37°C	113
Abb. 4.15	Ausgewählte CD-Spektren der <i>AtHNL</i> bei 37°C und pH 6,0 über einen Zeitraum von 480 min / Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei 37°C	114
Abb. 4.16	Der Einfluss der Temperatur auf die strukturelle Integrität und den löslichen Proteinanteil der <i>AtHNL</i>	114
Abb. 4.17	CD-spektroskopische Bestimmung der Schmelztemperatur der <i>AtHNL</i>	115
Abb. 5.1	Chromatogramm und SDS-PAGE-Analyse der <i>LuHNL</i> -Reinigung mittels IMAC	117
Abb. 5.2	Aktivität der <i>LuHNL</i> in verschiedenen Puffern	118
Abb. 5.3	Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der <i>LuHNL</i> in Abhängigkeit des pH-Wertes	119
Abb. 5.4	Zeitliche Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der <i>LuHNL</i> in Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 4,0 und pH 6,0	120
Abb. 5.5	Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der <i>LuHNL</i> in Abhängigkeit von der Temperatur	121
Abb. 5.6	Arrhenius-Plot zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der <i>LuHNL</i>	121
Abb. 5.7	Zeitliche Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der <i>LuHNL</i> in Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5, bei 37°C und 10°C	122
Abb. 5.8	SDS-PAGE-Analyse der DW-MTP-Expression der <i>LuHNL</i>	123
Abb. 5.9	Das aktive Zentrum der <i>LuHNL</i>	126
Abb. 5.10	Aktives Zentrums der <i>LuHNL</i> mit Aminosäuren Leu-339, Phe-340 und Val-348	128
Abb. 5.11	MAP-Analyse möglicher Austausch von Aminosäuren der Wt- <i>LuHNL</i> -Sequenz durch epPCR	129
Abb. 9.1	Nukleotidsequenz und Aminosäuresequenz der <i>MeHNL</i>	152
Abb. 9.2	Nukleotidsequenz und Aminosäuresequenz der <i>LuHNL</i>	152
Abb. 9.3	Nukleotidsequenz und Aminosäuresequenz der <i>LuHNL</i> -Active-Site-Variante	153
Abb. 9.4	Vektorkarte des rekombinanten Plasmids p <i>MeHNL</i>	153
Abb. 9.5	Vektorkarte des rekombinanten Plasmids pROx	154
Abb. 9.6	Vektorkarte des rekombinanten Plasmids p <i>LuHNL</i>	154
Abb. 9.7	Vektorkarte des rekombinanten Plasmids pET28a-ep <i>luhnl</i>	155
Tabellen		Seite
Tab. 1.1	Übersicht über einige ausgewählte HNLs	7
Tab. 2.1	Übersicht über die verwendeten Geräte und Programme	38
Tab. 2.2	Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme	40
Tab. 2.3	Übersicht über die verwendeten Plasmide.	41
Tab. 2.4	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	41
Tab. 2.5	Übersicht über die verwendeten Antibiotika	44
Tab. 3.1	Reinigung der <i>MeHNL</i> durch SEC und AEC	69
Tab. 3.2	Bestimmung des oligomeren Zustandes der <i>MeHNL</i>	69
Tab. 3.3	Reinigung der <i>MeHNL</i> -C81A durch SEC und AEC	73

Tab. 3.4	Halbwertszeiten der <i>MeHNL</i> in verschiedenen Puffern bei verschiedenen pH-Werten	77
Tab. 3.5	Halbwertszeiten der <i>MeHNL</i> bei verschiedenen Temperaturen in 20 mM KPi, pH 6,0	89
Tab. 3.6	Halbwertszeiten der <i>MeHNL</i> bei pH 4,0 mit verschiedenen Zusätzen	93
Tab. 3.7	Analyse der Mandelonitril-Spaltung in Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0, in Zell-Lysaten ohne HNL und in Zell-Lysaten mit exprimierter <i>MeHNL</i>	96
Tab 4.1	Halbwertszeiten der <i>AtHNL</i> in verschiedenen Puffern bei verschiedenen pH-Werten	103
Tab. 4.2	Halbwertszeiten der <i>AtHNL</i> bei pH 5,4 mit verschiedenen Zusätzen	111
Tab. 4.3	Halbwertszeiten der <i>AtHNL</i> bei verschiedenen Temperaturen in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0	112
Tab. 5.1	Reinigung der <i>LuHNL</i> durch IMAC	117
Tab. 5.2	Halbwertszeiten der <i>LuHNL</i> in Citrat-Phosphat-Puffer bei verschiedenen pH-Werten	120
Tab. 5.3	Halbwertszeiten der <i>LuHNL</i> bei verschiedenen Temperaturen in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5	121
Tab. 5.4	Analyse der Acetoncyanhydrin- und Mandelonitril-Spaltung in Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0), in Zell-Lysaten ohne HNL und in Zell-Lysaten mit exprimierter <i>LuHNL</i>	124
Tab. 5.5	Übersicht über die katalytisch aktiven Reste der <i>LuHNL</i> und die korrespondierenden Aminosäuren in ADHs	126
Tab. 5.6	Aktivität der <i>LuHNL</i> -Varianten	127
Tab. 6.1	Übersicht über die technisch relevanten Charakteristika von <i>MeHNL</i> , <i>AtHNL</i> und <i>LuHNL</i>	131
Tab. 7.1	Overview over the technical relevant aspects of <i>MeHNL</i> , <i>AtHNL</i> and <i>LuHNL</i>	134

1. Einleitung

1.1 Die Anwendung von Enzymen in der Biotechnologie

Die Geschichte der Nutzung von Enzymen durch den Menschen reicht bis ins Altertum zurück. Schon in der Antike wurden, wenn auch unbewusst, Enzyme zur Herstellung von Brot, Käse, Bier und Wein genutzt. Hierbei wurden sowohl ganze Zellen verwendet, beispielsweise Hefezellen beim Backen oder bei der alkoholischen Gärung, als auch zellfreie Enzympräparationen, wie z.B. das Lab aus Kälbermägen zur Käseherstellung [1].

Mitte des 19. Jahrhunderts bereits wurde unter anderem von Louis Pasteur die Existenz von „Fermenten“ postuliert, die die alkoholische Gärung in Hefezellen katalysieren [2].

1897 konnte Eduard Buchner dann mittels eines zellfreien Hefeextraktes nachweisen, dass die von Hefe katalysierte alkoholische Gärung nicht auf die Anwesenheit lebender Zellen angewiesen ist [3].

In diesem Zeitraum, Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts, begann man damit, bedingt durch die Fortschritte im Bereich der Mikrobiologie, Enzyme außerhalb der Nahrungsmittelproduktion industriell zu nutzen [4]. Ein Beispiel hierfür ist eine Stärke-hydrolysierende Enzympräparation aus dem Pilz *Aspergillus oryzae*, die Ende des 19. Jahrhunderts erstmals von Jokichi Takamine produziert wurde und bis heute unter dem Namen Taka-Diastase vermarktet wird [5].

Die fortschreitende Entwicklung molekularbiologischer Methoden seit Ende der siebziger Jahre des 20. Jahrhunderts ermöglichte sowohl eine effektivere und kostengünstigere Produktion, als auch die gezielte Manipulation von Biokatalysatoren, um diese an bestehende technische Prozesse anzupassen [6]. Zusammen mit der Entdeckung zahlreicher neuer Enzyme, mit deren Hilfe eine große Bandbreite unterschiedlicher Reaktionen katalysiert werden kann, führte diese verbesserte Verfügbarkeit zu einer verstärkten Nutzung von Biokatalysatoren auch im industriellen Maßstab [7].

Vorteile von Enzymen gegenüber konventionellen chemischen Katalysatoren sind zum einen die Nutzbarkeit unter verhältnismäßig milden Reaktionsbedingungen, wie z.B. moderaten Temperaturen und neutralem pH, sowie die Umweltverträglichkeit von Katalysator (Enzym) und Lösungsmittel, bei dem es sich häufig um eine wässrige Lösung handelt [8]. Jedoch gibt es inzwischen eine Reihe von Beispielen, dass Enzyme auch in organischen oder anderen nicht-wässrigen Lösungsmitteln wie ionischen Flüssigkeiten aktiv sind [9, 10]

Zum anderen werden Enzyme aufgrund ihrer hohen Chemo-, Regio- und vor allem auch Stereoselektivität zunehmend in chemischen Prozessen verwendet [11]. Der Einsatz von Enzy-

men ermöglicht die Herstellung enantiomerenreiner Feinchemikalien oftmals mit nur einem oder wenigen Syntheseschritten [12].

Ein Beispiel für den Einsatz von Enzymen ist die stereoselektive Carboligation; diese wird, neben wenigen anderen Enzymklassen, von den Hydroxynitril-Lyasen (HNLs) katalysiert [12].

1.2 Die Hydroxynitril-Lyasen

1.2.1 Durch Hydroxynitril-Lyasen katalysierte Reaktionen: Cyanogenese & Hydrocyanierung

Hydroxynitrillyasen (HNLs), auch Oxynitrilasen genannt, werden der Enzymklasse der Aldehyd-Lyasen (E.C. 4.1.2.X) zugeordnet. HNLs katalysieren die reversible stereoselektive Spaltung von Cyanhydrinen in HCN und eine Carbonylkomponente, bei der es sich um ein Aldehyd oder ein Keton handeln kann (Abb. 1.1) [12, 13]. Diese Spaltungsreaktion ist Bestandteil der als Cyanogenese bekannten Freisetzung von Blausäure [14]. Die Umkehrreaktion, bei der HCN stereoselektiv an eine Carbonylkomponente addiert wird, bezeichnet man als Hydrocyanierung.

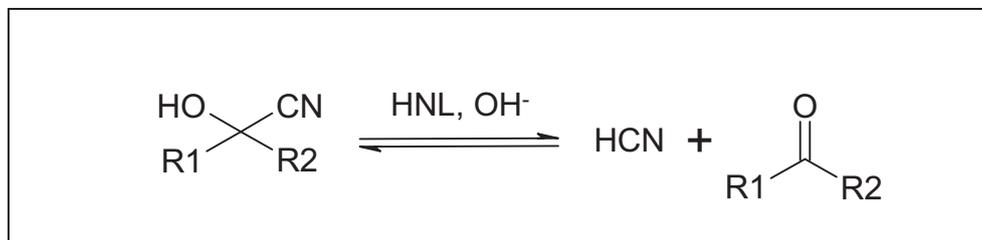


Abbildung 1.1: Von HNLs katalysierte Reaktionen. HNLs können entweder die Spaltung chiraler Cyanhydrine (Cyanogenese) oder die Addition von HCN an eine Carbonylgruppe (Hydrocyanierung) katalysieren. Beide Reaktionen werden auch durch die Anwesenheit von Basen begünstigt, jedoch findet dann keine stereoselektive Umsetzung statt.

1.2.1.1 Die Cyanogenese als Abwehrstrategie höherer Pflanzen

Die Fähigkeit zur Cyanogenese, also zur Freisetzung von Blausäure, wurde bislang bei mehr als 2500 Pflanzenspezies dokumentiert. Außerdem sind auch einige cyanogene Bakterienspezies, Pilzarten und Arthropoden bekannt [13, 15, 16].

Bei den cyanogenen Komponenten von Pflanzen handelt es sich vor allem um cyanogene Glycoside, bei denen ein Cyanhydrin über eine glycosidische Bindung mit einem Zuckerrest verbunden ist und auf diese Weise stabilisiert wird; seltener handelt es sich um cyanogene Lipide [17].

Da die bei der Cyanogenese freigesetzte Blausäure auf die meisten Organismen als starkes Gift wirkt, wird das Vorhandensein solcher cyanogener Komponenten zumeist als Abwehrstrategie gegenüber Herbivoren und Mikroorganismen interpretiert [18]; cyanogene Glycoside können jedoch auch als Stickstoffquelle bei der Synthese von Aminosäuren genutzt werden [19, 20].

Die Ursache für die hohe Toxizität der Blausäure, bzw. des durch Dissoziation gebildeten Cyanids, ist die effektive Inhibition vieler Metalloenzyme. Primär betroffen ist dabei vor allem die Cytochrom-Oxidase, die als terminale Oxidase der Atmungskette eine essenzielle Stellung im Zellstoffwechsel aerob lebender Organismen innehat [21]. Durch die Komplexierung des Cyanids mit dem zentralen Eisenion des Häm-Cofaktors der Cytochrom-Oxidase wird der Elektronentransfer auf Sauerstoff unterbunden, was im Endeffekt den Zelltod durch Erstickung bewirkt [22].

Neben dem Haupteffektor Cyanid wirken zudem oft auch die bei der Spaltung von Cyanhydrinen freigesetzten Carbonylverbindungen cytotoxisch [18].

1.2.1.2 Metabolismus der cyanogenen Glycoside

Die toxische Wirkung der Blausäure auf alle aerob lebenden Organismen bedingt, dass diese nicht frei in den Zellen der cyanogenen Pflanzen gespeichert werden kann; dies macht eine Nutzung von Speicherformen, wie sie die cyanogenen Glycoside darstellen, notwendig. Um diese im Bedarfsfall schnell und effektiv wieder spalten und HCN freisetzen zu können, verfügen die cyanogenen Pflanzen über ein komplexes System zur Synthese, Speicherung und Spaltung der cyanogenen Glycoside, wie hier am Beispiel von *Manihot esculenta* demonstriert werden soll (Abb. 1.2 & 1.3).

Bei der auch als Maniok oder Cassava bekannten Nutzpflanze *Manihot esculenta* geht die vor allem in den Sprossspitzen stattfindende Biosynthese des cyanogenen Glycosids Linamarin von der α -Aminosäure Valin (I) aus [23, 24]. Der erste Schritt der Biosynthese, bei dem aus Valin das Intermediat 2-Methyl-Propanaloxim (II) gebildet wird, wird von zwei membrangebundenen Cytochrom-P450-Enzymen (CYP79D1 und CYP79D2) katalysiert [24]. Dieses Intermediat wird von einem weiteren Cytochrom-P450, dem CYP71E, in Acetoncyanhydrin (III) umgewandelt [23, 25, 26].

Um das eigentliche cyanogene Glycosid Linamarin (IV) zu bilden, wird Acetoncyanhydrin, das durch den in der Vakuole vorherrschenden sauren pH-Wert stabilisiert wird, durch das

Enzym UDPG-Glycosyl-Transferase glycosyliert [27] und verbleibt in der Vakuole der Pflanzenzelle, wo es stabil gespeichert werden kann [28].

Diese Form der Speicherung erfordert von den Pflanzen einen Mechanismus, der bei Bedarf eine schnelle Freisetzung der als Fraßschutz fungierenden Blausäure ermöglicht.

Bei diesem Mechanismus spielen zwei Enzyme eine zentrale Rolle: das erste hier zu nennende Enzym ist die Linamarase, bei der es sich um eine β -Glucosidase handelt, die die Abspaltung der Glucosekomponente des Linamarins katalysiert. Das andere essenzielle Enzym ist die HNL, die im zweiten Schritt die Spaltung von Acetoncyanhydrin in Aceton und Blausäure katalysiert [28].

Um eine ungewollte Freisetzung von Blausäure zu unterbinden, liegen Substrat und Enzyme innerhalb der Zelle getrennt voneinander vor: während das Substrat Linamarin in der Vakuole gespeichert wird, sind beide für dessen Spaltung notwendigen Enzyme in der Zellwand lokalisiert [29, 30]

Wird nun die Zelle beschädigt, z.B. durch einen Fraßfeind, wird diese Kompartimentierung der Zelle aufgehoben und das Linamarin aus der Vakuole freigesetzt. Dies ermöglicht einen Kontakt des Linamarins mit den beiden in der Zellwand lokalisierten Enzymen Linamarase und HNL, woraufhin in einem Zwei-Schritt-Mechanismus Blausäure freigesetzt wird.

Zwar kommt es bei pH-Werten über 4 und bei Temperaturen über 25°C zu einer spontanen Zersetzung von Cyanhydrinen [31], jedoch wird diese Reaktion im schwach sauren Zellmilieu durch die HNL deutlich beschleunigt, was für die Funktion als Abwehrmechanismus von Vorteil ist [17].

Zusätzlich zu der Nutzung als Fraßschutz verfügt die Maniok-Pflanze über die Möglichkeit, freigesetztes Cyanid zur Synthese von Aminosäuren zu nutzen. Der vor allem bei Säugetieren, Insekten und Mikroorganismen auftretende Entgiftungsmechanismus über das Enzym Rhodanese, bei dem Cyanid mit Thiosulfat zu Sulfit und Thiocyanat umgesetzt wird, ist bei Pflanzen wie auch Maniok eher schwach ausgeprägt [32]. Dafür kann Cyanid durch die Enzyme β -Cyanoalanin-Synthase und β -Cyanoalanin-Hydrolase unter Nutzung von Cystein fixiert und weiter zu Asparagin umgesetzt werden [33].

In Abbildung 1.2 ist der oben beschriebene Cyanidmetabolismus schematisch zusammengefasst.

1. Einleitung

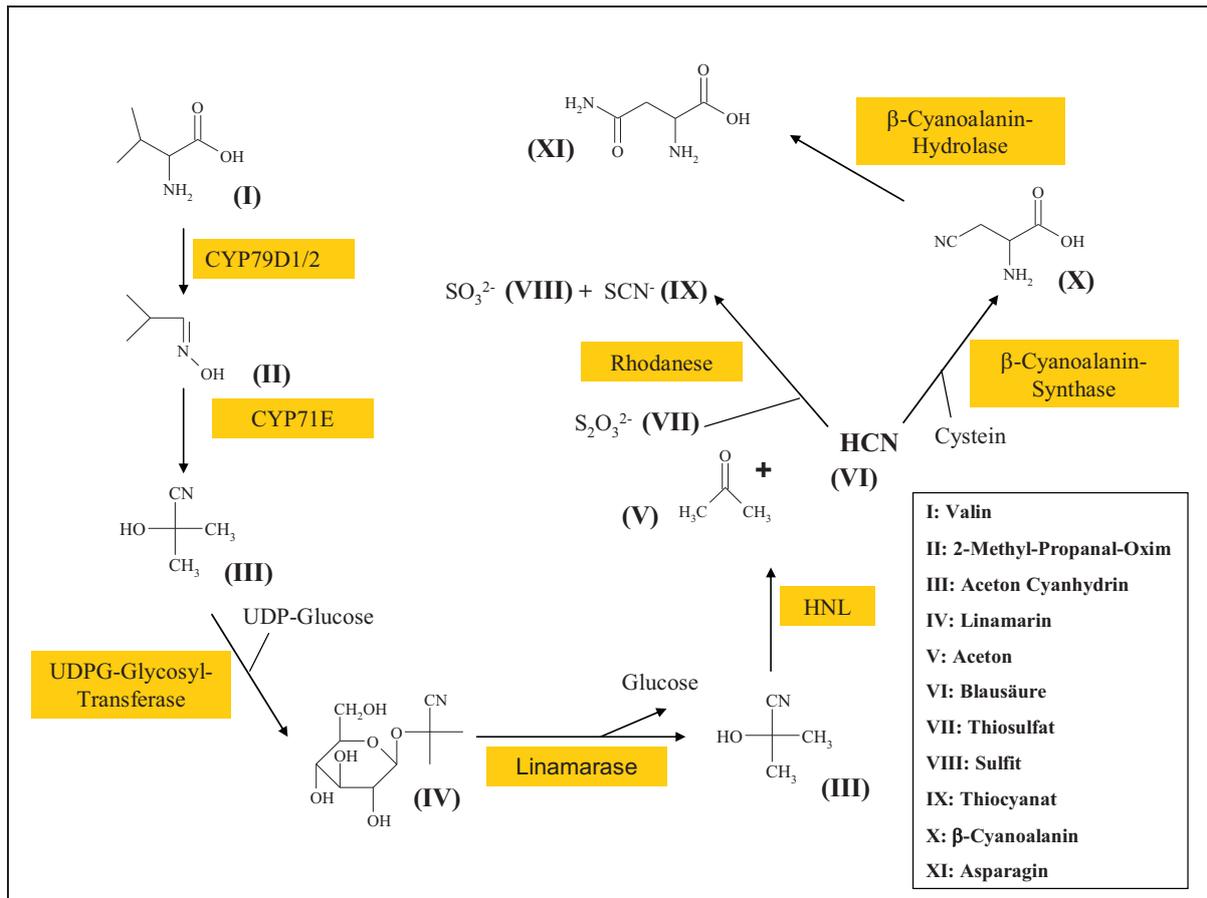


Abbildung 1.2: Anabolismus, Katabolismus und Entgiftungsmechanismen cyanogener Glycoside am Beispiel des Linamarins aus *Manihot esculenta*. Die Biosynthese erfolgt ausgehend von der Aminosäure Valin, die Spaltung wird durch die Enzyme Linamarase und HNL katalysiert. Modifiziert nach [17].

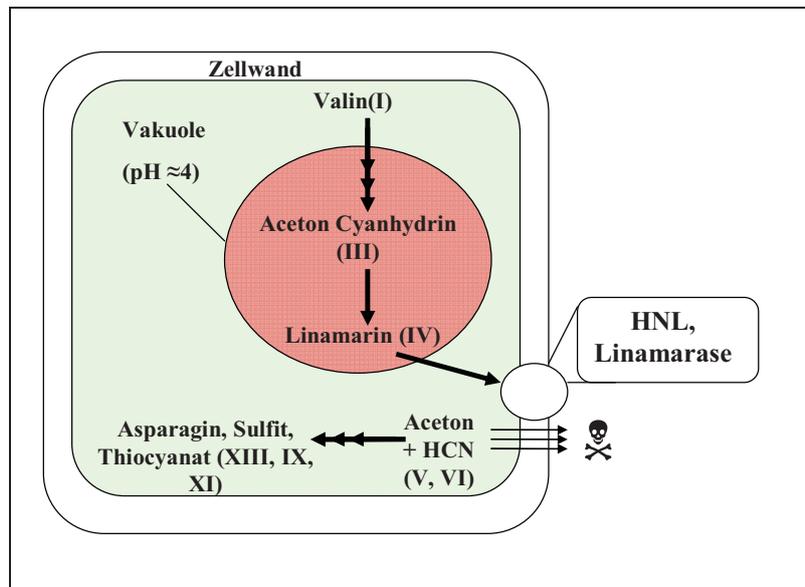


Abbildung 1.3: Schematische Abbildung einer Blatt-Mesophyllzelle aus *Manihot esculenta*. Dargestellt sind außen die Zellwand, in welcher die Enzyme Linamarase und HNL lokalisiert sind, das Cytoplasma (grün) und die Vakuole (rot), die der Speicherung der cyanogenen Glycoside dient. Der Weg der Biosynthese und der Spaltung des Linamarins sowie die Reassimilation von Cyanid sind anhand einiger ausgewählter Intermediate dargestellt. Die Nummerierung bezieht sich auf die Darstellung der Intermediate in Abb. 1.2. Modifiziert nach [28].

Prinzipiell ist der hier dargestellte Mechanismus von Biosynthese und Abbau der cyanogenen Glycoside auch auf andere cyanogene Pflanzen übertragbar. Einige Unterschiede zwischen den einzelnen cyanogenen Pflanzen können z.B. bei der Ausgangsaminosäure bestehen, bei der es sich neben Valin auch um Leucin, Isoleucin Phenylalanin und Tyrosin handeln kann, und dementsprechend die daraus resultierenden cyanogenen Glycoside betreffen, von denen bislang 60 verschiedene Arten bekannt sind [13].

Ein weiterer Unterschied kann in der Art der räumlichen Trennung der cyanogenen Substrate und der jeweiligen zur Spaltung notwendigen Enzyme liegen: während bei *Manihot esculenta* eine Trennung der cyanogenen Substrate von den zur Spaltung notwendigen Enzymen auf zellulärer Ebene erfolgt, können Substrate und Enzyme auch durch Speicherung in unterschiedlichen Geweben getrennt werden, wie es z.B. bei der Hirse (*Sorghum bicolor*) der Fall ist. Bei dieser Pflanze wurden die cyanogenen Glycoside in den Vakuolen der Epidermiszellen nachgewiesen, während die zugehörige β -Glycosidase und die HNL in den darunter liegenden Mesophyll-Zellen lokalisiert werden konnten [17].

Ein weiterer offensichtlicher Unterschied zwischen den bislang näher charakterisierten cyanogenen Pflanzen ist die Phylogenie der jeweiligen HNLs. Auf diese unterschiedlichen Enzyme soll im folgenden Kapitel näher eingegangen werden.

1.2.2 HNLs sind durch konvergente Evolution entstanden

Enzyme mit HNL-Aktivität wurden bislang in einer Reihe verschiedener Pflanzen gefunden, worunter sich auch einige wichtige Nutzpflanzen wie z.B. Hirse (*Sorghum bicolor*), Lein (*Linum usitatissimum*) und Maniok (*Manihot esculenta*) befinden.

Derzeit sind ca. 30 Pflanzen bekannt, die HNL-Aktivität aufweisen. Unter diesen findet sich mit *Arabidopsis thaliana* [34] auch eine nicht-cyanogene Pflanze. Bei einigen dieser Pflanzen ist das betreffende Enzym bekannt und zumindest teilweise charakterisiert, wie z.B. bei der Bittermandel *Prunus amygdalus* [35, 36], der Hirse *Sorghum bicolor* [37, 38] und dem Parakautschukbaum *Hevea brasiliensis* [39, 40]. In vielen anderen Fällen steht eine umfassende Charakterisierung der HNL-Aktivität aufweisenden Enzyme noch aus, da bislang nur Pflanzenextrakte auf den Umsatz verschiedener Substrate getestet wurden, wie beispielsweise bei der HNL aus *Annona muricata* (Stachelannone) [41].

Strukturell handelt es sich bei den HNLs um eine sehr heterogene Gruppe von Enzymen, die in erster Linie nur die von ihnen katalysierte Reaktion, nämlich die Spaltung von Cyanhydrinen, gemein haben. Eine grobe Unterteilung der HNLs kann mit Hilfe des Cofaktors FAD

erfolgen: ist für die strukturelle Integrität des Enzyms die Anwesenheit von FAD erforderlich, kann das Enzym zur Gruppe der FAD-abhängigen HNLs (HNL I) gezählt werden; benötigt das Enzym kein FAD, ordnet man es der Gruppe der FAD-unabhängigen HNLs (HNL II) zu [13, 42].

Während die den Cofaktor FAD enthaltenden HNLs (HNL I) bislang nur in Pflanzen aus der Familie der Rosaceen entdeckt wurden, wurden HNLs der Klasse II in einer Reihe verschiedener Pflanzenfamilien wie z.B. den Euphorbiaceen, den Linaceen und den Gramineen identifiziert. Eine Übersicht über einige strukturelle Charakteristika ausgewählter HNLs ist in Tabelle 1.1 gegeben.

Tabelle 1.1: Übersicht über einige ausgewählte HNLs. Weitere Details s. Kapitel 1.2.2.1, 1.2.3, 1.2.4 und 1.2.5.

HNL	<i>At</i> HNL	<i>Hb</i> HNL	<i>Lu</i> HNL	<i>Me</i> HNL	<i>Pa</i> HNL	<i>Sb</i> HNL
Ursprungs-Organismus	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Parakautschukbaum)	<i>Linum usitatissimum</i> (Leinsamen)	<i>Manihot esculenta</i> (Maniok)	<i>Prunus amygdalus</i> (Bittermandel)	<i>Sorghum bicolor</i> (Hirse)
Pflanzenfamilie	<i>Brassicaceae</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Linaceae</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Rosaceae</i>	<i>Gramineae</i>
Selektivität	R	S	R	S	R	S
3D-Struktur (PDB-Code)	-	1YB6	-	1DWP	1JU2	1GXS
Molekulargewicht/Untereinheit	29 kDa	29 kDa	42 kDa	29 kDa	61 kDa	33/23 kDa
Quartärstruktur	Homo-Dimer	Homo-Dimer	Homo-Dimer	Homo-Tetramer	Monomer	Hetero-Tetramer ($\alpha_2\beta_2$)
Cofaktoren	-	-	NAD, Zn ²⁺	-	FAD	-
Glycosylierung	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
Strukturelle Ähnlichkeit	α/β -Hydrolase	α/β -Hydrolase	ADH	α/β -Hydrolase	GMC-Oxido-Reduktase	SCP/ α/β -Hydrolase
HNL-Klasse	II	II	II	II	I	II

Aufgrund des Vorkommens in verschiedenen Pflanzenfamilien sowie der großen strukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen HNLs bzw. struktureller Ähnlichkeiten zu anderen Enzymen wird vermutet, dass die HNLs durch konvergente Evolution ausgehend von verschiedenen Vorfahren entstanden sind [13, 42]. (Abb. 1.4)

Neben strukturellen Anhaltspunkten wird diese These dadurch gestützt, dass sowohl bei der *SbHNL* als auch bei der *HbHNL* Nebenaktivitäten strukturell verwandter Enzyme entdeckt wurden: bei der *SbHNL* ist dies eine Carboxypeptidase-Aktivität, während bei der *HbHNL* Esterase-Aktivität nachgewiesen werden konnte [43, 44]

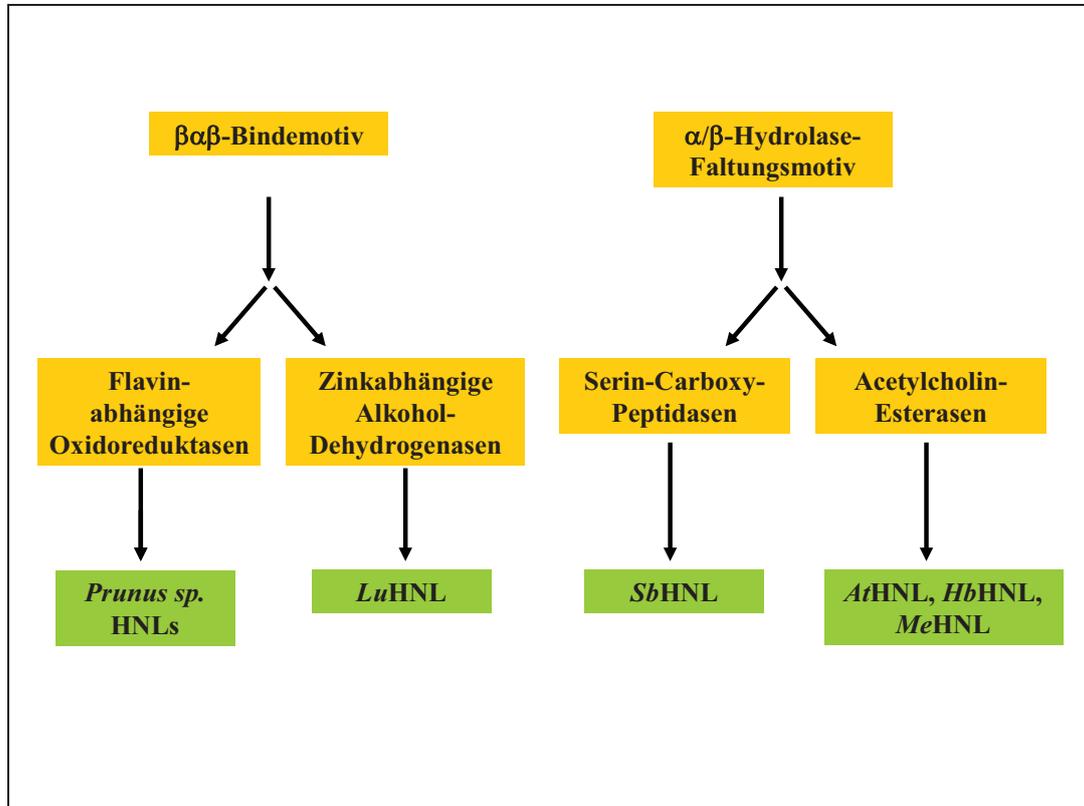


Abbildung 1.4: Theorie zur Entstehung der HNLs durch konvergente Evolution. Ausgehend von verschiedenen Vorfahren haben sich in verschiedenen Strukturfamilien HNLs entwickelt. (Modifiziert nach [13])

1.2.2.1 FAD-abhängige HNLs: Struktur, Substratspektrum und Verbreitung

Die FAD-abhängigen HNLs (HNL I) bilden im Gegensatz zu den FAD-unabhängigen HNLs eine homogene Gruppe von Enzymen. Bislang wurden sie ausschließlich in Pflanzen gefunden, die der Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*) zugeordnet werden [45]. Alle FAD-abhängigen HNLs sind ausnahmslos *R*-selektive, monomere Glycoproteine, deren natürliches Substrat in jedem Fall (*R*)-Mandelonitril ist [13, 42].

Das Molekulargewicht dieser Enzyme liegt bei 58 – 66 kDa (Unterfamilie Prunoideae) bzw. bei 75 – 82 kDa (Unterfamilie Maloideae), wobei der Gewichtsanteil N-glycosidisch gebundener Kohlenhydrate bis zu 30% des gesamten molekularen Gewichts ausmachen kann [17, 42]. HNLs dieser Klasse liegen meist in verschiedenen Isoformen vor, die auf Varianzen im Glycosylierungsmuster und/oder der Primärstruktur zurückgeführt werden [17].

Da die FAD-abhängigen HNLs zum einen nur in einer definierten Pflanzenfamilie vorkommen und auch bei serologischen Experimenten auf die Antisera der jeweils anderen *Rosaceen*-HNLs angesprochen haben, geht man davon aus, dass die HNLs dieser Gruppe phylogenetisch miteinander verwandt sind [46, 47].

Strukturell ähneln die FAD-abhängigen HNLs den GMC- (Glucose-Methanol-Cholin) Oxidoreduktasen, zu denen sie bis zu 30% Sequenzidentität aufweisen [48].

Obwohl der Cofaktor FAD in verschiedenen Oxidationszuständen vorliegen und damit die Aktivität des Enzyms beeinflussen kann, scheint er keine direkte Rolle beim katalytischen Mechanismus zu spielen [46, 49-51]. Offenbar handelt es sich um ein evolutionäres Relikt, das jedoch für die strukturelle Integrität des Enzyms wichtig ist [49, 50, 52].

Die Auflösung der Kristallstruktur der HNL aus *Prunus amygdalus* (Abb. 1.5) sowie darauf aufbauende Docking-Experimente ergaben Hinweise auf die Lage des aktiven Zentrums sowie den möglichen Reaktionsmechanismus dieser HNL. Es wird davon ausgegangen, dass sich das aktive Zentrum des Enzyms in der Nähe des Isoalloxazin-Ringes des oxidiert vorliegenden Cofaktors FAD befindet. Die Spaltung des Substrates wird vor allem durch ein Histidin an Position 497 katalysiert, das zunächst die Hydroxylgruppe des Substrates deprotoniert, um dann im zweiten Schritt der Reaktion das entstehende Cyanid zu Blausäure zu protonieren. Das negativ geladene Cyanid wird dabei vermutlich nicht wie bei anderen HNLs durch eine einzelne positiv geladene Seitenkette stabilisiert, sondern vielmehr durch ein elektrostatisches Potential, das von mehreren in der Nähe des aktiven Zentrums liegenden Aminosäuren gebildet wird [53].

Zwar wurden einige weitere Enzyme dieser Gruppe im Hinblick auf biochemische Eigenschaften näher untersucht, unter anderem die HNLs aus *Eriobotrya japonica* (Japanische Mispel, [54]), *Prunus serotonina* (Kirsche, [55]), und *Prunus lyonii* [45]; jedoch sind weitere Kristallstrukturen von FAD-abhängigen HNLs derzeit nicht bekannt.

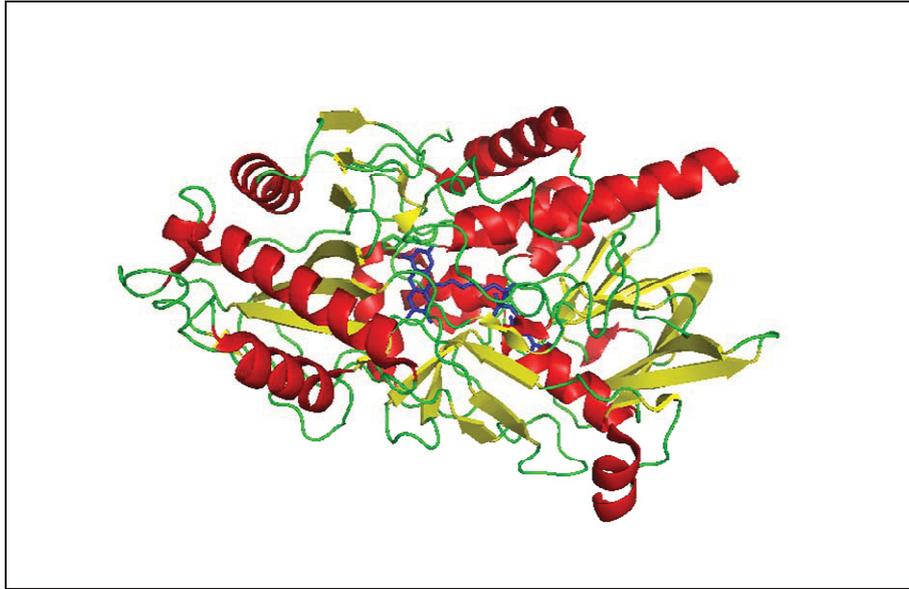


Abbildung 1.5: Die HNL aus *Prunus amygdalus* (PDB-Eintrag 1JU2). Bei dem Enzym handelt es sich um ein Monomer, das FAD als Cofaktor (hier blau) enthält [53].

1.2.2.2 FAD-unabhängige HNLs: ein kurzer Überblick

Im Vergleich zu den HNLs der Klasse I zeigt die Gruppe der FAD-unabhängigen HNLs ein weitaus höheres Maß an struktureller Heterogenität. Zudem treten die HNLs der Klasse II nicht wie die der Klasse I in einer phylogenetisch klar umrissenen Gruppe von Pflanzen auf. Die neun bislang näher charakterisierten HNLs dieser Klasse stammen von Spezies aus sieben verschiedenen Pflanzenfamilien (s. Tab. 1.1).

Weitere Unterschiede zwischen den einzelnen Mitgliedern dieser Gruppe, neben der Struktur und der phylogenetischen Verwandtschaft, bestehen in der Enantioselektivität, dem Vorhandensein posttranslationaler Modifikationen, dem natürlichen Substrat und dem Substratspektrum.

Kristallstrukturen konnten bislang von den HNLs aus *Arabidopsis thaliana* [56], *Hevea brasiliensis* [39], *Linum usitatissimum* [57], *Manihot esculenta* [58, 59] und *Sorghum bicolor* [37] gelöst werden und in den meisten Fällen die vorhergegangenen Hypothesen bezüglich der jeweiligen Struktur bestätigen. Die Enzyme lassen sich strukturell den α/β -Hydrolasen (*AtHNL*, *HbHNL*, *MeHNL*, *SbHNL*) und den Alkoholdehydrogenasen (*LuHNL*) zuordnen. Auf der Basis der gelösten Strukturen wurde in allen Fällen ein Modell zum jeweiligen Reaktionsmechanismus erstellt.

Drei dieser HNLs sollen in den folgenden Kapiteln detaillierter betrachtet werden.

1.2.3 Die HNL aus *Manihot esculenta*: eine S-selektive α/β -Hydrolase

Neben den HNLs aus *Prunus amygdalus* und *Hevea brasiliensis* ist die HNL aus *Manihot esculenta* eine der am besten beschriebenen HNLs überhaupt. Erstmals wurde die MeHNL Anfang der 1980er Jahre beschrieben [60]; seitdem wurden eine Reihe von Publikationen über die biochemischen Charakteristika, Struktur und Reaktionsmechanismus sowie das Substratspektrum und die technische Reaktionsführung veröffentlicht. Darüber hinaus ist die physiologischen Funktion dieses Enzyms von Interesse, da die von der MeHNL mitkatalysierte Cyanogenese beim Maniok in einigen Regionen Afrikas ein Problem bei der Ernährung der ansässigen Bevölkerung darstellen kann (Kapitel 1.2.1.2) [25, 61].

Strukturell lässt sich die MeHNL den α/β -Hydrolasen zuordnen. Neben dem allgemeinen Faltungsmuster, bei dem die einzelnen Stränge eines zentralen β -Faltblattes durch α -Helices verbunden sind, weist die MeHNL auch die für diese Strukturfamilie typische katalytische Triade bestehend aus Serin-80, Aspartat-208 und der katalytischen Base Histidin-236 auf (Abb. 1.6).

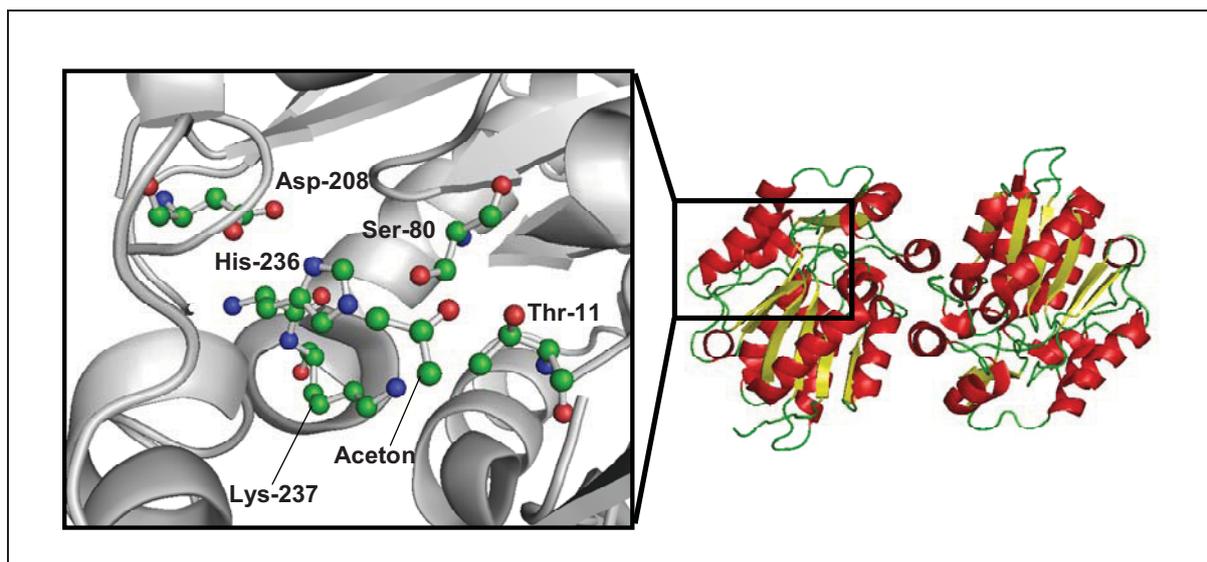


Abbildung 1.6: Die Struktur der MeHNL. Rechts ist die Gesamtstruktur (PDB-Code: 1DWO) abgebildet, bei der α -helikale Bereiche rot und β -Faltblätter gelb dargestellt sind. In der Kristallstruktur liegt die MeHNL als Homo-Dimer vor. Links im Bild ist das aktive Zentrum des Enzyms vergrößert dargestellt. Hervorgehoben sind die Aminosäuren der katalytischen Triade Serin-80, Aspartat-208 und Histidin-236, sowie das Spaltungsprodukt Aceton. Aceton wird über Wasserstoffbrücken zu Serin-80 und Threonin-11 stabilisiert. Zudem ist das Lysin an Position 237 abgebildet, dessen Rolle kontrovers diskutiert wird (s. Text).

Die exakte Quartärstruktur des Enzyms ist derzeit noch unklar: während es in der Kristallstruktur als Homo-Dimer vorliegt, werden für das Enzym in Lösung trimere oder tetramere Assoziationsformen diskutiert [62-64]. Neuere Studien deuten jedoch auf ein Gemisch aus Dimeren und Tetrameren in Lösung hin [65].

Auf der Basis der Kristallstruktur sowie durch ortsspezifische Mutagenese möglicher katalytisch aktiver Aminosäuren konnte ein Modell des Reaktionsmechanismus der MeHNL erstellt

werden, das dem der *HbHNL* ähnelt [59]. Trotz großer Ähnlichkeit zur HNL aus *Hevea brasiliensis*, sowohl auf Ebene der Primär- als auch der Tertiärstruktur (77% identische Aminosäuren, RMSD der C_{α} -Atome = 0,42 Å), sowie gleicher an der Reaktion beteiligter Aminosäuren, weicht der für die *MeHNL* postulierte Reaktionsmechanismus in Details von dem der *HbHNL* ab [40, 59, 66] (Abb. 1.7). Gemein ist beiden Modellen, dass Histidin als katalytische Base wirkt. Vermittelt durch ein Proton der Serin-Hydroxylgruppe zieht das Histidin ein Proton von der OH-Gruppe des Cyanhydrins ab und überträgt es auf das dabei entstehende Cyanid. Während jedoch im *HbHNL*-Modell eine Stabilisierung des Cyanids über einen in beiden Strukturen vorhandenen Lysinrest postuliert wird, wird diesem Lysin im *MeHNL*-Modell keine Funktion zugeschrieben. Die genaue Funktion des Lysinrestes beim katalytischen Mechanismus wird deshalb derzeit noch kontrovers diskutiert [66].

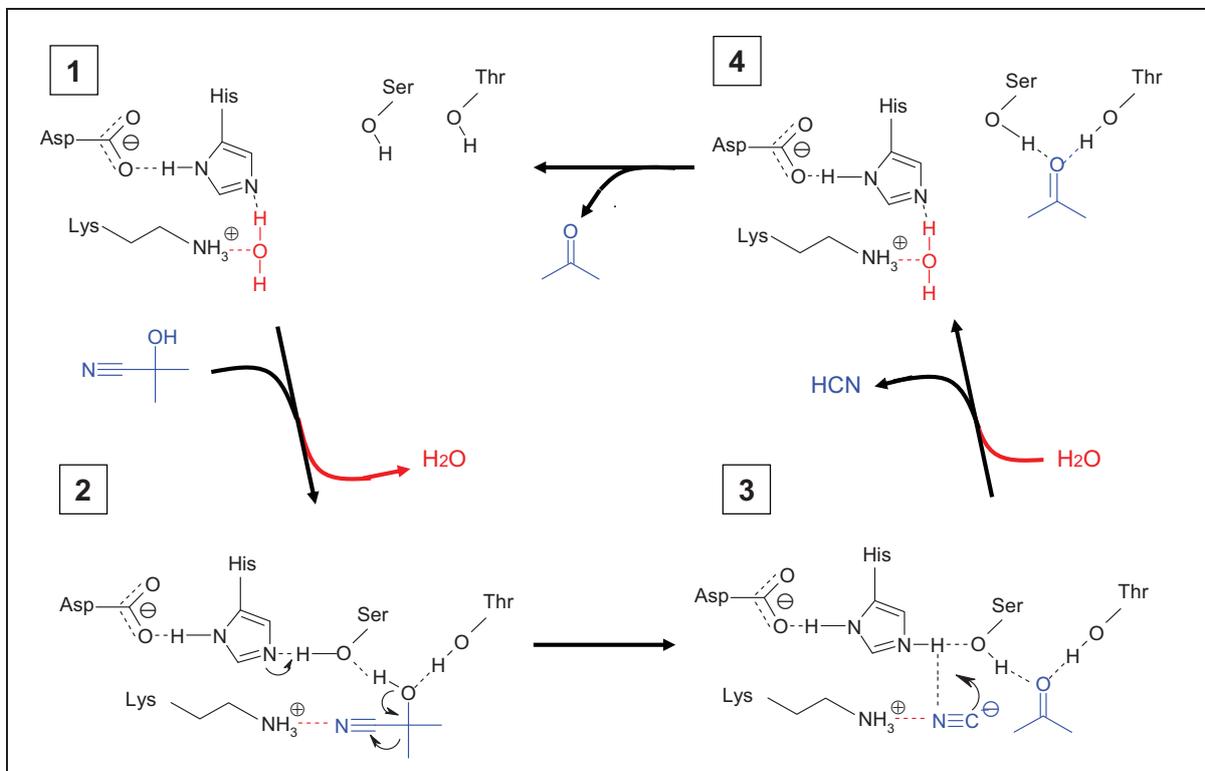


Abbildung 1.7: Vorgeschlagene Katalysemechanismen für die *MeHNL* (schwarz) und die *HbHNL* (schwarz/rot). Die beiden Mechanismen sind hier am Beispiel der Spaltung von Acetoncyanohydrin (blau) verdeutlicht. Bei der *HbHNL* ist ein Wassermolekül im aktiven Zentrum gebunden, das durch ein Lysin und das katalytisch aktive Histidin koordiniert wird (1). Dieses wird bei der Substratbindung gegen das jeweilige Cyanohydrin ausgetauscht (2). Vermittelt durch das katalytisch aktive Serin wird nun in beiden Fällen das Proton der Hydroxylgruppe des Cyanohydrins vom Histidin abstrahiert und auf das Cyanid übertragen, welches im *HbHNL*-Modell durch Lysin stabilisiert wird. Anschließend werden zunächst Blausäure und danach die Carbonylkomponente freigesetzt (4), wobei bei der *HbHNL* wieder ein Austausch mit einem Wassermolekül erfolgt. Sowohl die Rolle des Lysinrestes als auch die des Wassermoleküls sind im Falle der *MeHNL* nicht geklärt und werden kontrovers diskutiert. Modifiziert nach [66].

Neben der beschriebenen Spaltung ist die *MeHNL* auch in der Lage, die Synthese von chiralen Cyanhydrinen zu katalysieren. Hierbei akzeptiert das Enzym eine breite Palette von Sub-

straten und setzt diese mit hoher Enantioselektivität zu den entsprechenden (*S*)-Cyanhydrinen um. Bei den umgesetzten Substraten kann es sich um aromatische, aliphatische und um heterozyklische Aldehyde und Ketone handeln [58, 67, 68]. Dieses breite Substratspektrum macht die *MeHNL* grundsätzlich für biotechnologische Anwendungen interessant. Zusätzlich konnte das Substratspektrum des Enzyms durch Mutagenese erweitert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Variante W128A, bei der das Tryptophan an Position 128, das den zum aktiven Zentrum führenden Substrattunnel verengt, gegen Alanin ausgetauscht wurde. Dadurch können von dieser Variante auch sterisch anspruchsvolle Substrate wie z.B. 3-Phenoxybenzaldehyd besser umgesetzt werden [68, 69].

1.2.4 Die HNL aus *Arabidopsis thaliana* – Der ungleiche Zwilling der *MeHNL*

Anders als die HNL aus *Manihot esculenta*, die bereits seit vielen Jahren bekannt ist und auch in technischen Prozessen verwendet wird, wurde die HNL aus *Arabidopsis thaliana* erst vor kurzem aufgrund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit zu *MeHNL* und *HbHNL* kloniert und auf HNL-Aktivität überprüft [34].

Das Vorhandensein einer funktionalen HNL in *Arabidopsis thaliana* ist in sofern erstaunlich, da diese Pflanze nicht zu den cyanogenen Pflanzen zählt. Daher wird vermutet, dass es sich bei der *AtHNL* um ein evolutionäres Relikt handeln könnte [56].

Wie auch die *HbHNL* und die *MeHNL* ist die *AtHNL* eine α/β -Hydrolase, die sowohl in der Kristallstruktur als auch in Lösung in Form eines Homodimers vorliegt [65]. Trotz der großen Ähnlichkeit der Primärstrukturen (67% ähnliche Aminosäuren mit *HbHNL* und *MeHNL*) und Tertiärstrukturen zeigt die *AtHNL* im Vergleich zu den anderen beiden Enzymen eine invertierte Enantioselektivität und ist die erste bekannte *R*-spezifische HNL mit α/β -Hydrolasefaltung [34].

Durch die Auflösung der Kristallstruktur der *AtHNL* konnte sowohl ein Modell für den Reaktionsmechanismus als auch eine Erklärung für die invertierte Stereoselektivität der Enzyms gefunden werden (Abb. 1.8). Demnach verfügt die *AtHNL* über die gleiche katalytische Triade wie die *MeHNL* und die *HbHNL*, jedoch werden die Reste dort anders als bei den beiden anderen Enzymen genutzt: so wird bei diesem Enzym beispielsweise die OH-Gruppe des Cyanhydrins direkt von dem als Base wirkenden Histidin deprotoniert, und nicht indirekt über Serin, wie es bei den anderen α/β -Hydrolase-HNLs der Fall ist [56].

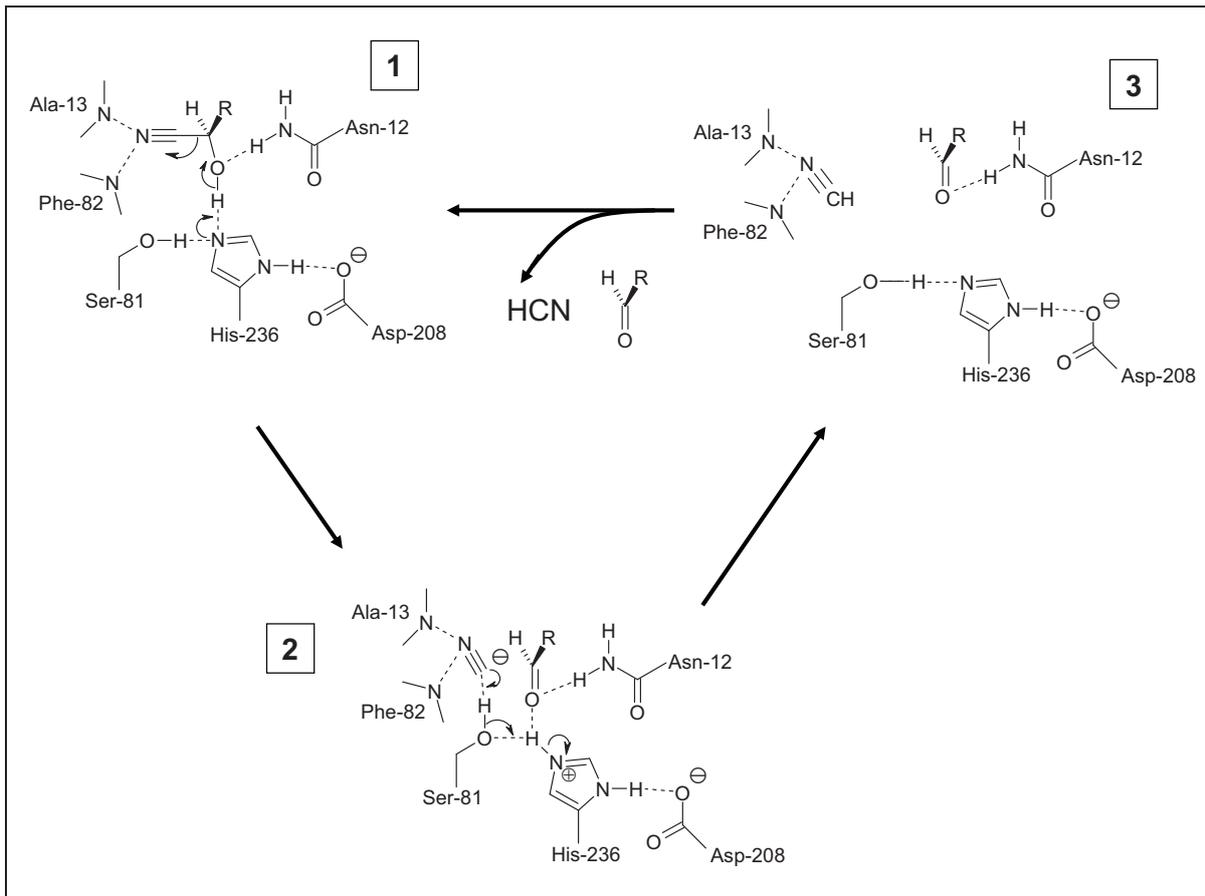


Abbildung 1.8: Vorgeschlagener Katalysemechanismus der *AtHNL*. Anders als bei *MeHNL* und *HbHNL* interagiert das Substrat hier direkt mit dem katalytisch aktiven Histidin. Die Hydroxylgruppe des Substrates wird durch Asparagin-12, die Cyanidgruppe durch Wasserstoffbrücken zu den Peptidgruppen von Alanin-13 und Phenylalanin-82 sowie ein Helixdipolmoment stabilisiert. Histidin-236 deprotoniert die Hydroxylgruppe des Cyanhydrins und transferiert das Proton über Serin-81 auf das dabei entstehende Cyanid. Modifiziert nach [56].

Aufgrund des breiten Substratspektrums, das dem der *MeHNL* ähnlich ist, der Stereoselektivität und der Möglichkeit zur rekombinanten Expression in *E. coli* könnte die *AtHNL* eine Alternative zur bereits etablierten *PaHNL* darstellen.

1.2.5 Die HNL aus *Linum usitatissimum* ähnelt Zn^{2+} -abhängigen Alkoholdehydrogenasen

Wie die HNL aus *Manihot esculenta* und *Arabidopsis thaliana* gehört die HNL aus *Linum usitatissimum* (Flachs) der Gruppe der FAD-unabhängigen HNLs an. Im Gegensatz zu *AtHNL* und *MeHNL* zeigt diese jedoch keine Ähnlichkeit zu den α/β -Hydrolasen, vielmehr weist die *LuHNL*, sowohl auf der Ebene der Aminosäuresequenz als auch auf Strukturebene, eine große Ähnlichkeit zu den Alkoholdehydrogenasen (ADHs) auf [57, 70, 71]. Ein Unterschied zu *AtHNL* und *MeHNL* ist neben der unterschiedlichen Struktur vor allem auch das Substratspektrum des Enzyms: während beide α/β -Hydrolase-HNLs jeweils ein breites Spek-

rum an aliphatischen und aromatischen Substraten umsetzen können, akzeptiert die *LuHNL* in erster Linie nur aliphatische Aldehyde und Ketone, die sie zu den entsprechenden (*R*)-Cyanhydrinen umsetzt [72]. Beispiele hierfür sind die beiden natürlichen Substrate des Enzyms, Acetoncyanhydrin und (*R*)-2-Butanoncyanhydrin. Jedoch konnte in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit auch der *S*-selektive Umsatz weiterer Substrate dokumentiert werden, bei denen es sich, anders als bei den vorangegangenen Studien, um substituierte Phenylaceton- und Benzylacetonderivate handelte, also um Substrate, bei denen ein aromatisches Ringsystem durch Methylengruppen vom Carbonyl-Kohlenstoffatom getrennt ist [73].

Strukturell handelt es sich bei der *LuHNL* um ein Homodimer mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 84 kDa, dessen einzelne Untereinheiten aus 422 Aminosäuren bestehen und ein Molekulargewicht von 42 kDa aufweisen [70, 71]. Da die *LuHNL* bislang nicht zusammen mit einem Substrat kristallisiert werden konnte, erfolgten Untersuchungen zum katalytischen Mechanismus des Enzyms bislang auf der Basis von Docking-Experimenten. Bei diesen Berechnungen zeigte sich, dass das aktive Zentrum der *LuHNL* wahrscheinlich identisch mit dem der ADHs ist und von Aminosäuren beider Untereinheiten gebildet wird; ein Vorliegen des Enzyms als Dimer ist deshalb für seine Aktivität notwendig [57]. Jede der beiden Untereinheiten enthält zwei Zinkionen, von denen eines für die katalytische Aktivität essentiell ist, und NAD^+ als weiteren Cofaktor, dem jedoch keine katalytische Funktion zugeschrieben wird [57].

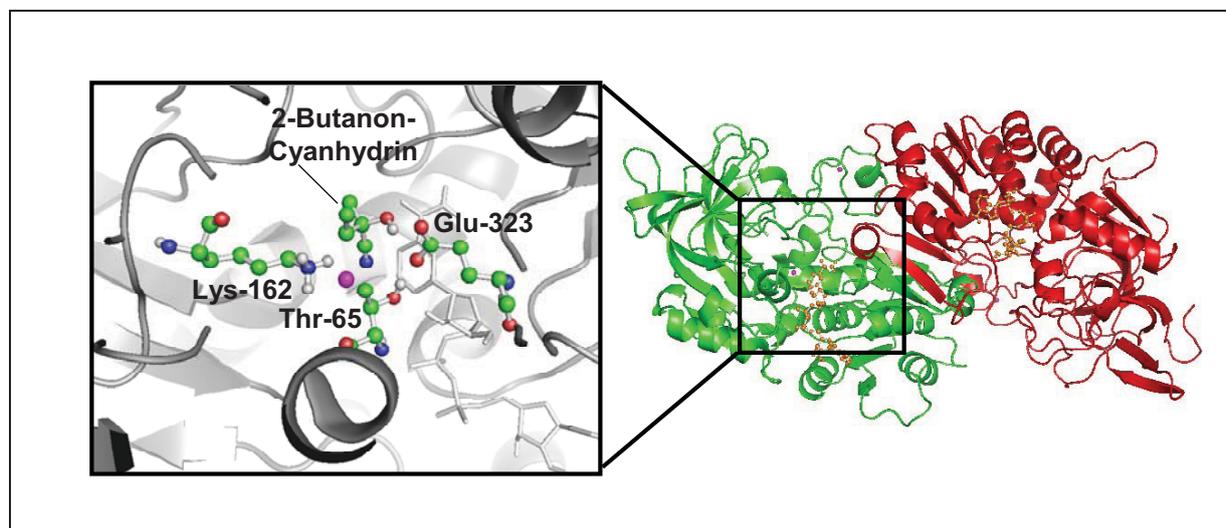


Abbildung 1.9: Die Kristallstruktur der *LuHNL*. Rechts ist eine Übersicht über die Gesamtstruktur des Enzyms gegeben, wobei die einzelnen Untereinheiten rot und grün gefärbt sind; zusätzlich sind die Cofaktoren NAD^+ (orange) und Zink (magenta) dargestellt. Im Bildausschnitt links ist das aktive Zentrum der *LuHNL* zu sehen. Hier sind die katalytisch aktiven Aminosäuren Threonin-65, Lysin-162 und Glutamat-323 sowie das Substrat 2-Butanon-Cyanhydrin abgebildet. Der Cofaktor NAD^+ ist hier weiß gefärbt.

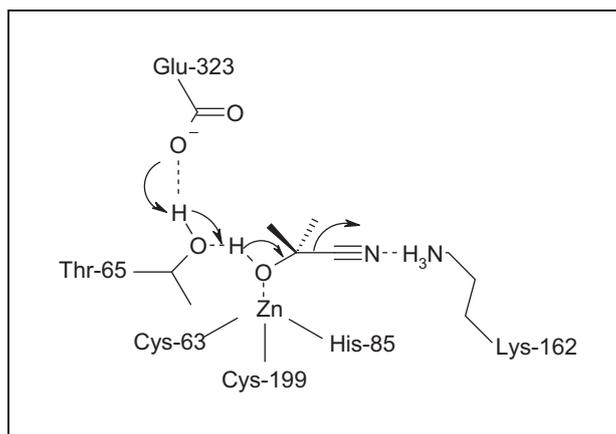


Abbildung 1.10: Putativer Katalysemechanismus der LuHNL. Details s. Text. Nach [57].

Als Bestandteile des katalytischen Mechanismus wurden Threonin-65, Lysin-162 und Glutamat-323 postuliert; ferner ist eines der beiden Zinkionen ebenfalls an der Cyanhydrinspaltung beteiligt. Es wird vermutet, dass die Hydroxylgruppe des Substrates (in Abb 1.9 Butanon-Cyanhydrin) an das katalytische Zinkion gebunden wird, während zusätzlich eine Wasserstoffbrückenbindung zur Seitenkette des Threonin-65 erfolgt. Im ersten Schritt der Reaktion abstrahiert Glutamat-323, welches hier als Base wirkt, das Proton der Threoninseitenkette. Die deprotonierte Seitenkette des Threonins abstrahiert daraufhin das Proton der Hydroxylgruppe des Substrats, was durch die positive Ladung des Zinkions stabilisiert wird. Die dann erfolgende Spaltung der C-C-Bindung wird durch die positive Ladung des Lysin-162 unterstützt, welches das entstehende Cyanidion stabilisiert. Dieses wird im letzten Schritt der Reaktion von Glutamat-323 protoniert und verlässt zusammen mit der Carbonylkomponente das aktive Zentrum des Enzyms [57].

1.2.6 Biotechnologische Nutzung der HNLs

Die enantioselektive C-C-Bindungsknüpfung gewinnt in der bioorganischen Synthese stetig an Bedeutung. Neben anderen Enzymklassen wie z.B. den thiamindiphosphat-abhängigen 2-Ketosäuredecarboxylasen können derartige Reaktionen vor allem auch von HNLs katalysiert werden [44].

Nachdem bereits 1837 von Wöhler und Liebig erstmals die Spaltung des cyanogenen Glycosids Amygdalin durch Extrakte der Bittermandel (Emulsin) in eine Zuckerkomponente, Benzaldehyd und Blausäure dokumentiert wurde [74], erfolgte die erste Beschreibung einer Synthesereaktion vor 100 Jahren durch Rosenthaler, der Extrakte der Bittermandel zur Synthese von (*R*)-Mandelonitril nutzte [75].

Enzymatische Hydrocyanierungen erfuhren bis auf einige Ausnahmen in den 30er [76-78] und 60er Jahren [52, 79] des letzten Jahrhunderts danach für lange Zeit wenig Aufmerksam-

keit, bis das Interesse Anfang der 1990er Jahre, bedingt durch die steigende Nachfrage nach enantiomerenreinen Cyanhydrinen, wieder zunahm [80, 81]. Zwar lassen sich chirale Cyanhydrine prinzipiell auch durch chemische Prozesse herstellen, wobei Katalysatoren wie z.B. chirale Metallkomplexe oder cyclische Dipeptide verwendet werden [82, 83]. Jedoch liegen die Vorteile der HNLs gegenüber chemischen Katalysatoren vor allem darin, dass HNLs im Gegensatz zu diesen eine hohe Stereoselektivität bei gleichzeitig breitem Substratspektrum aufweisen, dass kostengünstige HCN-Quellen genutzt werden können und die Enzyme zudem dauerhaft bei konstanter Qualität in großen Mengen verfügbar sind [82-84].

Zu den technisch derzeit am meisten genutzten HNLs gehören die Enzyme aus *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta* und *Prunus amygdalus*. Die HNLs aus *Hevea brasiliensis* [85] und *Prunus amygdalus* [35] können im mikrobiellen Wirt *Pichia pastoris* in großen Mengen hergestellt werden und werden unter anderem bei Dutch State Mines (DSM) zur Produktion von mehreren Tonnen (*S*)- bzw. (*R*)-Mandelonitril pro Jahr genutzt [12].

Die *Me*HNL kann problemlos sowohl im prokaryotischen Wirt *E. coli* als auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden; derzeit erfolgt die Produktion dieses Enzyms in *E. coli* im Maßstab von 10.000 L, wobei einige Giga-Units Aktivität gewonnen werden [84]. Ein Beispiel für ihre Anwendung ist die Produktion von (*S*)-2-Chlormandelonitril durch Archimica in der Größenordnung von ca. 1 T pro Jahr [86].

Auch die *At*HNL lässt sich leicht heterolog in *E. coli* exprimieren [34], was eine kostengünstige und einfache Produktion großer Mengen des Enzyms erlaubt. Zudem ist eine aufwändige Aufarbeitung der *At*HNL nicht zwingend notwendig, da sich der lyophilisierte Zellrohextrakt bei der Anwendung hinsichtlich des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses nicht von der gereinigten Form des Enzyms unterscheidet [34].

Zwar kann die *Lu*HNL generell in *E. coli* und *P. pastoris* exprimiert werden, jedoch liegen die Ausbeuten bei diesem Enzym deutlich unter denen anderer HNLs [87]. Trotz des eher eingeschränkten Substratspektrums wird auch die *Lu*HNL derzeit kommerziell zur Herstellung von (*R*)-Cyanhydrinen genutzt.

1.2.7 Cyanhydrine sind vielseitige Bausteine in der organischen Synthese

Enantiomerenreine Cyanhydrine sind aufgrund ihrer Funktionalitäten vielseitige Bausteine für die organischen Synthese [31, 88] (Abb. 1.11). Generell können Folgereaktionen vor allem an der Nitrilgruppe und der Hydroxylgruppe eines Cyanhydrins stattfinden; in einigen Fällen

können auch die aliphatischen oder aromatischen Reste modifiziert werden, wie beispielsweise im Fall von ungesättigten Cyanhydrinen. Ein Beispiel für die Modifikation der Hydroxylgruppe ist die Herstellung von α -Sulfonyloxynitrilen, die unter den entsprechenden Bedingungen zu α -Aminosäuren, α -Azidonitrilen, α -Aminonitrilen und Aziridinen weiterverarbeitet werden können [89]. Durch Modifikation der Nitrilgruppe lassen sich beispielsweise α -Hydroxysäuren [90], α -Hydroxyaldehyde [91] oder β -Aminoalkohole gewinnen [89].

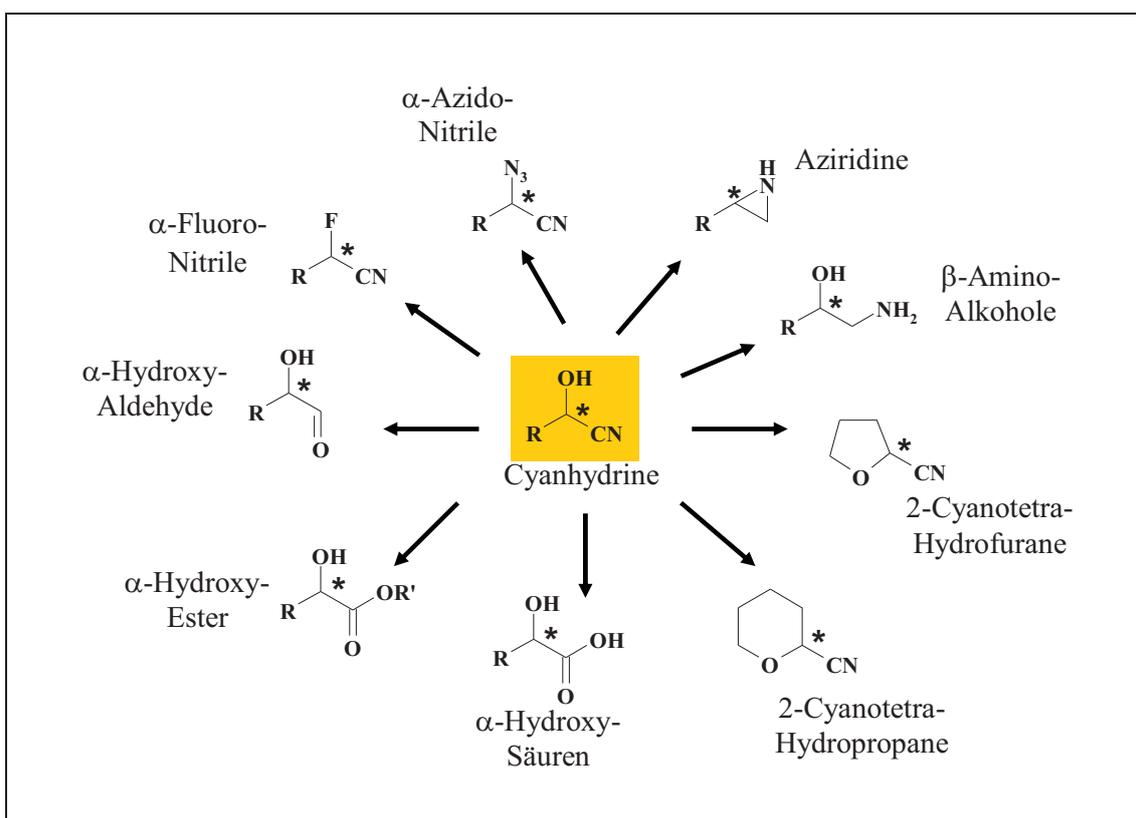


Abbildung 1.11: Wichtige Folgereaktionen der Synthese von chiralen Cyanhydrinen. Modifiziert nach [88].

Beispiele für kommerziell produzierte Cyanhydrine sind unter anderem 3-Phenoxybenzaldehyd-Cyanhydrin, welches zur Pyrethroidherstellung genutzt wird, Mandelonitril, das z.B. zur Mandelsäure weiterverarbeitet werden kann, oder auch 2-Chlormandelonitril, das bei der Synthese von Blutgerinnungshemmern eingesetzt wird [88].

1.2.8 Randbedingungen für die technische Herstellung enantiomerenreiner Cyanhydrine

Eine Herausforderung bei der Produktion von enantiomerenreinen Cyanhydrinen ist neben der Stabilität der Produkte auch die Unterdrückung der nicht-enantioselektiven spontanen Hydrocyanierungsreaktion. Diese verläuft unter Bildung des racemischen Cyanhydrins parallel zur

enzymatischen Reaktion und beeinträchtigt die Enantiomerenreinheit der Produkte. Sowohl die spontane Bildung als auch die spontane Zersetzung von Cyanhydrinen werden bereits im schwach sauren Milieu ($\text{pH} > 4$) und insbesondere bei höherem pH oder durch Temperaturen über 25°C begünstigt [31]. Dieses Problem kann normalerweise durch das Arbeiten bei niedrigem pH-Wert ($\text{pH} 3,5 - 5$) [80, 81] und bei niedriger Temperatur ($0^\circ - 5^\circ\text{C}$) [88, 92] umgangen werden. Jedoch stellt das saure Milieu hohe Ansprüche an die Stabilität der verwendeten Enzyme und kann deren Inaktivierung verursachen.

Ein weiteres spezifisches Problem bei der Cyanhydrinsynthese ist zudem die oft schlechte Löslichkeit vieler Substrate und Produkte in wässrigen Lösungen. Dieses kann durch die Nutzung der HNLs in weitgehend wasserfreien organischen oder auch in organisch-wässrigen Zweiphasen-Systemen gelöst werden [89]. Vorteil der Biokatalyse im rein organischen Medium ist neben der guten Löslichkeit der Substrate und Produkte auch die in diesem Fall vernachlässigbare Nebenreaktion, die durch wasser-unlösliche Lösungsmittel fast komplett unterdrückt wird [93, 94]. Bei dieser Form der Reaktionsführung hat sich die Immobilisierung der Enzyme als günstig erwiesen, da diese so durch einfache Filtration vom Lösungsmittel getrennt und anschließend wieder verwendet werden können [95]. Derzeit werden HNLs in verschiedenen immobilisierten Formen genutzt, wie z.B. *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs), *cross-linked enzyme crystals* (CLECs), eingekapselt in Sol-Gel-Matrizen oder an verschiedene Trägermaterialien wie z.B. Silicagel oder Nitrocellulose gekoppelt [89, 96-98]. Gute Erfahrungen wurden mit Diisopropylether oder Ethylacetat als Lösungsmittel gemacht, da die verwendeten Enzyme darin eine hohe Stabilität zeigen [99].

Trotz dieser offensichtlichen Vorteile findet die Cyanhydrinsynthese im industriellen Maßstab jedoch weniger in komplett wasserfreien Systemen als vielmehr in wässrig/organischen Zweiphasen-Systemen statt. Dabei werden vorwiegend isolierte Enzyme verwendet, die nach der einmaligen Nutzung entsorgt werden [12]. Zudem werden in industriellen Maßstab in der Regel vorwiegend relativ simple Rührkesselreaktoren zur Cyanhydrinsynthese genutzt, deren Verwendung sich in zweifacher Hinsicht als vorteilhaft auszeichnet: zum einen kann in der Regel ohne größere Investitionen auf bereits vorhandene Anlagen zurückgegriffen werden, zum anderen hat sich die Nutzung derartiger Reaktorsysteme unter den gegebenen Sicherheitsauflagen für Blausäure als praktikabel erwiesen. Die spezifische Problematik von Arbeiten mit freier Blausäure hängt neben der hohen Toxizität dieses Stoffes vor allem mit dessen niedrigem Siedepunkt zusammen, was freies HCN zu einem flüchtigen und somit schlecht zu handhabenden Werkstoff macht. Zwar konnte die Möglichkeit zur Verwendung alternativer Cyanidquellen wie z.B. Acetoncyanhydrin, Trimethylsilylcyanid oder Cyanofor-

mianen generell bereits gezeigt werden, jedoch lässt sich keine von ihnen so wirtschaftlich nutzen wie freie Blausäure [12].

Die Steuerung der basenkatalysierten Nebenreaktion kann in einem solchen System zum einen durch die Absenkung des pH-Wertes in der wässrigen Phase erfolgen, außerdem besteht zusätzlich die Möglichkeit, die Enantioselektivität der Reaktion durch die Kontrolle des Massentransfers zu beeinflussen [100].

Neben allgemeinen Überlegungen bezüglich der Kosten eines Biokatalysators, die maximal 5 bis 10 % der Prozesskosten nicht übersteigen sollten [101], sowie seiner Verfügbarkeit und möglichst konstanter Qualität, wie sie z.B. durch die Produktion in heterologen Wirten gewährleistet werden können, erfordern die genannten technischen Randbedingungen für Cyanhydrinsynthesen einige spezielle Eigenschaften bei dem jeweiligen Enzym. Zunächst sollte der verwendete Biokatalysator natürlich ein breites Substratspektrum mit hohen Enantioselektivitäten aufweisen, um möglichst universell einsetzbar zu sein. Da die meisten Reaktionen in der Anwesenheit organischer Lösungsmittel durchgeführt werden, ist eine Stabilität gegenüber diesen Chemikalien wichtig. Aufgrund der erwähnten häufigen Nutzung von Rührkesseleln sollte eine industriell eingesetzte HNL auch mechanischen Belastungen in Form von Scherkräften, wie sie innerhalb der Reaktoren durch das Rühren und Pumpen entstehen, widerstehen können [88].

Als besonders problematisch für die Stabilität der Enzyme können sich jedoch vor allem die in den wässrigen Phasen eingestellten niedrigen pH-Werte darstellen. Von den technisch genutzten HNLs zeigt bislang nur die *Pa*HNL (Isoenzym 5) eine hohe Stabilität in Gegenwart niedriger pH-Werte ($< \text{pH } 4$) [35]. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der Stabilität der oben näher beschriebenen HNLs und Möglichkeiten zu ihrer Stabilisierung. Daher werden im Folgenden einige der Faktoren, die bei der Stabilität und Stabilisierung von Enzymen eine Rolle spielen, detaillierter beschrieben.

1.3 Stabilität von Enzymen

1.3.1 Allgemeine Aspekte der Stabilität von Enzymen

Die meisten Proteine sind durch ihre einzigartige, definierte dreidimensionale Struktur charakterisiert. Diese Struktur kann jedoch nur innerhalb bestimmter Umgebungsbedingungen aufrechterhalten werden, die beispielsweise durch die Temperatur, den pH-Wert, die Ionenstärke und den Umgebungsdruck definiert sind [102]. Die Stabilisierung des nativen Zustands eines Proteins erfolgt durch ein fragiles Gleichgewicht nicht-kovalenter Bindungen wie Was-

serstoffbrücken, hydrophober und elektrostatischer Wechselwirkungen sowie Van-der-Waals Interaktionen [103]. Ein Maß für die thermodynamische Stabilität eines Proteins ist die freie Entfaltungsenergie ΔG^0 , die als die Differenz zwischen den freien Energien des gefalteten und ungefalteten Zustandes des jeweiligen Proteins definiert ist [104]:

$$\Delta G^0 = G^0_U - G^0_N$$

Hierbei sind G^0_U durch die freie Energie des ungefalteten und G^0_N durch die freie Energie des gefalteten Zustandes definiert. Damit der native Zustand stabil ist, muss ΔG^0 positiv sein.

Diese energetische Differenz zwischen dem gefalteten, nativen und dem entfaltenen, denaturierten Zustand ist bei den meisten Proteinen mesophiler Organismen eher gering: mit einer Größenordnung von ca. 20 - 60 kJ mol⁻¹ entspricht sie in etwa der Bindungsenergie einiger weniger nicht-kovalenter Bindungen [104, 105]. Dies erklärt, warum eine Veränderung der Umgebungsparameter, z.B. eine Temperaturerhöhung, einen immensen Effekt auf die Struktur eines Proteins haben kann, denn durch die Trennung einiger nicht-kovalenter Bindungen kann das fragile Gleichgewicht, auf dem die Integrität der nativen Struktur beruht, derart destabilisiert werden, dass es zu einer Entfaltung und infolge dessen zu einer Inaktivierung kommt.

Oft besteht die Möglichkeit, dass ein Protein sich nach Wiederherstellung seiner physiologischen Randbedingungen wieder in seine native Konformation zurückfaltet [106]. Ob ein Protein vom denaturierten in seinen nativen Zustand zurückfalten kann, hängt jedoch von seiner Stabilität sowie möglichen auf die Entfaltung folgenden irreversiblen Inaktivierungsmechanismen ab, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben wird.

1.3.2 Kinetische und Thermodynamische Stabilität

Der Begriff „Enzymstabilität“ hat im Laufe der Zeit verschiedene Bedeutungen angenommen und ist deshalb in der Literatur uneinheitlich belegt. Im Allgemeinen wird zwischen thermodynamischer und kinetischer Stabilität unterschieden.

Die **thermodynamische Stabilität** eines Proteins bezieht sich vor allem auf seine Tendenz, reversibel zu entfalten und wird vor allem durch die Differenz der freien Energien des gefalteten und entfaltenen Zustandes determiniert (Abb. 1.12). Je größer diese Differenz ist, desto stabiler ist ein Protein. Die thermodynamische Stabilität kann durch Parameter wie die freie Entfaltungsenergie (ΔG_U), die Entfaltungs-Gleichgewichtskonstante (K_U) oder die Schmelztemperatur (T_M) quantifiziert werden [107]. Experimente zur thermodynamischen Stabilität erfassen in erster Linie den Grad der Entfaltung von Proteinen in Abhängigkeit von denaturie-

renden Einflüssen wie z.B. der Temperatur, nachdem sich ein Gleichgewichtszustand eingependelt hat [104, 107]. Ein Beispiel hierfür ist die Bestimmung der Schmelztemperatur eines Proteins, bei der die Fraktion entfalteter Proteinmoleküle in einer Gesamtpopulation abhängig von der Umgebungstemperatur gemessen wird, beispielsweise mittels CD-Spektroskopie.

Anders als bei der thermodynamischen Stabilität ist die **kinetische Stabilität** eines Proteins vor allem von der Aktivierungsenergie, die für seine Entfaltung notwendig ist, abhängig [108]. Die Stabilisierung des nativen Zustandes bei einem ausschließlich kinetisch stabilen Protein erfolgt in erster Linie durch eine außergewöhnlich hohe energetische Barriere zwischen beiden Faltungszuständen, durch die ein schneller Übergang vom ge- zum entfalteten Zustand effektiv unterbunden wird [109-111]. Je höher die energetische Barriere zwischen nativem und denaturiertem Zustand eines Proteins ist, desto größer ist seine kinetische Stabilität.

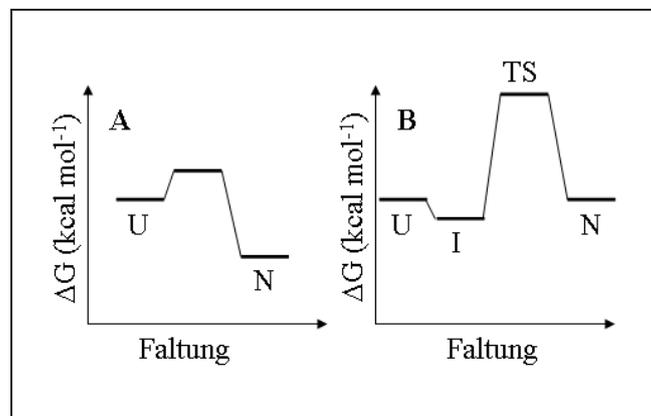


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung freier Energien bei der Faltung thermodynamisch (A) und kinetisch stabiler Proteine (B). Bei dem in (B) dargestellten Energieprofil handelt es sich um ein extremes Beispiel einer α -lytischen Protease zur Verdeutlichung kinetischer Stabilität, bei der nativer und denaturierter Zustand ausschließlich durch die energetische Barriere zwischen ihnen getrennt sind; dies muss jedoch nicht auf andere Proteine zutreffen. U: ungefalteter Zustand, I: Molten-Globule-ähnliches Intermediat, TS: Faltungsintermediat, N: nativer, gefalteter Zustand. Die Stabilisierung des nativen Zustandes bei einem thermodynamisch stabilen Protein erfolgt vor allem durch das globale Energieminimum relativ zum entfalteten Zustand, während bei dem kinetisch stabilen Protein der native Zustand durch eine hohe energetische Barriere zwischen (N) und (I) stabilisiert wird. Nach [110, 111]

Anders als bei thermodynamisch stabilen Proteinen muss die Differenz der freien Energien des entfalteten und des nativen Zustandes bei einem kinetisch stabilen Protein nicht unbedingt groß sein; unter Umständen kann sogar die freie Energie des nativen Zustandes leicht höher liegen als die des entfalteten Enzyms [112].

Ein kinetisch stabiles Protein zeichnet sich somit vor allem durch eine eher langsame Änderung der Proteinkonformation oder der Aktivität aus, nachdem es einer schnellen Änderung der Umgebungsparameter ausgesetzt wurde. Die kinetische Stabilität wird unter anderem durch die zeitabhängige Messung der Aktivität bestimmt und kann in Form der Halbwertszeit

der Aktivität ($\tau_{1/2}$), der apparenten Deaktivierungskonstante ($k_{D \text{ app}}$) oder auch der Total Turnover Number (maximale Zykluszahl, TTN) angegeben werden [107].

Für die technische Anwendung eines Enzyms ist in erster Linie seine kinetische Stabilität, also seine Fähigkeit zur Vermeidung eines Denaturierungsprozesses, von Interesse. Zum einen werden in technischen Prozessen dauerhaft aktive Enzyme benötigt und nicht solche, die zeitweise in einem reversibel entfalteten Zustand vorliegen [103]. Zum anderen können auch bei thermodynamisch stabilen Proteinen unter technischen Bedingungen einer Entfaltung irreversible Inaktivierungsreaktionen folgen [113]; dies kann durch eine Verhinderung der Entfaltung von Anfang an unterbunden werden [107, 113-116].

1.3.3 Allgemeine Aspekte der Inaktivierung von Enzymen

Veränderungen der Umgebungsbedingungen, wie z.B. Erhöhung der Temperatur oder Absenkung des pH-Wertes, können die Inaktivierung eines Enzyms bewirken. Dieser Prozess der Inaktivierung lässt sich durch ein erweitertes Lumry-Eyring-Modell beschreiben [7] (Abb. 1.13). Allgemein bewirkt eine Veränderung der Umgebungsparameter zunächst eine partielle (I) oder vollständige Entfaltung (U) des jeweiligen Enzyms. Generell ist dieser Prozess zwar umkehrbar; allerdings kann es, ausgehend von einem partiell oder komplett entfalteten Zustand, zu irreversiblen Veränderungen wie der Ausbildung von Protein-Aggregaten (A) oder kovalenten Modifikationen (D) kommen, die dementsprechend eine irreversible Inaktivierung bewirken [106].

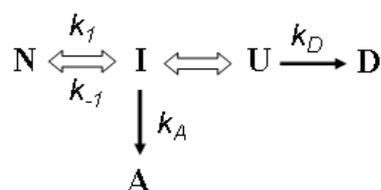


Abbildung 1.13: Erweitertes Lumry-Eyring-Modell zur Inaktivierung von Proteinen. N: Nativer, gefalteter Zustand; I: partiell entfaltetes Intermediat; U: komplett entfalteter Zustand; D: irreversibel deaktiviertes Enzym; A: Proteinaggregat. Während die Entfaltungsprozesse $\text{N} \rightarrow \text{I} \rightarrow \text{U}$ prinzipiell reversibler Natur sind, sind Aggregation ($\text{I} \rightarrow \text{A}$) und chemische Modifikation ($\text{U} \rightarrow \text{D}$) in der Regel irreversibel und verursachen die endgültige Inaktivierung des Enzyms. Nach [7].

Aggregation: Im Gegensatz zur Präzipitation von Proteinen (z.B. mit Ammoniumsulfat) ist die Aggregation ein irreversibler Prozess, der sehr stark von der strukturellen Konformation des jeweiligen Proteins abhängt [106, 117]. Ausgehend von einem zumindest partiell entfalteten Protein kann es, bedingt durch hydrophobe Wechselwirkungen, zu einem Aggregationsprozess kommen. Hierfür müssen die betreffenden Proteine nicht komplett entfaltet sein;

in den meisten Fällen verfügen die aggregierenden Proteine zwar über wenig oder keine Tertiärstruktur mehr, jedoch ist in der Regel noch ein signifikantes Maß an Sekundärstruktur vorhanden [117-119]. Verursacht durch die Entfaltung werden hydrophobe Bereiche des Proteins, die normalerweise im hydrophoben Kern der Proteinstruktur liegen, an der Oberfläche exponiert. Eine intermolekulare Interaktion dieser hydrophoben Bereiche führt dann zur Bildung von Aggregaten. Obwohl hydrophobe Interaktionen zwar normalerweise reversibler Natur sind, sind die hydrophoben Interaktionen bei der Aggregatbildung allein durch ihre Stärke effektiv irreversibel [117-120]; durch Oxidationsprozesse können Aggregate zudem über inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken vernetzt werden, was die Irreversibilität des Prozesses verstärkt [106].

Neben der Aggregation, die vor allem durch hydrophobe Interaktionen hervorgerufen wird, kann es bei partiell oder komplett entfalteten Proteinen auch zu einer kovalenten Veränderung einzelner Aminosäuren kommen, die eine irreversible Inaktivierung bewirken. Bisher wurden verschiedene Mechanismen dokumentiert, die zu solchen kovalenten Modifikationen führen können.

Kovalente Inaktivierungsmechanismen: Komplett oder auch partiell entfaltete Proteine sind einer ganzen Reihe von kovalenten Inaktivierungsmechanismen zugänglich, die in der Regel irreversibler Natur sind und die auch bei Wiederherstellung der nativen Umgebungsbedingungen eine Rückfaltung unterbinden. Hierzu zählen unter anderem die Desamidierung von Glutamin und Asparagin [121], die Spaltung von Peptidbindungen [106], die β -Eliminierung von Disulfidbrücken [103] und die Oxidation von Cystein-Seitenketten [122].

Über zwei der Mechanismen, die eine Entfaltung und damit letztlich auch eine irreversible Denaturierung von Enzymen verursachen können, soll in den folgenden Kapiteln ein kurzer Überblick gegeben werden.

1.3.4 Einfluss der Temperatur auf die Enzymstabilität

Die hitzeinduzierte Denaturierung von Proteinen ist ein seit langem bekanntes und gut dokumentiertes Phänomen. Im Allgemeinen lässt sich die Inaktivierung von Enzymen bei erhöhten Temperaturen wie andere Inaktivierungsphänomene auch durch einen Prozess der Auffaltung, der oft von Aggregation und kovalenten Modifikationen begleitet wird, beschreiben [106].

Thermodynamisch lässt sich die Thermostabilität eines Enzyms durch die Gibbs-Helmholtz-Gleichung erklären:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Solange die freie Energie der Entfaltung ΔG^0 positiv ist, verbleibt das Protein im nativen Zustand. Erhöht man jedoch die Temperatur, wird der Term $-T\Delta S^0$ immer negativer und kann ab einem bestimmten Punkt nicht mehr durch die positive Änderung der Enthalpie ΔH^0 kompensiert werden [104]. Auf der molekularen Ebene bedeutet dies ein Aufbrechen nicht-kovalenter Bindungen, gefolgt von einer Entfaltung des Enzyms [103]. So werden beispielsweise Wasserstoffbrücken bei höheren Temperaturen schwächer [105], während hydrophobe Wechselwirkungen verstärkt werden. Es wird vermutet, dass der Entfaltungsschritt im Allgemeinen eher einen partiellen als einen globalen Charakter aufweist, wobei vor allem an der Oberfläche des Enzyms lokalisierte Teile von der Auffaltung betroffen sind [113].

Weniger bekannt als die hitzeinduzierte Denaturierung ist dagegen die Tatsache, dass auch niedrige Temperaturen sich negativ auf die Stabilität eines Proteins auswirken können [123].

Eine Kälte-induzierte Inaktivierung eines Enzyms kann auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden. Zum einen lässt die Kältedenaturierung eines Proteins durch eine Verringerung des für die Proteinfaltung wichtigen entropischen Effektes erklären: die Faltung von Proteinen im wässrigen Milieu bewirkt durch eine Minimierung der Oberfläche und somit durch eine Verringerung der hochgeordneten Hydrathülle („*Iceberg-Water*“), welche das Protein umschließt, eine Zunahme der Entropie des umgebenden Wassers und somit des gesamten Systems [124]. Dieser Prozess stellt eine der treibenden Kräfte bei der Proteinfaltung dar [124]. Wird jedoch die Wassertemperatur bis knapp oberhalb des Gefrierpunktes abgesenkt, nimmt das Umgebungswasser eine höher geordnete Struktur an [125]. Dadurch wird die Entropiezunahme des Wassers, die durch eine Proteinfaltung bewirkt wird, verringert, was in der Summe eine Destabilisierung der nativen Proteinstruktur bedingen kann [104]. Darüber hinaus kann eine Kälteinaktivierung auf die Veränderung des pH-Wertes und der Ionenstärke in der Mikroumgebung des Enzyms zurückzuführen sein. Durch das Kristallisieren des Wassers während des Einfrierens werden Proteine und Puffersalze stark aufkonzentriert. Dies kann einerseits durch die Veränderung der Ionenstärke eine Dissoziation oligomerer Proteine bewirken. Außerdem kann durch eine Verschiebung der pKa-Werte der Puffersalze der pH-Wert während des Einfrierens rapide sinken, was eine pH-abhängige Denaturierung des Enzyms bewirken kann [106, 123].

1.3.5 Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymstabilität

Die Konzentration der H^+ -Ionen (pH-Wert) ist ein wichtiger Faktor für die Aktivität und Stabilität von Proteinen. Neben dem direkten Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität durch den Protonierungszustand katalytisch wichtiger Aminosäuren eines Enzyms ist auch der Effekt

auf die Stabilität von großer Relevanz, vor allem wenn es um die technische Applikation von Enzymen geht. Die meisten Proteine sind im pH-neutralen Bereich stabil [104]. Eine Veränderung des pH-Wertes, sowohl zu höheren als auch zu niedrigeren pH-Werten, kann eine Inaktivierung des jeweiligen Enzyms verursachen. Eine solche Veränderung des pH-Wertes wirkt sich in erster Linie auf den Protonierungszustand der titrierbaren Gruppen innerhalb eines Proteins aus. Bei diesen handelt es sich um die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure und die basischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin. Zudem sind auch die Seitenketten der Aminosäuren Cystein und Tyrosin und die α -Aminogruppe der jeweils N-terminalen Aminosäure sowie die Carboxygruppe der C-terminalen Aminosäure generell ionisierbar [126].

Ein wichtiges Kriterium für den Protonierungszustand einer titrierbaren Gruppe bei einem bestimmten pH-Wert ist ihr pKa-Wert. Generell weisen saure Aminosäuren bei einem pH oberhalb ihres pKa-Wertes eine negative, basische Aminosäuren bei einem pH unterhalb ihres pKa-Wertes eine positive Ladung auf. Jedoch kann innerhalb eines nativ gefalteten Proteins der pKa-Wert einer titrierbaren Gruppe signifikant von dem eines vergleichbaren, unstrukturierten Modellpeptids abweichen. Bei an der Proteinoberfläche exponierten Gruppen ist diese Abweichung normalerweise eher gering und auf elektrostatische Interaktionen mit anderen geladenen Resten zurückzuführen [127, 128]; liegen die Gruppen jedoch ganz oder teilweise im Inneren des Proteins, kann es zu starken Abweichungen der pKa-Werte kommen, die auf den Born-Effekt, elektrostatische Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen sind [126, 129-131]. Diese Abweichung der pKa-Werte relativ zu vergleichbaren Modellpeptiden besteht allerdings nur so lange, wie das Protein im nativen, gefalteten Zustand vorliegt und eine Stabilisierung durch andere Aminosäuren erfolgen kann; im entfalteten, denaturierten Zustand liegen die pKa-Werte der einzelnen Gruppen nahe denen freier Modellkomponenten.

Diese individuelle Verschiebung von pKa-Werten titrierbarer Gruppen eines nativen Enzyms im Vergleich zum ungefalteten Zustand ist der Hauptgrund für die pH-Abhängigkeit der strukturellen Stabilität eines Proteins [132-134]; die genaue Kenntnis der pKa-Werte im gefalteten und entfalteten Zustand eines Proteins ermöglicht somit eine Quantifizierung seiner pH-Stabilität mit Hilfe der Tanford-Wyman-Verknüpfung [135]:

$$\partial\Delta G^0/\partial\text{pH} = 2.303 RT \Delta Q$$

Hierbei bezeichnet ΔG^0 die Änderung der freien Energie für die Entfaltungsreaktion, R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur in Kelvin und ΔQ die Differenz der an das Protein gebundenen Protonen zwischen dem gefalteten und entfalteten Zustand.

Auf der strukturellen Ebene kann eine pH-abhängige Veränderung des Protonierungszustandes einzelner Gruppen beispielsweise intramolekulare elektrostatische Abstoßungen sowie der Trennung von Salzbrücken auslösen, was die native Struktur eines Proteins destabilisieren kann [136].

Bei einer sauren Denaturierung, also bei einer Absenkung des pH-Wertes relativ zum physiologischen pH-Wert eines Proteins, erfolgt aufgrund der Protonierung titrierbarer Gruppen eine Akkumulation positiver Ladungen durch die Neutralisierung negativ geladener Carboxylgruppen und so der Verlust von Carboxylat-beinhaltenden Salzbrücken und die Protonierung von im Inneren des Proteins liegenden Histidinresten [137-141]. Verantwortlich für den strukturellen Übergang vom nativen in den partiell entfalteten Zustand ist bei der sauren Denaturierung in der Regel die Protonierung einiger weniger Carboxylgruppen und Histidinreste mit ungewöhnlich niedrigen pKa-Werten [133, 134, 142, 143].

Dabei ist neben ihrem pKa-Wert auch die jeweilige Lage einer titrierbaren Gruppe von großer Wichtigkeit: Gruppen, die in ihrer nicht-ionisierten Form im Inneren eines Proteins lokalisiert sind und bei einer pH-Änderung protoniert werden, stellen einen wichtigen Faktor bei der Entfaltung dar [104]. Vor allem die Protonierung von Histidinen nach einer partiellen Entfaltung kann schnell zu einem Verlust der restlichen Struktur führen oder aber eine Rückfaltung in den nativen Zustand erheblich erschweren [143-146].

Der genaue Mechanismus der Entfaltung kann zwischen einzelnen Proteinen variieren [106], häufig kommt es jedoch bei einer pH-induzierten Denaturierung nicht zu einer kompletten Entfaltung wie sie z.B. mit hohen Konzentrationen Guanidiniumhydrochlorid erzielt werden kann. Stattdessen wird eine kompakte, denaturierte Form des Proteins ausgebildet, die ein hohes Maß an Sekundärstruktur beinhaltet und auch als „*Molten Globule*“ bezeichnet wird [132, 147].

1.3.6 Möglichkeiten zur Stabilisierung von Enzymen

Die oftmals geringe Stabilität von Enzymen unter technischen Bedingungen schränkt deren Anwendung in industriellen Prozessen oft ein bzw. verhindert ihre technische Nutzung [107]. Eine Lösung für dieses Stabilitätsproblem kann die Nutzung alternativer Enzyme, z.B. aus extremophilen Organismen, sein. Ein Beispiel hierfür ist die DNA-Polymerase aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus*, durch deren hohe Thermostabilität die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entscheidend verbessert werden konnte [148].

Generell ist es jedoch auch möglich, bereits genutzte Enzyme an die Gegebenheiten eines bestehenden Prozesses anzupassen. Zur Stabilisierung von Enzymen stehen eine Bandbreite

von Methoden zur Verfügung: *Protein Engineering*, chemische Modifikation, Immobilisierung oder der Einsatz von Osmolyten [107]. Einige dieser Strategien sollen hier kurz umrissen werden.

1.3.6.1 Rationales Protein-Design

Für das „Rationale Design“ eines Enzyms sind in erster Linie Informationen über die dreidimensionale Struktur des jeweiligen Enzyms notwendig. Idealerweise handelt es sich hierbei um experimentell bestimmte Kristall- oder NMR-Strukturen, unter Umständen kann aber auch ein auf der Basis homologer Strukturen erstelltes Modell ausreichen. Im Zusammenhang mit der Kenntnis des katalytischen Mechanismus können beim rationalen Design eine Reihe von Enzym-Eigenschaften wie das Substratspektrum [69], die Enantioselektivität [149] und auch die Stabilität [113] verändert werden. Für eine Verbesserung der Stabilität sind neben Kenntnissen der Struktur und des katalytischen Mechanismus zusätzlich Informationen zum Inaktivierungsmechanismus notwendig [107].

Bislang existieren jedoch keine allgemeingültigen Regeln, nach denen ein Protein thermo- oder pH-stabiler gestaltet werden kann [108]; vielmehr existiert, wie auch in der Natur, eine ganze Bandbreite individueller Stabilisierungsmöglichkeiten für verschiedene Proteine.

So kann eine Thermostabilisierung beispielsweise durch eine Absenkung der Entfaltungsentropie [115, 150-152], die Stabilisierung von α -Helices [153], das Einbringen einzelner Salzbrücken [154-156] oder von Netzwerken ionischer Wechselwirkungen [157], eine Oligomerisierung sowie die Verankerung flexibler Proteinteile erfolgen [103, 158-160].

Im Vergleich zur thermischen Stabilität von Enzymen gibt es nur wenig Literatur zur pH-Stabilität und Stabilisierung. Bislang sind vor allem zwei Möglichkeiten zu Stabilisierung von Enzymen bei saurem pH bekannt.

Austausch von Histidinresten: Bei Histidinresten mit ungewöhnlich niedrigen oder hohen pKa-Werten wird häufig die deprotonierte bzw. die protonierte Form durch Interaktionen mit den Seitenketten anderer Aminosäuren stabilisiert [143]. Meist sind diese Histidinreste im Inneren einer Struktur lokalisiert, daher kann z.B. eine Protonierung dieser Gruppen nach anfänglicher partieller Entfaltung zu einer kompletten Auflösung der Struktur führen. Durch Austausch solcher Histidinreste, oder auch von mit ihnen interagierenden Aminosäuren, kann die Stabilität eines Proteins bei extrem sauren pH-Werten erhöht werden [143, 144, 161].

Veränderung von Salzbrücken: Da Salzbrücken von ionisierbaren Resten gebildet werden, können sich Veränderungen des pH-Wertes durch Titration dieser Gruppen auf die Bildung

oder Trennung dieser Bindungen auswirken. Die Verlagerung von Salzbrücken kann unter Umständen eine verbesserte pH-Stabilität erzielen. Vorteilhaft kann beispielsweise die Bildung von Salzbrücken zwischen auch in der Primärstruktur benachbarten Resten sein, da die Wahrscheinlichkeit, dass diese in einem kinetischen Übergangszustand miteinander interagieren und somit die Energiebarriere zwischen nativem Zustand und *Molten-Globule*-Intermediat erhöhen, größer ist [109]. Aber auch die Entfernung von Salzbrücken zwischen den einzelnen Untereinheiten eines Proteins kann zur Stabilisierung eines Proteins bei niedrigem pH-Wert beitragen [162].

1.3.6.2 Gerichtete Evolution und semi-rationale Ansätze

Zwar ist rationales Design von Proteinen eine effektive Methode, Proteine hinsichtlich ihrer biochemischen Charakteristika zu verbessern, jedoch erfordert eine Stabilitätsoptimierung auf diesem Weg einerseits die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Enzyms und zum anderen Informationen über den jeweiligen Inaktivierungsmechanismus. Obwohl Strukturinformationen von Enzymen heutzutage verhältnismäßig einfach zugänglich sind, ist die Aufklärung der molekularen Ursachen eines Inaktivierungsprozesses zumeist schwierig, insbesondere, wenn mehrere Aminosäurereste beteiligt sind. Vor diesem Hintergrund kann auch die Nutzung anderer Herangehensweisen sinnvoll sein.

Eine Alternative zum rationalen Proteindesign ist die gerichtete Evolution. Bei dieser Strategie wird das Prinzip der natürlichen Evolution, bestehend aus Zufallsmutagenese und Selektion der am besten angepassten Variante, im Labor nachgeahmt. Um die Stabilität oder andere Charakteristika eines Enzyms zu verändern bedarf es dabei prinzipiell keinerlei Informationen bezüglich der Struktur, des katalytischen Mechanismus oder des Modus der Inaktivierung; vielmehr werden zufällige Mutationen in dem für das betreffende Enzym kodierenden Gen eingefügt und die dabei entstehenden Varianten auf verbesserte Eigenschaften untersucht („Screening“/Selektion).

Zur Erzeugung von Mutantenbanken mit einer möglichst großen genetischen Diversität wurde eine ganze Reihe verschiedener Methoden entwickelt, die sich generell in sequentielle (nicht-rekombinative) und rekombinative Verfahren unterteilen lassen [163]. Bei den **sequentiellen Methoden** werden innerhalb einer gegebenen Gensequenz Punktmutationen (Basenaustausche, Insertionen, Deletionen) erzeugt. Bei den dafür genutzten Verfahren handelt es sich um die fehlerhafte PCR („error-prone“ PCR, epPCR) oder davon abgeleitete Methoden wie z.B. „Sequence Saturation Mutagenesis“ (SeSaM) [164-166]. Viele dieser Methoden basieren letztlich auf einer Erhöhung der intrinsischen Fehlerrate der Taq-Polymerase, wodurch unge-

richtet Punktmutationen in ein zu amplifizierendes Gen eingefügt werden. Auf diese Weise wird bei jeder Variante eines Proteins eine definierte Anzahl an Aminosäureaustauschen eingeführt. Ein großer Nachteil der sequentiellen Methoden besteht vor allem darin, dass meist der verfügbare Sequenzraum nicht voll ausgeschöpft werden kann [167, 168]. Dies bedeutet konkret, dass aufgrund der Belegung des genetischen Codes sowie in Abhängigkeit der gewählten Mutagenesemethode eine Aminosäure nicht mit statistischer Gleichförmigkeit gegen alle 19 anderen ausgetauscht wird, sondern im Falle der epPCR beispielsweise nur gegen durchschnittlich 5,7 alternative Aminosäuren [167, 168]

Anders als bei den sequentiellen Methoden, bei denen einzelne Punktmutationen in einem bestimmten Gen eingefügt werden, basieren die **rekombinativen Methoden** wie das DNA-Shuffling auf der Erzeugung von Hybridgenen [169, 170]. Hierbei werden in Abhängigkeit der angewendeten Methode sowohl homologe als auch nicht-homologe DNA-Sequenzen zunächst fragmentiert und nach anschließender Durchmischung miteinander verknüpft.

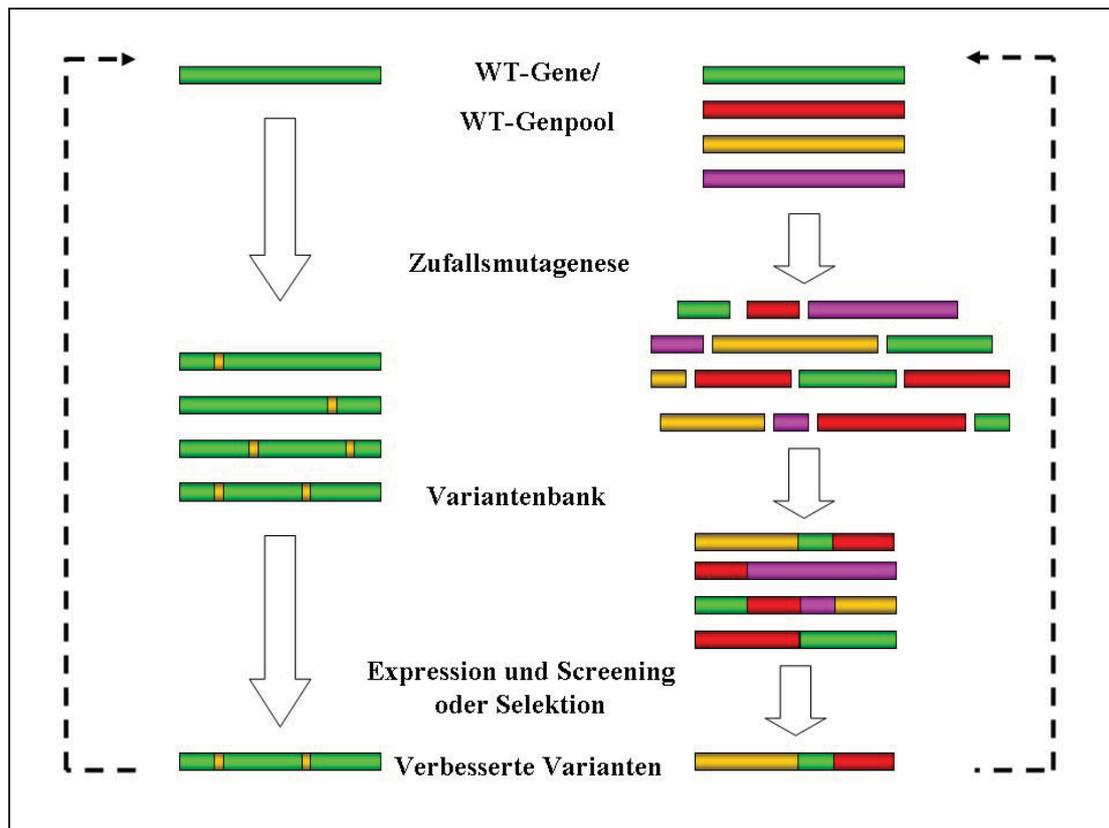


Abbildung 1.14: Prinzip der gerichteten Evolution. Links: Erzeugung genetischer Diversität durch sequentielle Methoden, z.B. epPCR; rechts: genetische Diversität durch rekombinative Methoden, z.B. DNA-Shuffling. Nach der Erzeugung einer Mutantenbank werden die Varianten des jeweiligen Enzyms exprimiert und im anschließenden Screening auf ihre jeweiligen Eigenschaften untersucht. Nach der Isolation verbesserter Varianten können diese direkt charakterisiert und verwendet werden, oder aber sie können weitere Zyklen von Mutagenese und Screening durchlaufen, bis sie optimale Eigenschaften aufweisen.

In der ersten Zeit waren die rekombinativen Mutagenesemethoden auf ein Mindestmaß an Homologie bei den verwendeten Ausgangsgenen angewiesen. Inzwischen existiert jedoch auch eine ganze Reihe von Methoden, die auf eine Homologie der Ausgangssequenzen nicht angewiesen sind, wie z.B. ITCHY (*Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes*), SHIPREC (*Sequence Homology Independent Protein Recombination*) oder SISDC (*Sequence-Independent Site-Directed Mutagenesis*) [171-173].

Eine dritte Möglichkeit der Enzymoptimierung, bei der Zufallsmutagenese eine Rolle spielt, ist der **semi-rationale Ansatz**. Eine solche Strategie unterscheidet sich dadurch von den komplett randomisierten sequentiellen und rekombinativen Methoden, dass ein gewisses Maß an Information bezüglich der Struktur und/oder des Inaktivierungsmechanismus notwendig ist. Durch diese Informationen kann der zu modifizierende Bereich eines Enzyms stark eingegrenzt werden, so dass die Anzahl der zu testenden Mutanten auf ein Minimum reduziert werden kann. Im einfachsten Fall kann es sich bei einem semi-rationalen Ansatz um die Sättigungsmutagenese einiger weniger Aminosäuren handeln. Bei einer solchen Sättigungsmutagenese wird an einer bestimmten Position eines Proteins die jeweils vorhandene Aminosäure gegen alle 19 anderen ausgetauscht. Die Auswahl der zu mutagenisierenden Bereiche kann anhand von Proteinstrukturen, Homologievergleichen oder „Scouting“-Experimenten erfolgen [174], was im Folgenden näher erläutert wird.

Mit Hilfe einer **Kristallstruktur** oder auch eines geeigneten Modells können definierte zu verändernde Aminosäuren bestimmt werden, ohne jedoch den konkreten Austausch vorherzusagen. Diese Strategie wird häufig zur Veränderung von Eigenschaften wie der Substratspezifität genutzt [175]. Ein Beispiel für die semi-rationale Erweiterung des Substratspektrums eines Enzyms ist das so genannte CASTing (*Combinatorial Active-Site Saturation Test*), bei dem auf der Basis einer Kristallstruktur Gruppen von einigen wenigen Aminosäuren in der direkten Umgebung des aktiven Zentrums ausgewählt und einer Sättigungsmutagenese unterzogen werden, so dass nur relativ kleine Mutantenbanken auf ihr verändertes Substratspektrum durchmustert werden müssen [176]. Positive Hits aus diesen Banken können dann auch in einem weiteren Schritt miteinander kombiniert werden, um weitere Verbesserungen zu erzielen [177].

Neben der räumlichen Anordnung der Aminosäuren kann dabei auch der B-Faktor genutzt werden, um geeignete Positionen für eine Sättigungsmutagenese zu finden, z.B. um die Thermostabilität eines Enzyms zu verbessern [178].

Bei den **Homologie-basierten Konzepten** werden die zu verändernden Positionen anhand direkter Sequenzvergleiche zwischen ähnlichen Proteinen oder durch phylogenetische Analy-

sen bestimmt [174, 179]. Beispielsweise werden beim Consensus-Konzept durch Abgleich einzelner Aminosäuresequenzen sequenzhomologer Enzyme mit der von ihnen erstellten Consensus-Sequenz mögliche zu verändernde Positionen benannt. Die Erzeugung stabilerer Varianten kann dadurch erfolgen, dass von der Consensus-Sequenz abweichende Aminosäuren zu den jeweiligen Consensus-Resten hin verändert werden [180].

Im Falle der „**Scouting**“-Strategie werden zu verändernde Aminosäuren anhand von vorausgehenden Zufallsmutagenese-Experimenten identifiziert. Durch die Durchmusterung einer kleinen Bank von Zufallsmutanten können Positionen identifiziert werden, die einen Einfluss auf die gewünschte Enzymeigenschaft im positiven oder negativen Sinne haben. Diese Positionen können dann im nächsten Schritt einzeln oder konzertiert einer Sättigungsmutagenese unterzogen werden [175, 181, 182].

Neben der Erstellung von qualitativ hochwertigen Mutantenbanken ist bei der gerichteten Evolution die Durchmusterung der erstellten Mutanten von wesentlicher Bedeutung.

Hierbei existieren grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten, Enzymvarianten mit den gewünschten Eigenschaften zu identifizieren. Während bei einem Screening generell alle exprimierbaren Varianten eines Enzyms auf ihre jeweilige gewünschte Eigenschaft, z.B. verbesserte Aktivität oder erhöhte Stabilität, überprüft werden, werden bei Selektionsverfahren inaktive Varianten systematisch ausgeschlossen und aktive Varianten akkumuliert.

Bei einem **Screening** können enzymatische Aktivitäten auf der Basis von Agar-Platten-Tests [183, 184], Mikrotiterplatten-Tests [183, 185-187], Filter-Tests [188] oder auch mit Mikrofluid-Chips [189] bestimmt werden; die Größenordnung der dabei durchmusterten Banken liegt derzeit bei 10^3 - 10^6 Varianten [190]. Bei neueren Fluoreszenz-basierten Screening-Methoden (*Fluorescence-Activated Cell-Sorting*, FACS) können aber auch deutlich höhere Klonzahlen von bis zu 10^7 Klonen pro Stunde durchmustert werden [191].

Ein Vorteil von Aktivitäts-Screeningsystemen ist, dass in der Regel auch quantitative Aussagen bezüglich der Aktivität oder Stabilität einer Variante möglich sind. Zudem sind inzwischen viele verschiedene enzymatische Reaktionen über colorimetrische oder fluorimetrische Testsysteme zugänglich und können verhältnismäßig schnell und einfach getestet werden, meist im Rahmen von Mikrotiterplatten-basierten Assays [192]. Die Nachteile eines Screenings bestehen zum einen darin, dass alle Mutanten einer Bank getestet werden müssen, ungeachtet dessen ob sie aktiv sind oder nicht. Diese Fraktion der inaktiven Varianten einer Bank liegt normalerweise bei 50 – 80% [193]. Zum anderen ist die Anzahl der Varianten, die bei einem Screening getestet werden können, durch den Aufwand an Arbeit und Material begrenzt, wodurch die genetische Vielfalt einer Mutantenbank in der Regel nicht voll ausge-

schöpft werden kann. Zudem kann eine gegenüber dem Wildtyp-Enzym positiv wie auch negativ veränderte Aktivität auch immer auf ein verändertes Expressionsverhalten der rekombinanten Zellen zurückzuführen sein, was jedoch bei einem reinen Aktivitäts-basierten Screening nicht von einer veränderten Eigenschaft des Proteins unterschieden werden kann [113].

Anders als beim Screening werden bei **Selektionssystemen** nicht alle produzierten Varianten eines Enzyms individuell auf ihre Eigenschaften überprüft, sondern es werden gezielt Bedingungen geschaffen, die ausschließlich das Überleben von Varianten mit den gewünschten Eigenschaften sichern. Auf diese Weise werden inaktive oder instabile Varianten von vorneherein aussortiert, was die maximale Größe der Mutantenbanken auf 10^{10} bis 10^{13} Varianten erhöht [163, 194, 195]. Nachteilig kann bei einer Selektion die teilweise sehr aufwändige Etablierung eines Selektionssystems sein, beispielsweise durch die Herstellung auxotropher Mutanten für die genetische Komplementation [196-198].

In der Literatur sind zahlreiche Beispiele dokumentiert, bei denen mittels gerichteter Evolution oder semi-rationaler Ansätze die Stabilität von Enzymen verbessert werden konnte [107, 108, 199]. Die meisten dieser Studien zielten auf eine Verbesserung der Thermostabilität der jeweiligen Enzyme ab, während andere denaturierende Faktoren eher wenig Beachtung fanden [108]. Beispielsweise wurde eine Stabilisierung von Enzymen bei extremen pH-Werten durch gerichtete Evolution bislang nur in wenigen Fällen beschrieben [200-204].

1.3.6.3 Stabilisierung durch chemische Additive

Stabilisierungsstrategien wie rationales Design oder gerichtete Evolution haben trotz aller Unterschiede letztlich gemein, dass eine Stabilisierung durch eine strukturelle Veränderung des Enzyms, bedingt durch eine Veränderung der Aminosäuresequenz, erzielt wird. Neben der genetischen Veränderung von Enzymen wurde in den vergangenen Jahrzehnten eine Vielfalt an nicht-biologischen Methoden entwickelt, die eine posttranslationale Stabilisierung von Enzymen erlauben. Diese Methoden lassen sich in drei verschiedene Kategorien unterteilen: Immobilisierung, kovalente chemische Modifizierung und Stabilisierung durch Cosolventien. [107]

Letztere werden auch als kompatible Solute, Osmolyte oder einfach als Additive bezeichnet. In der Regel handelt es sich hierbei um Chemikalien mit verhältnismäßig niedrigem Molekulargewicht, wie z.B. einige Zucker oder Aminosäuren [205-207].

Der stabilisierende Effekt solcher niedermolekularen Substanzen beruht vor allem auf ihren bevorzugten Interaktionen mit den einzelnen Gruppen eines Proteins, sowohl im nativen als auch im entfalteten Zustand [205]. Ein Additiv wirkt stabilisierend auf ein Protein, wenn es

das chemische Gleichgewicht zwischen nativem und entfaltetem Zustand zugunsten des nativen Zustandes beeinflusst. Die meisten stabilisierenden Additive werden von der Oberfläche eines nativen Proteins ausgeschlossen, während denaturierende Agenzien wie z.B. Guanidiniumhydrochlorid bevorzugt an die Proteinoberfläche gebunden werden [205]. Ein Ausschluss bewirkt, dass sich in einer Protein und Additiv beinhaltenden wässrigen Lösung eine Hydrathülle um das Protein bildet, die der in einer Lösung ohne Additiv gleicht. Dieser Vorgang der Mikrophasenseparation wird auch als präferentielle Hydratisierung bezeichnet [205]. Dieser thermodynamisch eher ungünstige Ausschluss von Cosolvens-Molekülen von der Proteinoberfläche bedarf eines Energieaufwands, der als freie Energie des Cosolvensausschlusses bezeichnet wird. Eine Stabilisierung kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass auch im entfalteten Zustand das Cosolvens von der Proteinoberfläche ausgeschlossen bleibt. Durch die im entfalteten Zustand vergrößerte Oberfläche vergrößert sich damit auch die freie Energie des Cosolvensausschlusses, so dass letztlich der ungefaltete Zustand thermodynamisch ungünstiger ist als der native [207]. Neben anderen Möglichkeiten kann das chemische Gleichgewicht auf diese Art in Richtung des nativen Proteins verschoben werden, letztlich kommt es netto jedoch nur auf den energetischen Gesamtunterschied zwischen beiden Endpunkten an [205]. Bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossene Additive lassen sich in sechs Gruppen unterteilen: Zucker (z.B. Saccharose, Glucose) [207-210], Glycerol [211], Polyole (z.B. Sorbitol, Mannitol) [212], Salze (z.B. $MgSO_4$) [213], Polyethylenglycole [205] und 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD), sowie Aminosäuren, Aminosäuresalze und Methylamine (z.B. Glycin) [206, 214].

Der Vorteil der Enzymstabilisierung durch niedermolekulare Additive ist, dass es sich bei diesen in der Regel um relativ kostengünstige Chemikalien handelt, und dass diese ohne Kenntnis der Enzymstruktur und möglicher Inaktivierungsmechanismen verwendet werden können. Nachteilig ist zum einen, dass diese Additive normalerweise in hohen Konzentration eingesetzt werden müssen, um einen stabilisierenden Effekt zu erzielen, zum anderen müssen sie in technischen Prozessen bei der Produktaufarbeitung vom jeweiligen Produkt wieder getrennt werden [107].

1.3.6.4 Stabilisierung durch Immobilisierung

Eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung eines Enzyms ist die Immobilisierung. Generell lassen sich drei verschiedene Arten der Immobilisierung unterscheiden: Enzyme können an ein Trägermaterial gekoppelt, miteinander quervernetzt oder in eine Matrix einkapselt werden [107, 215-217].

Die **Kopplung der Proteine an ein Trägermaterial** kann entweder kovalent oder durch Adsorption erfolgen, z.B. über hydrophobe oder polare Wechselwirkungen. Das betreffende Enzym kann sowohl auf der externen als auch auf der internen Oberfläche des Trägers lokalisiert sein. Bei den Trägermaterialien kann zwischen synthetischen organischen Polymeren (z.B. Eupergit®) [218], Biopolymeren (z.B. Zellulose) [219], Hydrogelen (z.B. LentiKats) [220], Anorganischen Trägern (z.B. Silica-Partikel) [221] und so genannten „Smart Polymers“ (z.B. polyNIPAM) [222], die auf Veränderungen der Umgebungsbedingungen mit Konformationsänderungen reagieren, unterschieden werden. Nachteil dieser Strategie, sowie auch der Einkapselung in eine Matrix ist, dass die Produktivität eines Träger-gebundenen Enzyms sinkt, da durch das Trägermaterial ein hoher Prozentsatz (bis zu 99% des Gewichtes) nicht-katalytischer Masse in die Enzympräparation eingebracht wird [216].

Anders als bei der Nutzung eines Trägermaterials wird bei der **Einkapselung von Biokatalysatoren** in eine Matrix das zu immobilisierende Enzym mit Vorläufermolekülen des Matrix-Polymers vermischt und anschließend eine Polymerisierung oder auch Quervernetzung initiiert, so dass sich das Enzym anschließend in den Hohlräumen dieser Matrix befindet [216]. Auch hier gibt es eine Vielzahl zur Verfügung stehender Materialien, mit denen ein Protein eingekapselt werden kann, z.B. Polyacrylamid oder Alginat [223].

Die dritte Möglichkeit der Immobilisierung, die **Quervernetzung von Proteinen**, ist im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Strategien nicht auf ein Trägermaterial angewiesen. Es können entweder gelöste Enzyme miteinander verbunden werden (*Cross-linked Enzymes*, CLEs) [224], Enzym-Aggregate (*Cross-linked Enzyme Aggregates*, CLEAs) [215] oder auch kristallisierte Enzyme (*Cross-linked Enzyme Crystals*, CLECs) [225]. Ein häufig genutztes Vernetzungsgagens ist Glutaraldehyd, über das reaktive Aminogruppen an der Proteinoberfläche miteinander verknüpft werden [217]. Während CLEs aufgrund ihrer geringen mechanischen Stabilität sowie einer teilweise niedrigen Aktivität für technische Anwendungen eher uninteressant sind, werden sowohl CLEAs als auch CLECs heutzutage kommerziell vertrieben und im technischen Maßstab eingesetzt [216, 226, 227]. Da die Kristallisierung eines Enzyms einerseits einen hohen Reinheitsgrad des jeweiligen Enzyms benötigt und andererseits einen hohen Aufwand mit sich führen kann, werden die technisch einfacher herzustellenden CLEAs derzeit als die bessere Alternative angesehen [228].

Neben einer oft erhöhten Stabilität gegenüber verschiedenen denaturierenden Bedingungen bestehen weitere Vorteile von immobilisierten Enzymen neben der einfachen Handhabung in der Wiederverwendbarkeit und der Möglichkeit zur einfachen Abtrennung vom Reaktionsmedium [216, 217, 229]. Nachteilig können sich, vor allem bei CLEAs oder CLECs, Limitie-

rungen beim Massentransfer sowie die vergleichsweise hohen Kosten auf ihre Wirtschaftlichkeit auswirken [229]. Zudem kann es durch die Immobilisierung zu einer Veränderung verschiedener Proteincharakteristika kommen, wie z.B. dem allgemeinen Aktivitätslevel oder der pH-Abhängigkeit der Aktivität, die sich im Einzelfall positiv oder negativ auswirken können [229].

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Hydroxynitril-Lyasen können mit hoher Enantioselektivität die Umsetzung von Aldehyden und Ketonen zu den entsprechenden Cyanhydrinen katalysieren. Diese stellen wertvolle Bausteine in der organischen Synthese dar.

Ein generelles Problem bei der Synthese dieser Stoffe ist neben der hohen Toxizität von Substraten und Produkten auch die Kontrolle der basenkatalysierten nicht-enantioselektiven Addition von HCN an die jeweiligen Carbonylverbindungen sowie die Stabilität der Cyanhydrine. Durch eine Absenkung des pH-Wertes im Reaktionsmedium oder durch die Nutzung wasserfreier Systeme können diese Probleme umgangen werden, jedoch erfordert dies in der Regel eine Stabilisierung der genutzten Enzyme. Aufgrund der technischen Gegebenheiten laufen heute die meisten Hydrocyanierungsprozesse in relativ simplen Rührkesselreaktoren ab, wobei in der Regel Zweiphasensysteme bestehend aus einem organischen Lösungsmittel wie z.B. Diisopropylethylether (DIPE) und einem Puffer verwendet werden. Trotz der Vorteile anderer Enzympräparationen werden dabei meistens wässrige Lösungen der Enzyme genutzt. Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene HNLs im Hinblick auf ihre Tauglichkeit für technische Prozesse untersucht werden. Das erste Enzym, die HNL aus *Manihot esculenta*, ist seit Anfang der 1980er Jahre bekannt und wird bereits kommerziell vertrieben und auch zur industriellen Synthese von Cyanhydrinen genutzt. Daten bezüglich ihrer Stabilität bei niedrigen pH-Werten und Temperaturen wurden bislang noch nicht veröffentlicht. Zudem beruhten Versuche zur Stabilisierung dieses Enzyms immer auf diversen Immobilisierungsstrategien.

Das zweite Enzym, die HNL aus *Arabidopsis thaliana*, wurde erst vor kurzem kloniert und ersten Untersuchungen hinsichtlich des Substratspektrums sowie der Enantioselektivität unterzogen. Außer einigen wenigen Daten zum Substratspektrum und zur Enantioselektivität wurden deshalb bislang noch keine biochemischen Charakteristika, wie unter anderem auch zur Stabilität und Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes, erfasst.

Das dritte Enzym, die HNL aus *Linum usitatissimum*, ist zwar seit dem Ende der 1980er Jahre bekannt, jedoch wurden bislang nur einige wenige Studien zu diesem Enzym veröffentlicht. Als problematisch erwies sich bei diesem Enzym neben dem eingeschränkten Substratspektrum auch die relativ niedrige Expressionsrate in heterologen Wirtsorganismen.

In allen drei Fällen sollten die Enzyme zunächst auf ihre Stabilität und Aktivität in den für die technische Anwendung interessanten pH- und Temperaturbereichen untersucht werden, um eine allgemeine Aussage über deren Eignung machen zu können. Neben der Aktivität und Stabilität in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Temperatur standen ferner bei den zu den α/β -Hydrolasen zählenden Enzymen *MeHNL* und *AtHNL* eine Untersuchung der pH-abhängigen Inaktivierungsmechanismen sowie die Möglichkeit zur Stabilisierung im sauren pH-Bereich im Vordergrund. Bei der *LuHNL* hingegen sollte zusätzlich versucht werden, das auf aliphatische Aldehyde und Ketone beschränkte Substratspektrum unter Beibehaltung der Enantioselektivität zu erweitern, um das technische Potential dieses Enzyms zu vergrößern.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien & Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.A.-Qualität von den folgenden Firmen bezogen:

Antibiotika: Gerbu (Gaiberg), Serva (Heidelberg)

Chemikalien: Fluka (Sternheim), Gerbu (Gaiberg), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Mandelonitril in p.A.-Qualität wurde freundlicherweise von Archimica/Clariant (Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

Enzyme: Restriktionsendonukleasen und T4-DNA-Ligase wurden von Fermentas (St. Leon-Roth) und Roche (Mannheim) bezogen, Calf Intestine Alkaline Phosphatase und T4-Kinase von Fermentas (St. Leon-Roth). *Taq*- und *Pfu*-Polymerase wurden ebenfalls bei Fermentas (St. Leon-Roth) erworben, Turbo*Pfu*-Polymerase bei Stratagene (Heidelberg), Phusion-Polymerase bei Finnzymes (Espoo, Finnland) und Goldstar*Taq*-Polymerase bei Eurogentec (Seraing, Belgien).

Die HNL aus *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) wurde freundlicherweise von Jennifer Andexer zur Verfügung gestellt.

Medienkomponenten: Fluka (Sternheim), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.1.2 Geräte & Software

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Geräte und Programme. Alle nicht aufgeführten Geräte entsprechen den üblichen Labor-Standards.

Gerät	Hersteller
Analytik	
Absorptionsküvetten	Hellma (Jena) QS 1 mm, 2 mm, 10 mm Schichtdicke
Absorptionsphotometer	Eppendorf (Hamburg) BioPhotometer
CD-Spektrometer	Molecular Devices (Sunnyvale, USA) Spectramax Plus Jasco (Gross-Umstadt) Spectropolarimeter J-810 mit Thermoelement Jasco (Seelbach) CDF-426S und Julabo F-200
Fluoreszenzphotometer	Shimadzu (Duisburg) RF-1501 mit Thermoelement Julabo F-25 und Filterelement UG1 (Schott , Mainz)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen) Research RC 210P
HPLC	Shimadzu (Duisburg) RF-LC-10 Ai
HPLC-Säule	TOSOH Bioscience (Stuttgart) TSKgel G2000SWXL

Gerät (Fortsetzung)	Hersteller
pH-Elektrode	Gamma Analysen Technik GmbH (Bremerhaven) GAT Ionode IJ44
pH-Meter	Knick (Berlin) Labor-pH-Meter 763 Multi-Calimatic
Enzymaufarbeitung	
FPLC	Amersham Biosciences (Freiburg) ÄKTA Purifier 10/100 Amersham Biosciences (Freiburg) ÄKTA Basic
AEC	Amersham Biosciences (Freiburg) HiLoad Q-Sepharose FF
IMAC	Qiagen (Hilden) NiNTA Superflow
SEC	Amersham Biosciences (Freiburg) Sephadex G-25 Amersham Biosciences (Freiburg) Superdex G200 HiLoad 16/60 Amersham Biosciences (Freiburg) PD-10 Desalting Columns
Fraktionssammler	Amersham Biosciences (Freiburg)
Lyophilisator	Steris (Müllheim) Lyovac GT2
Ultrafiltrationszelle	Amicon (Schwalbach) Rührzelle 8010, 8050
Gelelektrophorese	
Elektrophoreseapparaturen	BioRad (München) Mini-Protean GelkammerII™ Eurogentec (Köln) I-Mupid J
Spannungsgeräte	BioRad (München) Power Pac 300
Videodokumentationsanlage	Stratagene (Amsterdam, NL) Eagleeye Rainbow (Costa Mesa, USA) TV Zoom Lens S6X11-II
Molekularbiologische Geräte	
Elektroporations-Apparatur	Biorad (München) MicroPulser
PCR-Cycler	Eppendorf (Hamburg) Mastercycler Gradient
Thermoblock	Eppendorf (Hamburg) Thermomixer Comfort
Roboter	
Mikrotiterplatten Dispenser	BioTek (Bad Friedrichshall) µFill Microplate Dispenser
Pickroboter	Genetix (München) QPix
Software & Internet	
BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool)	NCBI (National Center for Biotechnology Information) [230] http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ChemDraw 7.0	CambridgeSoft (Cambridge, USA)
Clone Manager 7	Scientific & Educational Software (Cary, USA)
DoubleDigest™	Fermentas (St. Leon-Roth) http://www.fermentas.com
GCUA (Graphical Codon Usage Analyser)	http://gcu.schoedl.de [231]
Gel Jet Imager Plus	Intas (Göttingen)
MolMol 2K.2	http://hugin.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/index.html [232]

Gerät (Fortsetzung)	Hersteller
MAP (Mutagenesis Assistant Program)	http://map.iu-bremen.de/MAP.html [168]
ORIGIN 7G pKD-Server	Microcal Software Inc. (Northampton, USA) http://peat.ucd.ie/cgi-bin/pKa_Design/server_start.cgi [233]
Plasmid Map Enhancer	Scientific & Educational Software (Cary, USA)
Pymol 0.99rc6	DeLano Scientific LLC
SOFTmax Pro 3.1.2	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
UNICORN 5.10	
Zellanzucht und -aufschluss	
Brutschüttler	Infors/HT Biotech (Einsbach)
Fermenter	Infors AG (Einsbach) Techfors I
Mikrotiterplattenschüttler	Edmund Bühler GmbH (Hechingen) TiMix 5
Reagenzglas-Rotator	Carl Roth (Karlsruhe) SB2 mit Aufsatz für 63 Kultur- röhrchen
Ultraschallprozessor	Dr. Hielscher GmbH (Stuttgart) UP200S
Ultraschallsonotroden	Dr. Hielscher GmbH (Stuttgart) S1, S3, S14D
Zentrifugation	
Zentrifugen	DuPont Sorvall (Langenselbold) RC5B, RC5B Plus Eppendorf (Hamburg) 5810R Hereaus Biofuge Pico Hettich (Tuttlingen) Rotina 35R
Rotoren	DuPont Sorvall (Langenselbold)SS-34, SLC-4000, GSA, GS3 Eppendorf (Hamburg) A-4-62

2.1.3 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>F-hsdS gal clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1</i>	[234]
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>ΔrecA1endA1gyrA96thi1hsdR17 supE44relA1lac[F'proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tc^R)]</i>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> MeHNL-C81A	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) T1R mit Plasmid pQE4-MeHNL-C81A	[59], Codexis

2.1.4 Verwendete Plasmide

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Plasmide.

Plasmid	Genotyp	Referenz/ Bezugsquelle
pUC19	ColEI P _{lac} lacZ' Amp ^r	[235]
pET22b	ColEI lacZ' Amp ^R P _{T7} P _{lac}	Novagen, Madison, USA
pET28a	ColEI lacZ' Kan ^R P _{T7} P _{lac}	Novagen, Madison, USA
pSOxIV	pET24a mit <i>Me-hnl</i> -Gen, über <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> kloniert	Jülich Chiral Solutions/ Codexis
pROx	pET24 mit <i>Lu-hnl</i> -Gen, über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> kloniert	Jülich Chiral Solutions/ Codexis
pMeHNL	pET28a mit <i>Me-hnl</i> -Gen, über <i>XbaI</i> und <i>XhoI</i> kloniert	Diese Arbeit
pLuHNL	pET28a mit <i>Lu-hnl</i> -Gen, über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> kloniert	Diese Arbeit
pLuHNL-T65A	pET28a mit <i>Lu-hnl</i> -T65A-Gen, über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> kloniert	Diese Arbeit
pLuHNL-K162L	pET28a mit <i>Lu-hnl</i> -K162L-Gen, über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> kloniert	Diese Arbeit
pLuHNL-E323V	pET28a mit <i>Lu-hnl</i> -E323V-Gen, über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> kloniert	Diese Arbeit
pLuHNL-ActiveSite-Ala	pET28a mit <i>Lu-hnl</i> -Active-Site-Ala-Gen, über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> kloniert	Diese Arbeit

2.1.5 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Scientific (Ulm) in lyophilisierter Form bezogen und sind im Detail in Tabelle 2.4 aufgeführt. Zur Verwendung wurden die Oligonukleotide in einer Konzentration von 100 pmol/μl in A. dest. gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide. Besondere Merkmale der einzelnen Sequenzen sind entsprechend der Beschreibung in der rechten Spalte gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Merkmale
MeHNL-Up	ATATTCTAGAAATAATTTTGTT-TA ACTTTAAGAAGGAGATATAC-CAT GGTAACTGCACATTTTTT	<i>XbaI</i> , <u>Spacer</u> Rbs , <u>Startcodon</u> , MeHNL
MeHNL-Down	ATATCTCGAGTTATCAAGCATAAG-CAT CAGC	<i>XhoI</i> , <u>Stopcodon</u> , MeHNL
LuHNL-up	ATATTCTAGAAATAATTTTGTT-TA ACTTTAAGAAGGAGATATAC-CAT GGCGTCTCTTCCTGTTAGC	<i>XbaI</i> , <u>Spacer</u> Rbs , <u>Startcodon</u> , LuHNL
LuHNL-down	ATATGGATCCTTAATAATCGTT-CA ACTTGATCAC	<i>BamHI</i> , <u>Stopcodon</u> , LuHNL

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Merkmale
<i>LuHNL-T65A-up</i>	GCAAGTGTGTGCCGCGCGGATATTT-TAACCATT	<u>Thr65→Ala</u>
<i>LuHNL-T65A-down</i>	AATGGTTAAAATATCCGCGCGGCA-CACACTTGC	<u>Thr65→Ala</u>
<i>LuHNL-K162L-up</i>	AAGCTCCTTTACTACCTGCTGG-GATGCTCCACG	<u>Lys162→Leu</u>
<i>LuHNL-K162L-down</i>	CGTGGAGCATCCCAGCAGGTAGTA-AAGGAGCTT	<u>Lys162→Leu</u>
<i>LuHNL-E323V-up</i>	ACCGTGATTACCGGAGTGGAATT-TACGAAAAC	<u>Glu323→Val</u>
<i>LuHNL-E323V-down</i>	GTTTTTCGTAAATTCCTCCCGG-TAATCACGGT	<u>Glu323→Val</u>

2.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

2.2.1 Nährmedien

Alle Flüssig- und Festmedien wurden 20 min. bei 121°C und 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wurden mit Hilfe eines Membranfilters mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm sterilfiltriert (Schleicher & Schüll, Dassel) und dem Medium nachträglich zugesetzt. Zur Herstellung von Festmedien wurde den entsprechenden Flüssigmedien vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurden den Medien in der Regel die entsprechenden Antibiotika zugesetzt, wobei die Zugabe erst nach hinreichender Abkühlung des Mediums stattfand.

LB-Medium [236]

10 g/l Trypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefeextrakt; pH 7,0

TB-Medium [237]

Lösung 1: 5 g/l Glycerol; 12g/l Trypton; 24 g/l Hefeextrakt

Lösung 2: 0,72 M K₂HPO₄; 0,17 M KH₂PO₄

Lösung 1 und 2 wurden getrennt voneinander angesetzt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden 900 ml von Lösung 1 und 100 ml von Lösung 2 durch Schütteln miteinander vermischt.

Autoinduktions-Minimalmedium (modifiziert nach [238])

Lösung 1: 5 g/l Glycerol; 4 g/l NaH₂PO₄; 14,3 g/l K₂HPO₄; 0,5 g/l NH₄Cl; 2,5 g/l (NH₄)₂SO₄; 1 g/l Citronensäure x 1 H₂O; 2 g/l Na₂SO₄

Lösung 2: 0,5 g/l Glucose

Lösung 3: 2 g/l Lactose

Lösung 4: 0,5 g/l MgSO₄

Lösung 5: 0,1725 g/l ZnSO₄ (wird nur bei Überexpression der LuHNL benötigt)

Lösung 6 (Spurenelemente): 0,74 g/l CaCl₂ x 6 H₂O; 0,18 g/l ZnSO₄ x 7 H₂O; 0,1 g/l MnSO₄ x 1 H₂O; 20,1 g/l Na₂-EDTA; 16,7 g/l FeCl₃ x 6 H₂O; 0,1 g/l CuSO₄; 0,104 g/l CoCl₂

Lösungen 1 – 6 wurden getrennt voneinander angesetzt und autoklaviert bzw. sterilfiltriert (Lösung 6). Anschließend wurden 800 ml Lösung 1, je 50 ml Lösung 2, 3, 4 und 5 sowie 2 ml Lösung 6 durch Schütteln miteinander vermischt.

Hochzelldichte-Medium für die Fermentation [239]

HZD-Batch: 2g/l NH₄Cl, 20 g/l (NH₄)₂SO₄, 130 g/l KH₂PO₄, 100 g/l K₂HPO₄, 60 g/l NaH₂PO₄*H₂O, 30 g/l Hefeextrakt

HZD-Feed: 2 g/l NH₄Cl, 20 g/l (NH₄)₂SO₄, 130 g/l KH₂PO₄, 100 g/l K₂HPO₄, 60 g/l NaH₂PO₄*H₂O, 180 g/l Hefeextrakt

Vitamin-Lösung: 0,1 g/l Riboflavin, 10 g/l Thiamin-HCl, 0,5 g/l Nicotinsäure, 0,5 g/l Pyridoxin-HCl, 0,5 g/l Ca-Phanthotenat, 0,001 g/l Biotin, 0,002 g/l Folsäure, 0,01 g/l Cyanocobalamin

Spurenelemente-Lösung (in 5M HCl): 10 g/l CaCl₂*2H₂O, 0,5 g/l ZnSO₄*7H₂O, 0,25 g/l CuSO₄*2H₂O, 2,5 g/l MnSO₄*H₂O, 1,75 g/l CoCl₂*6H₂O, 0,125 g/l H₃BO₃, 2,5 g/l AlCl₃*6H₂O, 0,5 g/l Na₂MoO₄*2H₂O, 10 g/l FeSO₄*7H₂O

Weitere Lösungen: 400 g/l Glucose (Glucose-Lösung Batch), 718 g/l Glucose (Glucose-Lösung Feed), 200 g/l MgSO₄ (MgSO₄-Lösung), 200 g/l Thiamin-HCl (Thiamin-Lösung), 233 g/l IPTG (IPTG-Lösung), 75 g/l Kanamycin (Antibiotikum), Antischaum (Antifoam 289, Sigma)

Die Lösungen HZD-Batch, HZD-Feed, MgSO₄-Lsg., Glucose-Batch und Glucose-Feed wurden getrennt voneinander autoklaviert. Durch ihren niedrigen pH-Wert war die Spurenelement-Lösung autosteril. Die übrigen Lösungen wurden mittels eines Membranfilters (0,2 µm, Carl Roth) sterilisiert.

Aus den oben aufgeführten Komponenten wurden folgendermaßen ein Batch-Medium und eine Feed-Lösung zusammengestellt:

Batch-Medium: 1000 ml HZD-Batch, 50 ml Glucose-Lsg. Batch, 50 ml MgSO₄-Lsg., 50 ml Vitamin-Lsg., 40 ml Spurenelement-Lsg., 5 ml Thiamin-Lsg., 3 ml Antischaum, 8700 ml A. dest.

Feed-Lösung: 500 ml HZD-Feed, 4180 ml Glucose-Lsg. Feed, 250 ml MgSO₄-Lsg., 25 ml Vitamin-Lsg., 20 ml Spurenelement-Lsg., 25 ml Thiamin-Lsg., 2 ml Antischaum

2.2.2 Antibiotika

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Antibiotika als 1000x-Stocklösungen in A. dest. angesetzt und steril filtriert (0,2 µm, Carl Roth, Karlsruhe). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tabelle 2.5: Übersicht über die verwendeten Antibiotika. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die jeweilige Endkonzentration im Wachstumsmedium.

Antibiotikum	Konzentration für <i>E. coli</i>
Ampicilin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

2.2.3 Plattenkulturen

Die Inkubation fester Medien erfolgte aerob bei 37°C, bis einzelne Kolonien erkennbar waren. Zur Verlangsamung des Wachstums konnte die Inkubation auch bei RT stattfinden, um z.B. über das Wochenende gewährleisten zu können, dass sich vereinzelt Kolonien (Klone) und kein Zellrasen ausbilden. Bewachsene Platten wurden bis zu 2 Monate bei 4°C gelagert.

2.2.4 Kultivierung in Flüssigmedien

Vorkulturen von *E. coli* wurden entweder von der entsprechenden Stammplatte oder aus der jeweiligen Gefrierkultur in LB-Medium angelegt und mindestens 16 h bei 37°C bebrütet. Kulturen mit einem Volumen bis zu 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Reagenzglasrotator inkubiert. Bei größeren Volumina wurden die Vorkulturen in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei 120 Upm bebrütet, wobei das Verhältnis des Kulturvolumens zum Volumen des Kolbens stets 1:5 betrug.

Expressionskulturen wurden entweder in LB-Medium oder Autoinduktions-Minimalmedium in Erlenmeyerkolben mit 2-4 Schikanen angelegt, wobei das Verhältnis des Kulturvolumens zum Schüttelkolben 1:5 betrug. Die Inkubation erfolgte bei verschiedenen Temperaturen auf einem Rundschüttler bei 120 Upm. Die Inokulation der Expressionskulturen erfolgte mit 1 % (v/v) einer Vorkultur.

Für eine Expression in LB-Medium (2.2.1) wurden die Kulturen zunächst bis zum Erreichen einer OD₅₈₀ von 0,5-0,7 bei 37°C bebrütet. Nach der Induktion mit 0,1-1 mM IPTG wurden die Kulturen 3-5 h bei 25-30°C weiter inkubiert.

Die Expression in Autoinduktions-Minimalmedium (2.2.1) erfolgte nach der Inokulation mit 1 % (v/v) einer Vorkultur über einen Zeitraum von 72 h bei 25°C.

Für die Kultivierung von *E. coli*-Kulturen in *Deepwell*-Mikrotiterplatten (DW-MTPs) wurden diese zunächst mit jeweils 1 ml TB-Medium pro Well befüllt. Nach der Inokulation erfolgte die Inkubation für 16 h bei 37°C und 800 RPM auf einem Brutschüttler (TiMix 5, Edmund Bühler GmbH). Die Expression der HNL-Varianten wurde durch die Zugabe von 100 µl TB-Kana-Medium inklusive 10 mM IPTG induziert, so dass die Endkonzentration des IPTG bei 1 mM lag. Im Anschluss erfolgte die Expression für 5h bei RT. Kopien der Klone wurden mittels eines Impfigels in sterilen Mikrotiterplatten (MTPs) (Nunc, Roskilde, DK) erstellt, die zuvor mit 100 µl LB-Kana pro Well befüllt worden waren.

In allen Fällen erfolgte das Wachstum der Bakterienkulturen durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika unter Selektionsdruck.

2.2.5 Hochzelldichte-Kultivierung

Die Hochzelldichte (HZD)-Kultivierung von *MeHNL*-exprimierenden *E. coli*-Kulturen erfolgte im 15L-Maßstab in einem TechforsI-Fermenter (40 L) entsprechend dem Protokoll von Korz *et al.* [239].

10 L Medium wurden im Fermenter mit 100 ml einer *E.coli*-BL21(DE3)-p*MeHNL* Vorkultur inokuliert. Über den gesamten Zeitraum der Fermentation wurde kontinuierlich HZD-Feed-Lösung zugeführt. Bis zur Induktion mit 2 mM IPTG ca. 27 h nach der Inokulation erfolgte der Zellwuchs bei 30°C, nach der Induktion wurde die Temperatur auf 25°C gesenkt, um die Bildung von *inclusion bodies* zu minimieren. Der pH-Wert wurde konstant bei pH 7,0 gehalten; wenn nötig wurde mit 25 % (v/v) NH₃ oder 85 % (v/v) H₃PO₄ titriert. Der Sauerstoffpartialdruck wurde konstant bei 30 – 40 % gehalten. Die Zellernte erfolgte ca. 14 h nach der Induktion.

2.2.6 Bestimmung der Zelldichte

Zur Messung der Zelldichte einer Kultur wurde die optische Dichte in einem Spektralphotometer bei 580 nm relativ zum jeweiligen Medium als Referenzwert bestimmt. Eine O.D.₅₈₀ = 1 entsprach ca. 10⁹ Zellen/ml.

2.2.7 Lagerung von Bakterienkulturen

Zur Stammhaltung von Bakterien wurden 1,3 ml einer Übernachtskultur mit 0,1 ml DMSO vermischt und bei -80°C eingefroren.

Wurden *E. coli*- Zellen aus Expressionskulturen nicht unmittelbar nach der Expression benötigt, konnten diese bis zur weiteren Verwendung nach vorangegangener Sedimentation bei -20°C gelagert werden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

Geringe Mengen Plasmid-DNA wurde mit dem „PerfectPrep Plasmid Isolation Kit“ von Eppendorf (Hamburg) oder dem „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ von Fermentas (St. Leon-Roth) gemäß den Herstellerangaben präpariert.

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit dem „Qiagen High Speed Plasmid Midi Kit“ von Qiagen (Hilden) gemäß den Herstellerangaben präpariert.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationen von DNA-Proben wurden mittels analytischer Agarosegelelektrophorese (2.3.3) anhand des Molekulargewichtstandards „Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder“ oder „Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Roth) ermittelt.

Die einzelnen Banden der Standards enthielten definierte DNA-Konzentrationen, mit denen die Proben abgeglichen werden konnten.

2.3.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA [236]

TBE-Puffer 5x: 89 mM Tris/HCl; 89 mM Borat; 0,5 mM EDTA

Probenpuffer 5x: 100 mM EDTA; 43 % (v/v) Glycerol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau (BPB)

Ethidiumbromid-Lösung: Ethidiumbromid (Biorad, München)

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Analyse von DNA-Restriktionen, der Mengen- und Größenabschätzung linearisierter DNA und der präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten.

Die Auftrennung erfolgte je nach Größe der DNA-Fragmente in 0,5-2 % (w/v) Agarosegelen. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 0,5x TBE-Puffer gelöst und mit Ethidiumbromid (1 µg/10 ml) versetzt. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern mit einer auf 60 mA limitierten Stromstärke und konstanten Spannungen zwischen 8 und 12 V/cm Gellänge durchgeführt. Das Gel wurde mit Proben beladen, die zuvor mit 20 % (v/v) Probenpuffer versetzt worden waren. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE. Als Molekulargewichtsstandards

dienten „Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder“ und „Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder“ von Fermentas (St. Leon-Roth). Die Dokumentation der Gele erfolgte mit der Dokumentationsanlage „Eagleeye“ (Stratagene, Sunnyvale, USA) und der Software „Gel Jet Imager Plus“ (Intas, Göttingen).

2.3.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Klonierung bestimmter DNA-Fragmente wurden diese nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung (2.3.3) aus den Agarosegelen eluiert. Zur Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das „PerfectPrep Gel Cleanup Kit“ der Firma Eppendorf (Hamburg) oder das „QiaexII Gelextraction Kit“ von Qiagen (Hilden) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.3.5.1 Standard-PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten nach [148] wurden standardmäßig Reaktionsansätze mit einem Volumen von 50 µl erstellt, die sich folgendermaßen zusammensetzten:

2,5 U DNA-Polymerase (*Taq*, *Pfu*, Phusion), 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs, ca. 1 ng Matrizen-DNA sowie Puffer und weitere Zusätze entsprechend den jeweiligen Herstellerangaben. Die Reaktionen wurden in einem „Mastercycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 1 × Initiale Denaturierung (2 min, 95° C); 35 × Denaturierung, Annealing und Elongation (1 min 95 °C; 0,5 min: X °C, je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide; 0,5-3 min × 72 °C je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments); 1 × finale Elongation (5 min, 72 °C).

Weitere Anwendungen der Methode zur gerichteten und ungerichteten Mutagenese sind im Folgenden beschrieben.

2.3.5.2 Ortsspezifische Mutagenese

Zur Einführung einer oder mehrerer spezifischer Mutationen wurde die Quickchange®-Methode (Stratagene, Heidelberg) angewendet. Als Matrizen-DNA wurden ausschließlich Plasmide aus Bakterienstämmen mit funktionierenden Methylierungssystemen verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide wurden so erstellt, dass sie im mittleren Bereich die gewünschte Mutation enthielten und zueinander komplementär waren. Um der Eigenkomple-

mentation der Mutageneseprimer entgegenzuwirken, wurde ihre Konzentration im Vergleich zur Standard-PCR zum Teil auf bis zu 50 pmol erhöht. Des Weiteren wurde im Vergleich zur Standard-PCR die Elongationszeit in Abhängigkeit der zu amplifizierenden Plasmide auf bis zu 10 min verlängert; die übrigen Schritte erfolgten entsprechend dem Standard-PCR-Protokoll. Nach der Amplifikation wurde die methylierte Matrizen-DNA durch Zugabe von 10 U der Restriktionsendonuklease *DpnI* hydrolysiert. Die Restriktionsansätze wurden mittels eines Gelelutionskits aufgereinigt und konnten anschließend in *E. coli* transformiert werden.

2.3.5.3 Ungerichtete Mutagenese mittels epPCR

Zur Erstellung von Mutantenbanken wurde eine modifizierte Form der epPCR nach Jaeger *et al.* [240] angewendet. Eine Fehlerrate von 1,8 Basensubstitutionen pro kb konnte durch den folgenden Reaktionsansatz eingestellt werden: 25 pmol von jedem Primer; ca. 1 ng Matrizen-DNA; 75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20mM (NH₄)₂SO₄; 0,01 % Tween 20; 6 mM MgCl₂; 0,05 mM MnCl₂; 0,2 mM dNTPs; 2,5 U Goldstar-*Taq*Polymerase. Für eine höhere Mutationsrate von durchschnittlich 8,3 Austauschen pro 1000 bp wurde die MnCl₂-Konzentration auf 0,3 mM angehoben. Um eine möglichst hohe genetische Diversität der Banken zu gewährleisten, wurden jeweils 10 einzelne Reaktionen durchgeführt und die Ansätze anschließend vermischt.

2.3.6 *In vitro*-Rekombination von DNA-Fragmenten

2.3.6.1 Restriktion von DNA

Die DNA-Restriktion erfolgte in einem Restriktionsansatz von 10-150 µl Volumen. Um optimale Reaktionsbedingungen (Salzgehalt, pH-Wert) zu erhalten, wurden dem Ansatz die vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer (10 – 20% v/v) zugesetzt. Die Ansätze wurden 1-3 h bei dem vom Hersteller angegebenen Temperaturoptimum inkubiert. Soweit möglich wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (15 - 20 min., 65 –70 °C) gestoppt. Bei hitzestabilen Enzymen wurde der Restriktionsansatz direkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Doppelrestriktionen konnten durchgeführt werden, soweit für beide einzusetzenden Enzyme ausreichend ähnliche Anforderungen an den Puffer bestanden. Hierbei wurde entsprechend den Angaben des „DoubleDigest™“- Services auf der Fermentas-Homepage vorgegangen.

2.3.6.2 Ligation von DNA

Die Ligase wurde nach Herstellerprotokoll im mitgelieferten Puffer verwendet, im Fall von *blunt-end*-Ligationen wurde den Ansätzen gemäß den Herstellerangaben das mitgelieferte PEG zugesetzt. Die Inkubation der Ligationsansätze erfolgte entweder 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C oder 16°C. Bei *sticky-end*-Ligationen wurde die zu inserierende DNA im dreifachen, bei *blunt-end*-Ligationen im vierfachen molaren Überschuss zur Vektor-DNA gegeben.

2.3.6.3 Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA

Wenn nötig wurde vor *blunt-end*-Ligationen die restringierte Vektor-DNA dephosphoryliert und die zu inserierende DNA phosphoryliert, um die Ligationseffizienz zu steigern.

Die Vektor-DNA wurde mit Hilfe der Calf-Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) entsprechend den Herstellerangaben dephosphoryliert.

Die Phosphorylierung der Insert-DNA erfolgte mittels der T4-DNA-Kinase, wobei zu Restriktions- oder gereinigten PCR-Ansätzen der mitgelieferte Puffer zu 10 % (v/v) sowie ATP in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt wurde.

2.3.7 Transformation von *E. coli*

2.3.7.1 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Mg²⁺-Lösungen: 1 M MgSO₄; 1 M MgCl₂

TMF-Puffer: 100 mM CaCl₂, 50 mM RbCl₂, 40 mM MnCl₂

In einem sterilen Erlenmeyerkolben wurde LB-Medium mit je 1% (v/v) 1M MgSO₄ sowie 1% (v/v) 1M MgCl₂ versetzt und anschließend mit 1% (v/v) einer *E. coli*-Übernachtskultur inokuliert. Die Kultur wurde auf einem Schüttler bei 150 UpM und 37° C bis zu einer O.D.₅₈₀ von 0,5 – 0,7 bebrütet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min., 5000 UpM, 4°C) sedimentiert und anschließend mit 4 ml eisgekühltem TMF-Puffer und 1 ml eisgekühltem Glycerol versetzt und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 100µl-Ansätze aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei –80°C gelagert.

1 µl eines Ligationsansatzes oder einer Plasmid-Präparation wurden mit einem Ansatz kompetenter Zellen vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 90 s bei 42°C. Im Anschluss wurden die Transformationsansätze für 5 min auf Eis inkubiert, danach mit 900 µl LB-Medium vermischt und 1 h bei 37°C bebrütet. Nach der Zentrifugation des Ansatzes (3 min, 13.000 UpM, TZ, RT) wurde das Zellsediment in 0,2 ml LB-Medium

aufgenommen, resuspendiert und anschließend auf den entsprechenden Selektivagarplatten ausplattiert.

2.3.7.2 Elektroporation von *E.coli*

In einem sterilen Erlenmeyerkolben wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C und 150 UpM bis zu einer O.D.₅₈₀ von 0,5 – 0,7 angezogen. Anschließend wurden die Zellen 20 min. auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation (10 min., 5000 UpM, 4°C) sedimentiert. Die Zellen wurden mit 500 ml eisgekühltem 10 % (v/v) Glycerol gewaschen, erneut sedimentiert (10 min., 5000 UpM, 4°C) und in 250 ml eisgekühltem 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert. Nach einem weiteren Sedimentationsschritt wurden die Zellen in 20 ml 10 % (v/v) Glycerol aufgenommen, sedimentiert (10 min., 5000 UpM, 4°C) und in einem Endvolumen von 2 ml 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 50µl-Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei –80°C gelagert.

1 µl eines Ligationsansatzes oder einer Plasmid-Präparation wurden mit einem Ansatz kompetenter Zellen vermischt und für 5 min. auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine Transformationsküvette (Biorad, München, 2 mm Spaltbreite) überführt, welche im Anschluss im Elektroporator einem elektrischen Impuls (2500V, 25 µF, 200Ω, 5 ms) ausgesetzt wurde. Die Transformationsansätze wurden sofort nach dem elektrischen Impuls noch in der Küvette mit 0,9 ml LB-Medium vermischt, in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend 1h bei 37°C inkubiert. Nach der Zentrifugation des Ansatzes (3 min., 13000 UpM, RT) wurde das Zellsediment in 0,2 ml LB-Medium aufgenommen, resuspendiert und anschließend auf den entsprechenden Selektivagarplatten ausplattiert. Gleichbehandelte Bakterienansätze, denen keine DNA zugesetzt wurde, dienten als Negativkontrolle.

2.3.8 Sequenzierung von DNA

Alle DNA-Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeiten von der Firma Sequiserve (Vatersetten) durchgeführt.

2.3.9 Synthese von DNA-Doppelsträngen

Die Synthese längerer doppelsträngiger DNA-Sequenzen wurde als Auftragsarbeit von der Firma Sloning BioTechnology (Puchheim) durchgeführt. Die synthetisierten DNA-Fragmente wurden entsprechend 2.3.6 in die jeweiligen Vektoren kloniert.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Zellaufschlussverfahren

2.4.1.1 Zellaufschluss durch Sonifikation

Der Aufschluss geringer bis mittlerer Mengen von Zellmaterial aus Schüttelkolben-Expressionen (2.2.2) oder Hochzelldichte-Fermentationen (2.2.3) erfolgte mittels Ultraschall. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 20 % (w/v) in 10 mM KPi-Puffer, pH 7,5, re-suspendiert. Für den Zellaufschluss wurde ein Ultraschallprozessor UP200S der Firma Dr. Hielscher GmbH (Stuttgart) verwendet. Der Durchmesser der verwendeten Sonotroden richtete sich nach dem Volumen der aufzuschließenden Zellsuspension, wobei Sonotroden mit einem Durchmesser von 3 bis 14 mm zum Einsatz kamen. Der Desintegrator wurde auf 70% der Maximalamplitude und einen Cycle von 0,5 eingestellt.

Der Zellaufschluss erfolgte für jeweils 4 x 5 min auf Eis, wobei sich 5 min Beschallungsintervalle mit 5 min Pausen abwechselten. Anschließend wurden Zelltrümmer und unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation (45 min, 35000 g, 4°C) vom Überstand getrennt. Wenn nötig, wurde der Überstand im Anschluss steril filtriert (Carl Roth, Karlsruhe, 0,2 µm).

2.4.1.2 Chemo-enzymatischer Zellaufschluss

Geringe Mengen von Zellmaterial wurden chemo-enzymatisch mittels des BugBusterTM-Mastermixes (Novagen, Gibbstown, USA) aufgeschlossen. Das Bugbuster-Reagenz wurde dabei entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.4.1.3 Fraktionierung von Zell-Lysaten

Falls eine Auftrennung von Zell-Lysaten in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion (*inclusion bodies*) erforderlich war, wurden nach dem Zellaufschluss zunächst die unlöslichen Zellbestandteile von den löslichen durch Zentrifugation getrennt (15 min, 13000 UpM oder 30 min 5000 UpM). Im Anschluss wurde das aus unlöslichen Zellbestandteilen bestehende Pellet

in 8 M Harnstoff resuspendiert, wobei das Volumen dem des löslichen Überstands angeglichen wurde. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT konnte die unlösliche Fraktion für eine SDS-PAGE-Analyse (2.4.5) verwendet werden.

2.4.2 Chromatographische Verfahren

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle chromatographischen Verfahren als FPLC-Arbeiten an einem FPLC-System „ÄKTA Basic“ oder „ÄKTA Explorer“ (Amersham Biosciences / Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Alle bei den hier beschriebenen Reinigungsprozessen verwendeten Puffer wurden sterilfiltriert (Cellulose-Nitrat oder Cellulose-Acetat, Porengröße 0,45 μm , Sartorius, Göttingen), autoklaviert und unter Vakuum entgast.

2.4.2.1 Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose

Die Aufarbeitung der *MeHNL* und der *MeHNL-C81A* erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF. Vor der chromatographischen Auftrennung wurden die jeweiligen Zell-Lysate zunächst mittels SEC (2.4.2.3) von niedermolekularen Verunreinigungen befreit, um eine gute Bindung der Proteine an die Säulenmatrix zu gewährleisten. Die Aktivität aufweisenden Fraktionen wurden vereinigt und als Probe auf eine HiLoad Q-Sepharose FF-Säule (Pharmacia) mit einem Volumen von 27 ml aufgetragen, die zuvor mit 10 mM KPi (pH 7,5), äquilibriert worden war. Nach dem Auftragen der Probe wurden nicht gebundene Proteine mit Äquilibrierungspuffer von der Säule gespült. Die Elution der *MeHNL* erfolgte durch eine stufenweise Anhebung der Puffersalzkonzentration von 10 auf 50 mM KPi, (pH 7,5). Nach der Elution wurden stärker an das Säulenmaterial gebundene Proteine mit 1 M NaCl in 50 mM KPi (pH 7,5) von der Säule eluiert.

2.4.2.2 Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie an NiNTA-Agarose

Mit einem N-terminalen Hexahistidin-Rest versehene Varianten der *LuHNL* konnten entsprechend einem Protokoll von P. Heim [87] aufgereinigt werden.

Säulen mit 5 oder 10 ml NiNTA-Superflow-Material (Qiagen, Hilden) wurden mit 50 mM KPi (pH 7,5) äquilibriert. Nachdem der von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen befreite Zellrohextrakt (2.4.1) auf die Säule aufgetragen worden war, wurden nicht gebundene Proteine zunächst mit 50 mM KPi (pH 7,5) von der Säule gewaschen. Die Elution unspezi-

fisch gebundener Proteine erfolgte mit 20 mM Imidazol in 50 mM KPi (pH 7,5). Die *Lu*HNL oder davon erstellte Varianten wurden mit 200 mM Imidazol in 50 mM KPi (pH 7,5) von der Säule eluiert. Im Anschluss wurden die HNL-haltigen Fraktionen vereinigt und mittels SEC (G-25-Material) (2.4.2.3, 2.4.2.4) entsalzt.

2.4.2.3 Größenausschlusschromatographie an Sephadex G-25

Um HNL-haltige Proben vor der eigentlichen Feinreinigung von niedermolekularen Verunreinigungen zu befreien oder um mittels IMAC gereinigte Proben zu entsalzen, wurde eine 1L Sephadex G-25-Säule (Pharmacia, Freiburg) verwendet, die vor Gebrauch mit 10 mM KPi (pH 7,5) äquilibriert wurde. Aktivität aufweisende Fraktionen wurden vereinigt und entweder mittels AEC weiter gereinigt oder zur weiteren Verwendung aufkonzentriert.

2.4.2.4 Größenausschlusschromatographie an PD-10-Säulen

Geringe Proteinmengen konnten auch mittels einer PD-10-Säule (Pharmacia) entsalzt werden. Diese wurden entsprechend den Herstellerangaben mit 10 mM KPi (pH 7,5) äquilibriert und verwendet.

2.4.2.5 Größenausschlusschromatographie an Superdex G-200

Die Ermittlung des hydrodynamischen Volumens der *Me*HNL erfolgte mit einer Superdex G200 HiLoad 16/60-Säule (Amersham, Freiburg) mit einem Volumen von 122 ml. Als Probe diente eine Enzympräparation von Jülich Chiral Solutions / Codexis (Jülich), die zuvor mittels SEC (2.4.2.3) von niedermolekularen Verunreinigungen befreit worden war. Die Reinheit der *Me*HNL in der Probe lag bei ca. 80 %. Die Säule wurde vor der Aufgabe der Enzymproben mit 20 mM Na-Acetat (pH 5,7) inklusive 150 mM NaCl äquilibriert. Das Probenvolumen betrug 1 ml bei einer Proteinkonzentration von ca. 8 mg/ml.

Kalibrierung des Systems: Als Proteingrößen-Standards dienten Aldolase (156 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und RNase A (13,7 kDa). Zur Ermittlung des Totvolumens der Säule wurde Blue Dextran (2 MDa) aufgetragen. Es erfolgten jeweils Doppelbestimmungen der Retentionszeiten der einzelnen Standards.

Die Berechnung des Verteilungskoeffizienten K_{AV} der einzelnen Proteine erfolgte nach der folgenden Formel:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

V_e gibt hierbei das Elutionsvolumen des jeweiligen Proteins an, V_0 das Gesamtvolumen der Säule und V_t das Totvolumen der Säule, bestimmt durch die Retentionszeit des Blue Dextran. Die Kalibrationsgerade wurde erstellt, indem der Wert der Verteilungskoeffizienten K_{AV} gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen wurde (Abb. 2.1).

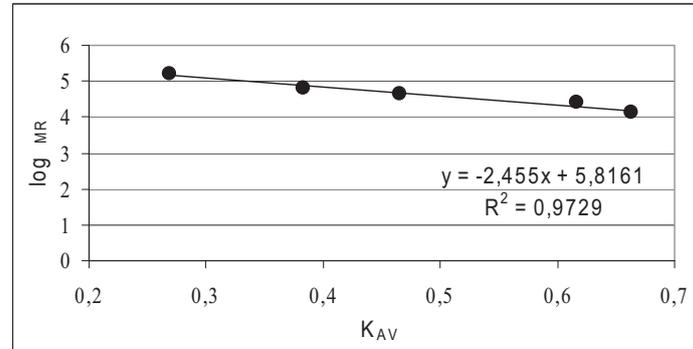


Abbildung 2.1: Kalibrierung der Superdex-G200-Säule. Als Eichproteine wurden Aldolase, Albumin, Ovalbumin Chymotrypsinogen A und RNase A verwendet.

2.4.2.6 Größenausschlusschromatographie mittels HPLC

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes der *MeHNL* durch HPLC-SEC mittels einer TSKgel G2000SWxl-Säule, 30 cm x 7,8 mm Ø, (TOSOH Bioscience) und einer HPLC-Apparatur LC-10Ai (Shimadzu).

Vor dem Probenauftrag wurde die Säule mit Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,4) inklusive 150 mM NaCl äquilibriert. Als Probe wurden 10 µl AEC-gereinigte *MeHNL* in einer Konzentration von 1 mg/ml im Äquilibrierungspuffer verwendet.

Kalibrierung des Systems: Als Proteingrößen-Standards dienten Aprotinin (6,5 kDa), RNaseA (13,7 kDa) und Ovalbumin (45 kDa). Zur Bestimmung des Totvolumens wurde Thyroglobulin (660 kDa) und zur Ermittlung des Nutzvolumens der Säule wurde L-Tyrosin (0,18 kDa) aufgetragen.

Die Berechnung des Verteilungskoeffizienten K_{AV} der einzelnen Proteine erfolgte nach der folgenden Formel:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_T}{V_0 - V_T}$$

V_e gibt hierbei das Elutionsvolumen des jeweiligen Proteins an, V_0 das Nutzvolumen der Säule, bestimmt durch L-Tyrosin, und V_t das Totvolumen der Säule, bestimmt durch die Retentionszeit des Thyroglobulin.

Die Kalibrationsgerade wurde erstellt, indem der Wert der Verteilungskoeffizienten K_{AV} gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen wurde (Abb. 2.2).

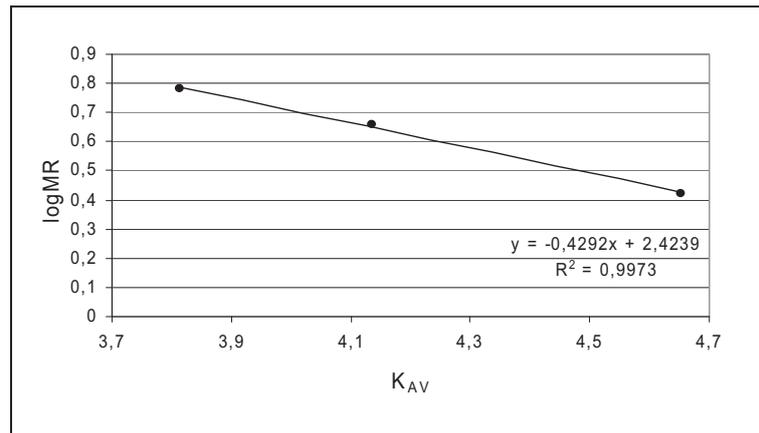


Abbildung 2.2: Kalibrierung der TOSOH-TSKgel-G2000SWXL-Säule. Als Eichproteine wurden Aprotinin, Ovalbumin und RNase A verwendet.

2.4.3 Ultrafiltration

Stark verdünnte Proteinlösungen konnten mittels Ultrafiltration aufkonzentriert werden. Hierfür wurde eine Amicon 8010- oder 8050-Ultrafiltrationszelle (Amicon, Schwalbach) mit Amicon YM10- oder YM30-Membranen (Ausschlussgröße 10 bzw. 30 kDa) bei einem Überdruck von maximal 2 bar verwendet.

2.4.4 Lagerung von Proteinen

Im Anschluss an die Aufarbeitung und Aufkonzentrierung konnten sowohl *MeHNL* als auch *LuHNL* gelöst in 10 mM oder 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) bei 4°C gelagert werden. Hierzu wurden die entsprechenden Proteinlösungen sterilfiltriert (0,2 µm, Carl Roth, Karlsruhe) und in ein steriles Falcon-Gefäß überführt.

Im Falle der *MeHNL* bestand zusätzlich die Möglichkeit, diese in Form eines Lyophilisates zu lagern. In diesem Fall wurde die *MeHNL*-haltige Lösung im Anschluss an die Aufarbeitung bei -20°C tiefgefroren. Der gefrorenen Lösung wurde dann in einem Lyophilisator (Lyovac GT2, Steris) die Flüssigkeit entzogen. Lyophilisate wurden bei -20°C gelagert.

2.4.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

5 x SDS-Probenpuffer (pH 6,8): 50 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% (v/v) Glycerol; 4% (w/v) SDS; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,03% (w/v) Bromphenolblau (BPB)

Elektrophorese-Puffer (pH 8,8): 25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

Trenngelpuffer (pH 8,8): 1,5 M Tris-HCl

Sammelgelpuffer (pH 6,8): 0,5 M Tris-HCl

SDS-Stammlösung: 10% (w/v) SDS

Acrylamid-Stammlösung: 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

APS-Stammlösung: 10 % (w/v) APS

Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Trenngel (12%): 4,0 ml Acrylamid-Stammlösung; 2,5 ml Trenngelpuffer; 100 µl SDS-Stammlösung; 100 µl APS-Stammlösung; 10 µl TEMED; 3,4 ml A.dest.

Sammelgel (5 %): 0,83 ml Acrylamid-Stammlösung; 1,3 ml Sammelgelpuffer; 50 µl SDS-Stammlösung; 50 µl APS-Stammlösung; 10 µl TEMED; 2,8 ml A.dest.

Die Gelelektrophorese von Proteinen wurde nach einem modifizierten Protokoll von Laemmli [241] durchgeführt. Die obigen Volumenangaben von Trenn- und Sammelgel beziehen sich auf das Volumen von 2 Minigelen in der vertikalen Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma Biorad (München); die einzelnen Komponenten wurden miteinander vermischt, wobei die Zugabe von APS und TEMED zuletzt erfolgte, gut verrührt und mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig in die Gelkammern gefüllt.

Die Auftrennung von Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem. Dazu wurden die in 5-20 µl SDS-Probenpuffer resuspendierten oder mit 25% (v/v) versetzten Proben 10 min. bei 99°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde in der oben genannten Gelapparatur in Elektrophorese-Puffer bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt.

2.4.6 Färbung von SDS-Gelen

Coomassie-Sensitiv-Färbelösung: 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 2% (v/v) *ortho*-Phosphorsäure (85 %), 5 % (w/v) Aluminiumsulfat ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times \text{H}_2\text{O}$, x = 14 – 18), 10 % (v/v) Ethanol

Die Färbung von SDS-Gelen erfolgte nach Kang *et al.* [242]. SDS-Gele wurden vor der Färbung dreifach mit A. dest. gespült. Zur Färbung wurden die Gele mit Coomassie-Sensitiv-Färbelösung überschichtet und unter leichtem Schütteln über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Gele mehrfach mit A. dest. gespült und dokumentiert.

2.4.7 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford [243]

Bradford-Reagenz: 100 mg Serva Blau G250; 100 ml 85 % (v/v) *ortho*-Phosphorsäure; 86 ml Ethanol (abs.); ad 1000 ml A.dest.

Die Testlösung wurde vor Licht geschützt über Nacht gerührt, anschließend filtriert und lichtgeschützt bei RT aufbewahrt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe wurden in einer Küvette 900 µl Bradford-Reagenz mit 100 µl Probe vermischt und 10 min. bei RT inkubiert. Als Referenz dienten 900 µl Bradford-Reagenz mit 100 µl VE-Wasser. Der entstandene Protein-Farbstoffkomplex wurde dann photometrisch bei 595 nm gemessen. Anhand einer Kalibrationsreihe aus bekannten Mengen von BSA konnte der Proteingehalt der Proben errechnet werden.

2.4.8 Präzipitation von Proteinen

Lösungen: 70 % (w/v) TCA, 80 % (v/v) Aceton

Zu gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese (2.7) einer TCA-Fällung unterzogen. Bei der TCA-Fällung wurde die Probe mit 0,1 Volumen TCA-Stocklösung vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde die Probe 15 min zentrifugiert (13000 UpM, RT) und das Sediment zweifach mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet worden war, wurde es für die SDS-PAGE in 5-20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.5.1 Photometrischer Nachweis von Mandelonitrilspaltung

50 mM Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0: 24,3 ml 0,1 M Citrat, 25,7 ml 0,2 M Na₂HPO₄, ad 100 ml A. dest.

60 mM Mandelonitril-Stocklösung, pH 3,5: 1,82 ml 0,1 M Citrat, 1,06 ml 0,1 M Na₂HPO₄, 800 µl Mandelonitril, ad 100 ml A. dest.

Der Nachweis der Mandelonitril-Spaltung erfolgte nach Hanefeld *et al.* [244]. 100 µl der HNL-haltigen Probe wurden mit 700 µl 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0), vermischt und 5 min lang bei 25° C inkubiert. Der Start der enzymatischen Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Mandelonitril-Stocklösung. Gemessen wurde der Anstieg der OD₂₈₀ in Quarz-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm über einen Zeitraum von 2 min bei 25°C. Bei jeder Messreihe wurde auch der nicht-enzymatische Zerfall des Mandelonitrils (Kontrollwert) bestimmt, da das Substrat im wässrigen Milieu bei einem pH > 3,5 instabil ist und in Benzaldehyd und HCN zerfällt. Hier wurden anstatt einer Enzym-Probe 100 µl des jeweiligen Enzym-Puffers mit Citrat-Phosphatpuffer vermischt und nach Zugabe der Mandelonitril-

Stocklösung der Anstieg der OD₂₈₀ in der Probe bestimmt. Der hierbei ermittelte Anstieg der OD₂₈₀ wurde von den Messwerten der Enzymproben subtrahiert.

Die volumetrische Aktivität einer Probe ließ sich mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$\text{Aktivität (U / ml)} = \frac{(\Delta A / \text{min Probe} - \Delta A / \text{min Kontrollwert}) * \text{Küvettenvolumen (ml)}}{\text{Probenvolumen (ml)} * \epsilon_{\text{Benzaldehyd}} * \text{Schichtdicke (cm)}} \times f$$

$$\Rightarrow \text{Aktivität (U / ml)} = (\Delta A / \text{min Probe} - \Delta A / \text{min Kontrollwert}) * 7,267$$

ΔA : Steigung der O.D.₂₈₀ pro min

f: Verdünnungsfaktor

$\epsilon_{\text{Benzaldehyd}}$: Extinktionskoeffizient von Benzaldehyd bei 280 nm im vorliegenden System = 1,376 L mmol⁻¹ cm⁻¹

2.5.2 Photometrischer Nachweis von Cyanid-Ionen

Citrat-Phosphat Puffer (pH 5,0): 24,3 ml 0,1 M Citrat, 25,7 ml 0,2 M Na₂HPO₄, ad 100 ml A. dest.

Substratlösung: 300 mM Cyanhydrin, gelöst in 0,1 M Citrat

In Abhängigkeit von der Löslichkeit des jeweiligen Cyanhydrins ist zusätzlich noch die Zugabe einer Spatelspitze Gummi arabicum pro 10 ml Lösung als Emulgator notwendig.

Nachweislösung 1: 0,4 g N-Chlorosuccinimid, 4 g Succinimid, ad 50 ml H₂O. Die Lösung muss mindestens 24 h vor der Nutzung hergestellt werden.

Nachweislösung 2: 0,4 g Isonicotinsäure, 0,8 g Barbitursäure, ad 50 ml 0,2 M NaOH. Die Lösung muss kurz vor Gebrauch frisch angesetzt und anschließend vor Licht geschützt gelagert werden.

Die Bestimmung der MeHNL-Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten im Hochdurchsatzverfahren sowie die Bestimmung der LuHNL-Aktivität gegenüber Acetoncyanhydrin erfolgte nach Andexer *et al.* [245].

Zur Messung von Enzymaktivitäten wurden pro Well einer Standard-Mikrotiterplatte 140 µl Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0) vorgelegt. Anschließend wurden 10 µl der zu messenden Probe (z.B. Zellrohextrakt) zugegeben. Der Biotransformationsschritt wurde durch die Zugabe von 10 µl Substratlösung gestartet und lief über einen Zeitraum von 0,5 - 5 min bei 25°C.

Der Biotransformationsschritt wurde durch die Zugabe von 10 µl Nachweislösung 1 und intensives Durchmischen beendet. Nach einem Inkubationsschritt von 5 min wurden 30 µl Nachweislösung 2 zugegeben, anschließend erfolgte die Messung des Anstiegs der OD₆₀₀. Aus dem linearen Bereich der Steigung kann nach folgender Formel die Aktivität in der Probe berechnet werden:

$$\text{Aktivität (U / ml)} = \frac{(\Delta A_{600} / \text{min Probe} - \Delta A_{600} / \text{min Kontrollwert}) \times \text{Gesamtvolumen (ml)}}{\text{Probenvolumen (ml)} \times \text{Zeit (min)} \times \text{Gesamtvolumen (ml)} \times 0,84} \times f$$
$$\Rightarrow \frac{(\Delta A_{600} / \text{min Probe} - \Delta A_{600} / \text{min Kontrollwert}) \times f}{\text{Probenvolumen (ml)} \times 4,2 \times t}$$

$\Delta OD_{600}/\text{min}$: Steigung der OD_{600} pro min

f: Verdünnungsfaktor

t: Reaktionszeit in min

Der Faktor 0,84 ergibt sich aus der spezifischen Extinktionszunahme bei 600 nm pro mM Cyanid im vorliegenden System entsprechend $y = 0,84x + 0,03$ (x: Cyanidkonzentration in mM, y: $\Delta OD_{600}/\text{min}$), wobei der y-Achsenabschnitt nicht in die Berechnung mit einbezogen wurde. Die maximale Zunahme der OD_{600}/min wurde auf 0,3 festgelegt, da oberhalb dieses Wertes die $\Delta OD_{600}/\text{min}$ nicht mehr linear mit der Cyanidkonzentration steigt.

Zusätzlich zu jeder Messreihe wurde jeweils ein Kontrollwert gemessen, bei dem statt der Enzymprobe 10 μl des jeweiligen Enzym-Puffers eingesetzt wurden. Dieser Hintergrund wurde von allen Messwerten der Enzymproben subtrahiert.

2.5.3 Bestimmung des Effektes von Puffer, pH-Wert und Temperatur auf die Enzymaktivität

Sollte der Einfluss der Parameter Puffer, pH-Wert oder Temperatur auf die Aktivität eines Enzyms bestimmt werden, wurden die jeweiligen Aktivitäts-Tests (2.5.1 & 2.5.2) hinsichtlich der gewünschten Parameter modifiziert.

Bei Messungen zum Effekt des Puffers auf die Enzymaktivität wurde der bei beiden angewandten Aktivitäts-Tests ansonsten standardmäßige verwendete Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0) gegen andere Puffer (Acetat-Puffer, Glutamat-Puffer, KPi-Puffer, 2.5.4) gleichen pH-Wertes ausgetauscht. Sowohl die Bestimmung des Aktivitäts- als auch des Kontrollwerts erfolgte ansonsten entsprechend den Standard-Bedingungen ($T=25^\circ\text{C}$, pH 5,0).

Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Aktivität wurden bei den jeweiligen Aktivitätstests Citrat-Phosphat-Puffer mit variierenden pH-Werten verwendet. Außer dem pH-Wert wurden hierbei alle übrigen Parameter im Vergleich zum jeweiligen Standard-Assay nicht verändert. Bei jedem einzelnen pH-Wert wurden sowohl Aktivitäts-Werte als auch die zugehörigen Kontrollwerte bestimmt. Oberhalb von pH 6-6,5 konnten, je nach genutztem Assay, aufgrund der zunehmenden Autohydrolyse der Substrate keine Messungen mehr durchgeführt werden.

Messungen zur Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Aktivität wurden standardmäßig in Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0) durchgeführt, wobei die Temperatur des Biotransformationsschrittes geändert wurde. Im Falle des Mandelonitril-Assays (2.5.1) wurden hierfür der vorgelegte Puffer vor der Zugabe von Enzym und Substratlösung sowie das Photometer entsprechend temperiert, beim Cyanid-Assay (2.5.2) geschah dies durch die Temperierung des in Mikrotiterplatten vorgelegten Puffers vor der Zugabe von Enzym und Substratlösung.

Aus dem jeweiligen Aktivitätsprofil ließ sich neben der Information über das Temperaturoptimum zusätzlich die Aktivierungsenergie des Enzyms ableiten. Zu diesem Zweck wurde der natürliche Logarithmus der Aktivität gegen die reziproke absolute Aktivität aufgetragen. Die Berechnung der Aktivierungsenergie erfolgte nach Arrhenius ($k = A \cdot e^{E_a/RT}$), wobei k die Katalysekonstante (s^{-1}), A den präexponentiellen Frequenzfaktor, E_a die Aktivierungsenergie ($J \text{ mol}^{-1}$), R die allgemeine Gaskonstante ($J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) und T die absolute Temperatur (K) angibt. Durch Auftragung des natürlichen Logarithmus der spezifischen Aktivität gegen die reziproke absolute Temperatur (Arrhenius-Plot) konnte aus der Steigung der Geraden die Aktivierungsenergie errechnet werden.

2.5.4 Durchführung von Stabilitätsmessungen

pH-Stabilität

Acetat-Puffer: Die Herstellung von Acetat-Puffer im pH-Bereich zwischen pH 3,6 und 5,6 erfolgte entsprechend Walpole [246].

Citrat-Phosphat-Puffer: Im pH-Bereich von 3,4 – 6,4 wurden Citrat-Phosphat-Puffer entsprechend McIlvaine [247] angesetzt.

Glutamat-Puffer: 50 mM Na-Glutamat wurden mit NaOH oder HCl auf den jeweiligen pH-Wert titriert.

Kalium-Phosphat-Puffer: Im Bereich von pH 5,7 bis pH 8,0 wurde der Phosphat-Puffer nach dem Rezept von Sorensen [248] hergestellt. Unterhalb von pH 5,7 wurde mit Phosphorsäure und KOH titriert.

Zur Bestimmung der Entwicklung von Aktivität und des Proteingehaltes von HNL-Proben abhängig vom pH-Wert wurden Proben aus einer Stocklösung entnommen und, wenn nicht anders angegeben, im Verhältnis 1:10 im jeweiligen Puffer verdünnt. Die Proteinkonzentrationen in den Inkubationsansätzen lagen dabei zwischen 30 und 100 $\mu\text{g/ml}$. In definierten Zeitabständen wurden den Ansätzen Proben entnommen, die auf Aktivität und löslichen Proteingehalt untersucht wurden. Die Proben für die Aktivitätsmessungen wurden dabei ohne weitere Vorbehandlung in den jeweiligen Aktivitätstest (2.5.1, 2.5.2) eingesetzt. Proben für die Be-

stimmung des löslichen Proteingehaltes wurden zunächst 3 min bei 13000 UpM zentrifugiert, um unlösliche Proteinaggregate zu sedimentieren. Zur Bestimmung des löslichen Proteingehaltes wurden danach vorsichtig Aliquots vom Überstand entnommen und für den Bradford-Assay verwendet. Zusätzlich wurden sowohl Aktivität als auch Proteingehalt der Stocklösung bestimmt, außerdem erfolgte eine Überprüfung des pH-Wertes nach Zugabe der Proteinlösung zum jeweiligen Inkubationspuffer.

Temperaturstabilität

Die Durchführung von Thermostabilitätsmessungen erfolgte analog den pH-Stabilitätsmessungen. HNLs wurden aus der jeweiligen Stocklösung im Verhältnis 1:10 in vortemperierten 10 oder 20 mM KPi (pH 6,0), verdünnt. Die Temperierung der Inkubationsansätze erfolgte bei Temperaturen $> 10^{\circ}\text{C}$ durch Thermoblöcke (Eppendorf), bei niedrigeren Temperaturen wurde ein Kühlschrank oder eine mit Eis befüllte Styropor-Kiste genutzt. Die eingestellten Temperaturen wurden mit einem Thermometer kontrolliert.

Niedermolekulare Zusätze

Der stabilisierende Einfluss von Saccharose und Sorbitol wurde untersucht, indem diese in einer Endkonzentration von 100 – 200 mg/ml (Sorbitol) oder 200 – 400 mg/ml (Saccharose) zum jeweiligen Inkubationsansatz gegeben wurden. Saccharose oder Sorbitol wurde in der entsprechenden Konzentration im jeweiligen Puffer gelöst, bevor die Zugabe des Enzyms aus einer Stocklösung erfolgte.

Der stabilisierende Effekt von *E. coli*-Zellrohextrakten wurde analysiert, indem Zellen aus den jeweiligen Überexpressionskulturen in 10 mM KPi (pH 7,5) resuspendiert und entsprechend 2.4.1.1 aufgeschlossen wurden. Die Zell-Lysate wurden durch Zentrifugation (17000 RPM, 15 min, SS-34-Rotor) und anschließende Sterilfiltration (0,2 μm Porendurchmesser) von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen befreit und im Verhältnis 1:10 zum jeweiligen Inkubationspuffer gegeben.

2.6 Spektroskopische Methoden

2.6.1 Circular Dichroismus (CD-Spektroskopie)

Der Effekt von pH-Wert und Temperatur auf die Sekundärstruktur von *AtHNL* und *MeHNL* wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht.

CD-Spektren der untersuchten Proteine wurden jeweils im Bereich von 210 – 350 nm mit einem Spektropolarimeter J-810 (Jasco) unter kontinuierlicher Stickstoffbegasung (3 L/min) aufgenommen. Die Scangeschwindigkeit wurde auf 50 nm/min eingestellt, die Schlitzbreite

auf 1 nm und die Reaktionszeit auf 2 s. Je nach Intervallzeit zwischen den zu messenden Spektren wurden jeweils 1-3 Spektren akkumuliert.

Für die zeitabhängige Beobachtung von Denaturierungsprozessen wurden die jeweiligen Proteine aus Stocklösungen auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt, die Messungen erfolgten in Quarz-Küvetten mit einer Schichtdicke von 2 mm (Hellma). Für die pH-abhängige Denaturierung erfolgte die Verdünnung der HNLs in Citrat-Phosphat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten, im Falle der thermischen Denaturierung wurde 10-20 mM KPi-Puffer (pH 6,0), verwendet. Die Temperatur wurde, wenn nicht anders angegeben, mit einem externen Thermoelement auf 25°C reguliert.

Die Bestimmung von Schmelztemperaturen erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml in Quarz-Küvetten mit 1 mm Schichtdicke (Hellma). Die Temperatur in den Küvetten wurde im zeitlichen Abstand von 5 min um 5°C erhöht, so dass die Heizrate 1°C/min betrug. Alle Spektren wurden mit der Software „Spectra Manager“ (Jasco) sowie ORIGIN 7G (Microcal) ausgewertet.

Zur Quantifizierung struktureller Änderungen wurden Spektren der in 6M GnHCl denaturierten Form sowie der nativen Form (Citrat-Phosphat-Puffer pH 6,0 oder 6,4; T = 25°C) des jeweiligen Enzyms aufgezeichnet. Waren die Unterschiede zwischen den Spektren der nativen und der denaturierten Form des Enzyms hinreichend groß, konnte unter Nutzung der Elliptizitätswerte bei 222 nm beider Spektren eine Zwei-Punkt-Eichgerade erstellt werden. Der Eichung wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass es sich bei der Enzymprobe in Citrat-Phosphat-Puffer um 100 % natives Enzym handelt, während bei der GnHCl-behandelten Probe von 0% struktureller Integrität ausgegangen wurde.

2.6.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Strukturelle Veränderungen von *MeHNL* und *AtHNL* in Abhängigkeit des pH-Wertes wurden mittels Tryptophanfluoreszenz mit einem RF-1501 Fluorospektrometer (Shimadzu) untersucht. Zur Dämpfung des Anregungsstrahls wurde ein zusätzlicher Filter (UG1, Schott) in den Strahlengang eingebracht. Die Temperierung der Küvetten auf 25°C erfolgte mittels eines externen Thermoelementes (F25, Julabo). Alle Messungen wurden in Quarz-Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm durchgeführt.

Für die Messungen wurde die jeweilige HNL in Citrat-Phosphat-Puffer mit dem entsprechenden pH-Wert verdünnt, wobei die Endkonzentration auf 0,1 mg/ml eingestellt wurde.

Die Anregung der Tryptophanfluoreszenz erfolgte bei 295 nm, die Emissionsspektren wurden im rechten Winkel zum anregenden Lichtstrahl im Bereich von 305-450 nm bei mittlerer

Scan-Geschwindigkeit aufgezeichnet. Die Schlitzweite betrug sowohl für die Anregung als auch für die Emission 10 nm, die Reaktionszeit wurde auf Automatik eingestellt.

Zur Auswertung wurden die Spektren in ORIGIN 7G exportiert und normiert.

Die Quantifizierung struktureller Veränderungen erfolgte entsprechend der für die CD-Spektroskopie angewendeten Prozedur. Die normierten Fluoreszenz-Intensitäten bei einer Wellenlänge von 350 nm, die sich auf der Schulter des nativen Emissionsspektrums befindet, einer nativen Enzymprobe (Citrat-Phosphat-Puffer pH 6,0 oder 6,4; T = 25°C) sowie einer denaturierten Form in 6 M GnHCl wurden gegen den Anteil nativen Proteins aufgetragen, wobei davon ausgegangen wurde, dass es sich bei der Enzymprobe in Citrat-Phosphat-Puffer um natives Enzym handelt, während für die GnHCl-behandelten Probe von einem totalen Strukturverlust ausgegangen wurde.

2.6.3 Statische Lichtstreuung

Die Bildung von Proteinaggregaten in Abhängigkeit des pH-Wertes wurde mittels statischer Lichtstreuung quantifiziert. Der dafür genutzte Versuchsaufbau sowie die eingestellten Parameter entsprachen im Wesentlichen den für die Fluoreszenzspektroskopie genutzten. Ausnahmen bildeten die Wellenlängen von Anregung (500 nm) und der aufgezeichneten Spektren (450-550 nm) sowie der Verzicht auf einen zusätzlichen Filter im Anregungsstrahlengang.

2.7 Screening von Mutantenbanken

Mittels epPCR hergestellte HNL-Variantenbanken wurden zunächst in den Vektor pET28a kloniert, in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und auf Selektivagar ausplattiert.

Einzelkolonien wurden mit Hilfe eines Pickroboters (Qpix, Genetix) in 96er Deepwell-Mikrotiterplatten (Greiner Bio-one, Frickenhausen) übertragen, welche zuvor mittels eines Dispensers (μ Fill, Bio-Tek) mit 1 ml TB-Kana-Medium pro Well befüllt worden waren. Im Anschluss an die Expression (2.2.2) wurden die Zellen in den DW-MTPs sedimentiert (Hettich Rotina 35R, 3000 RPM, 20 min, 4°C) und der Überstand wurde verworfen.

Sollten die jeweiligen Klone auf eine verbesserte pH-Stabilität gescreent werden, erfolgte ein Zellaufschluss durch Zugabe von 200 μ l BugbusterTM (Novagen) und anschließende Inkubation unter Schütteln (800 Upm) bei 37°C. Jeweils 10 μ l Probe wurden dann zu 140 μ l des entsprechenden Puffers gegeben und 16 h inkubiert, bevor ein Aktivitätsnachweis durch die Zugabe von Substrat gestartet wurde.

Bei Screening von Klonen auf ein erweitertes Substrat-Spektrum hingegen wurden die Zellpellets in 200 μl H_2O resuspendiert. Als Probe für den Aktivitätstest wurden dann 10 μl der Zellsuspension genutzt, wobei der Zellaufschluss in ausreichendem Maß durch das Substrat erfolgte.

3. Die HNL aus *Manihot esculenta*

3.1 Klonierung, Expression und Reinigung der MeHNL

Für die weiterführenden Untersuchung der MeHNL im Hinblick auf ihre Stabilität, Aktivitätsoptima und Inaktivierungsmechanismen musste diese zunächst in *E. coli* überexprimiert und gereinigt werden.

3.1.1 Klonierung der MeHNL

Um die MeHNL im heterologen Wirt *E. coli* überexprimieren zu können, wurde das kodierende Gen zunächst mit den Primern MeHNL-up und MeHNL-down auf Basis der Matrize pSOx-IV (JCS/Codexis) amplifiziert und über die Schnittstellen *Xba*I und *Xho*I in den Vektor pET28a kloniert. Am 3'-Ende wurde das Gen mit einem Stop-Codon versehen, so dass die MeHNL ohne N- oder C-terminalen His-Tag exprimiert werden konnte (s. Anhang).

Der T7-Überexpressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) wurde mit dem resultierenden Vektor pMeHNL transformiert, so dass die Expression durch IPTG-Zufuhr induziert werden konnte.

Die Sequenz des hier klonierten Gens unterscheidet sich durch insgesamt 5 stille Mutationen von der veröffentlichten Sequenz MeHNL10 [62]. Eine Mutation an Position 768 (GCT→GCA) war bereits von JCS/Codexis eingefügt worden, um eine unerwünschte *Nde*I-Schnittstelle im Gen zu eliminieren. Zusätzlich sind noch vier weitere stille Mutationen an Position 123 (AGC → AGT), 252 (CTG→ CTC), 573 (ACC → ACT) und 660 (ATT → A-TA) vorhanden, bei denen es sich möglicherweise um während der Stammhaltung aufgetretene spontane Mutationen handelt. Da diese die *codon usage* jedoch nicht signifikant verschlechtern, wurde die vorhandene Gen-Variante für die nachfolgenden Arbeiten weiter genutzt.

3.1.2 Expression der MeHNL

Vorangegangene Studien zur Expression der MeHNL in einem T7-Expressionssystem hatten ergeben, dass die Bildung unlöslicher Proteinaggregate (*inclusion bodies*) mit der Temperatur während der Expression zunimmt [249]. Um optimale Bedingungen für die nachfolgende Hochzell-dichte-Kultivierung des rekombinanten Wirtes *E. coli* zu bestimmen, wurde der Einfluss der IPTG-Konzentration sowie der Temperatur auf die Bildung des Anteils an löslich exprimierter MeHNL untersucht.

Bei allen getesteten Expressionstemperaturen und IPTG-Konzentrationen konnte eine Überexpression der *MeHNL* beobachtet werden, jedoch ist das Verhältnis von löslicher zu unlöslicher *MeHNL* (*inclusion bodies*) von der Temperatur bei der Expression abhängig (Abb. 3.1). Während bei 25°C noch ca. 50% des überexprimierten Proteins in löslicher Form vorliegen, ist bei 37°C mehr als 90% unlöslich.

Die Konzentration des Induktors IPTG wirkt sich hingegen eher bedingt auf die Bildung von *inclusion bodies* aus; lediglich bei einer Expressionstemperatur von 25°C konnte eine Zunahme an *inclusion bodies* mit der IPTG-Konzentration gezeigt werden, die jedoch nicht mit einer Abnahme des löslichen Anteils einher geht.

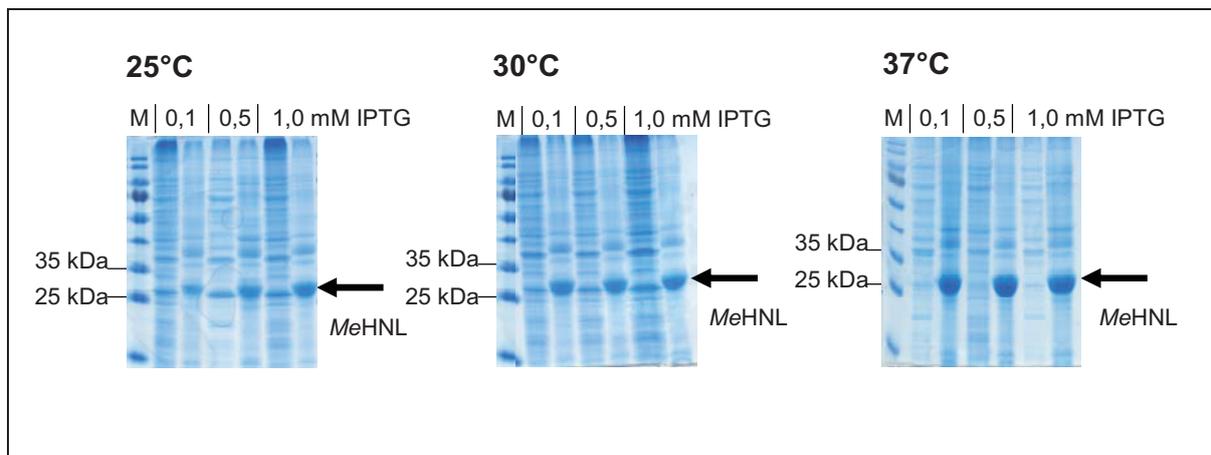


Abbildung 3.1: SDS-PAGE-Analyse der *MeHNL*-Expression. Die Zell-Lysate der einzelnen Kulturen wurden jeweils in einen die löslichen Anteile beinhaltenden Überstand und ein unlösliches Pellet fraktioniert. Von beiden Fraktionen wurden gleiche Volumina (entsprechend ca. 20 µg Protein) auf ein SDS-Gel aufgetragen (links: lösliche Fraktion, rechts: unlösliche Fraktion). Die Position der *MeHNL* ist jeweils mit einem Pfeil markiert und entspricht dem errechneten Molekulargewicht von ca. 30 kDa.

Aufgrund der verstärkten Bildung von *inclusion bodies* bei den höheren hier getesteten Temperaturen wurde bei der nachfolgend durchgeführten Hochzelldichte-Kultivierung nach Zugabe des Induktors IPTG die Expressionstemperatur von 30°C auf 25°C gesenkt, anstatt entsprechend der Standard-Prozedur die Expression bei 30°C durchzuführen.. Aus 15 L Kultur konnten 1,95 kg Zellmasse mit einer Aktivität von ca. 1 kU/g Zellmasse gewonnen werden, entsprechend einer Gesamtaktivität von ca. 2 GU. Diese Zellen wurden im Folgenden für die Aufarbeitung der *MeHNL* sowie für Experimente zur Stabilität des Enzyms in Zell-Lysaten genutzt.

3.1.3 Reinigung der *MeHNL*

Die Aufarbeitung der rekombinanten *MeHNL* erfolgte in zwei Schritten: im ersten Schritt wurden das von unlöslichen Bestandteilen und Zelltrümmern befreite Zell-Lysat mittels Grö-

Benausschluss-Chromatographie von niedermolekularen Verunreinigungen befreit; im zweiten Schritt erfolgte die Trennung der *MeHNL* von den anderen im Zell-Lysat vorhandenen Proteinen durch Anionenaustausch-Chromatographie (AEC). Der primäre Entsalzungsschritt war notwendig, um die Bindung der *MeHNL* an das Säulenmaterial zu ermöglichen.

Die *MeHNL* eluierte in Form eines Doppel-Peaks von der Q-Sepharose-Säule, wobei die Fraktionen des ersten Peaks stark mit Fremdproteinen verunreinigt waren und deshalb nicht weiter verwendet wurden (Abb. 3.2). In den Fraktionen des zweiten Peaks lag die *MeHNL* in einer Reinheit von ca. 90% vor (Abb. 3.2). Die Ausbeute der Aktivität lag bei ca. 50%, während die spezifische Aktivität im Vergleich zum Rohextrakt um den Faktor 4,7 gesteigert werden konnte (Tab. 3.1).

Nachdem die Aktivität aufweisenden Fraktionen des zweiten Peaks vereinigt worden waren, wurde ein Teil der Proteinlösung mittels einer Amiconzelle aufkonzentriert und in gelöster Form bei 4°C gelagert. Die Lagerung des anderen Teils erfolgte nach der Lyophilisierung bei -20°C.

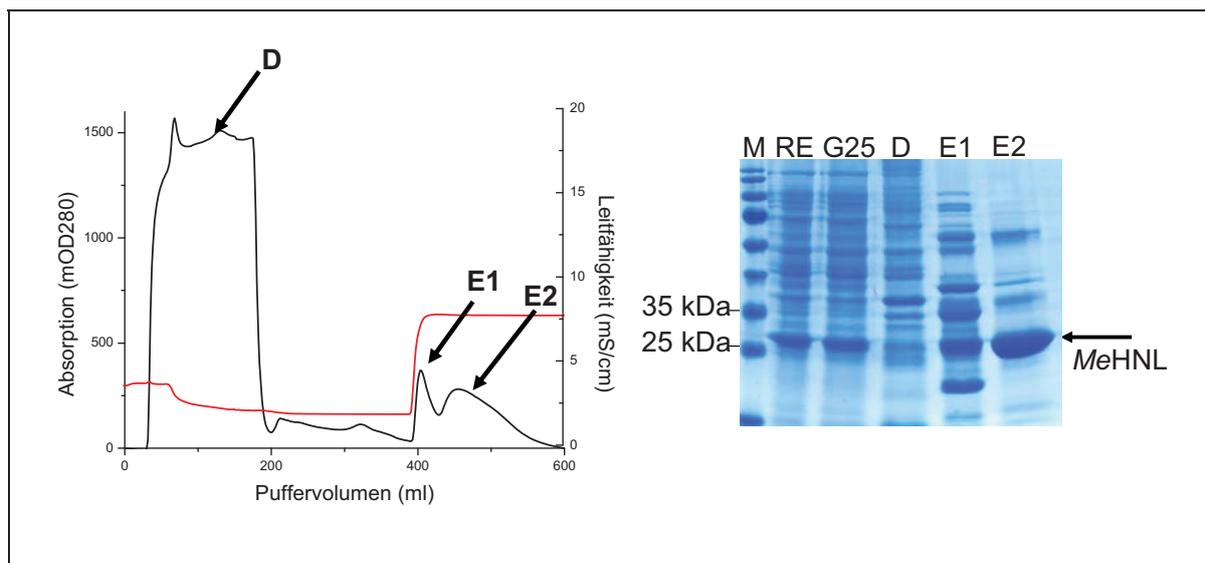


Abbildung 3.2: Reinigungsprofil (links) und SDS-PAGE-Analyse (rechts) der *MeHNL*-Reinigung durch AEC. Bei dem Reinigungsprofil ist der Verlauf der OD₂₈₀ (schwarz) sowie der Leitfähigkeit (rot) gegen das Puffervolumen aufgetragen. Nach dem Anheben der Pufferkonzentration von 10 mM auf 50 mM KPi bei ca. 400 ml ist ein Anstieg der Leitfähigkeit zu sehen, der mit der Elution der *MeHNL* in Form eines Doppelpeaks einhergeht. SDS-PAGE: RE: Rohextrakt, G25: Gepoolte Fraktionen des SEC-Reinigungsschrittes, D: Durchlauf bei der AEC, E1: Elutionspeak 1, E2: Elutionspeak 2.

Tabelle 3.1: Reinigung der MeHNL durch SEC und AEC.

Reinigungs- schritt	Volumetrische Aktivität (U/ml)	Protein- Gehalt (mg/ml)	Gesamt- aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungs- Faktor
Rohextrakt	198	11,5	8415	17,2	100	1
SEC (Sephadex G-25)	47	2,5	7520	18,8	89	1,1
AEC (Q-Sepharose FF), Peak 2	60,8	0,75	4256	81,1	51	4,7

3.2 Die MeHNL liegt als Homotetramer vor

Der Quartärstruktur der MeHNL ist seit vielen Jahren Gegenstand von Diskussionen (Kapitel 1.2.3). Um die Frage nach dem Oligomerisierungszustand des Enzyms abschließend zu klären, wurden Größenausschlusschromatographien in zwei verschiedenen Puffern mittels HPLC und FPLC durchgeführt. Die Ergebnisse beider Versuche sind in Tabelle 3.2 gezeigt.

Tabelle 3.2: Bestimmung des oligomeren Zustandes der MeHNL mittels Größenausschlusschromatographie.

Methode	Puffer	Proteinkonzentration i. d. Probe	Apparentes Molekulargewicht
FPLC (Superdex G-200)	20 mM Acetat, pH 5,7 inkl. 150 mM NaCl	10 mg/ml	93 kDa
HPLC (TOSOH TSKgel G2000SWXL)	Citrat-Phosphat, pH 5,4 inkl. 150 mM NaCl	1 mg/ml	96 kDa

In beiden Fällen liegen die Werte des ermittelten apparenten Molekulargewichtes mit 93 bzw. 96 kDa relativ nahe beieinander, obwohl verschiedene Puffer und Proteinkonzentrationen eingesetzt wurden. Das apparente Molekulargewicht entspricht mit 93 kDa bis 96 kDa in etwa dem dreifachen Molekulargewicht eines Monomers (29,2 kDa) und somit eher einem Trimer als einem Tetramer. Jedoch konnte mittels verschiedener bioinformatischer Methoden gezeigt werden, dass die MeHNL wahrscheinlich eher in Form eines Dimers oder aber eines aus zwei Dimeren zusammengesetzten Tetramers vorliegt, bei dem die Bindung zwischen den beiden Dimeren eher schwach ist [65]. Dies deutet darauf hin, dass die MeHNL in Lösung als Ge-

misch aus Dimeren und Tetrameren vorhanden ist, die im Gleichgewicht vorliegen, was sich im apparente Molekulargewicht eines Trimers zeigt. Es konnte im Falle anderer multimerer Proteine nachgewiesen werden, dass bei einem solchen, sich schnell einstellenden Gleichgewicht zwischen verschiedenen Assoziationsformen nicht einzelne, distinkte Peaks bei SEC-Experimenten detektierbar sind, sondern einzelne Peaks mit einem intermediären apparenten Molekulargewicht [250-252].

In dieser Hinsicht weicht die *MeHNL* klar von der strukturell ähnlichen *HbHNL* ab, die sowohl in kristallisierter als auch in gelöster Form als Dimer vorliegt [66].

3.3 Der Einfluss des Puffers auf die Aktivität der *MeHNL*

Die Wahl des Puffers kann unter Umständen einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität eines Enzyms haben. Beispielsweise wurde für die der *MeHNL* ähnlichen HNL aus *Hevea brasiliensis* eine starke Inhibition des Enzyms in Gegenwart von Acetat beobachtet [253, 254]. Aus diesem Grund sollte die Aktivität der *MeHNL* in verschiedenen Puffern untersucht werden.

3.3.1. Die *MeHNL* wird durch Acetat inhibiert

Kriterien für die Auswahl der untersuchten Puffer waren hier zum einen die Möglichkeit zur Abdeckung des pH-Bereichs zwischen pH 3,5 und 6,0, da dieser Bereich bei den nachfolgenden Untersuchungen der pH-Stabilität untersucht werden sollte, zum anderen sollte es sich um möglichst kostengünstige Puffersalze handeln, die prinzipiell auch im technischen Maßstab Anwendung finden können. Diese Voraussetzungen werden durch Citrat-Phosphat-, Acetat-, Glutamat- und Kalium-Phosphat-Puffer erfüllt; darüber hinaus wird Acetat bereits als Puffersalz im technischen Prozess zur Produktion von (*S*)-Mandelonitril genutzt.

Während die *MeHNL* in Citrat-Phosphat-, Glutamat- und Kalium-Phosphat-Puffer eine vergleichbare Aktivität zeigt, konnte im Falle des Acetat-Puffers eine starke Inhibition des Enzyms beobachtet werden (Abb. 3.3).

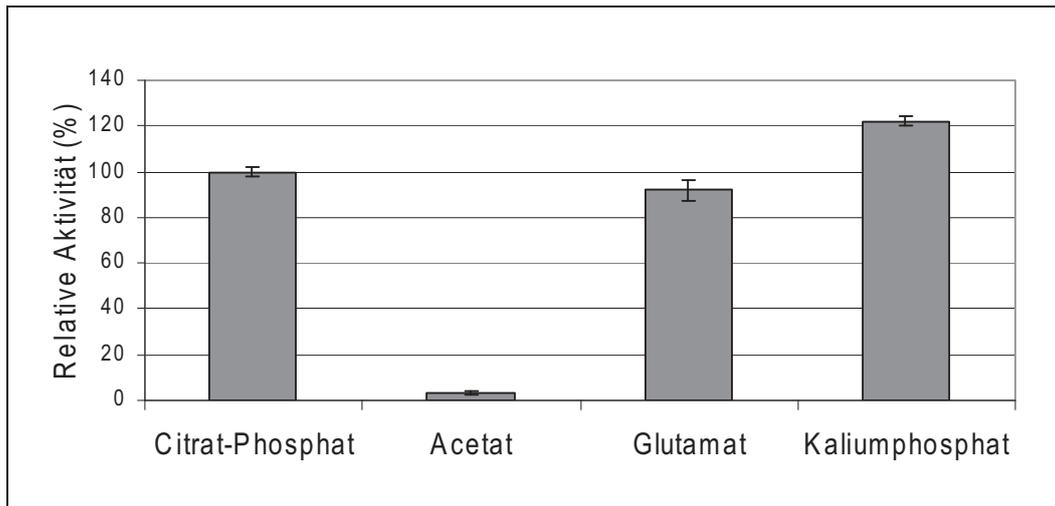


Abbildung 3.3: Aktivität der MeHNL in verschiedenen Puffern bei pH 5,0. Die spezifische Aktivität lag zwischen 1 – 27 U/mg und wurde auf die Aktivität in Citrat-Phosphat-Puffer (=100%) normiert. Die Aktivität wurde durch photometrischen Nachweis der Mandelonitrilspaltung (2.5.1) bestimmt.

Die MeHNL verhält sich demzufolge vergleichbar zur HbHNL [253-255], während das ebenfalls strukturell ähnliche Enzym aus *Arabidopsis thaliana*, anders als die beiden anderen α/β -Hydrolase HNLs, jedoch nicht durch Acetat inhibiert wird (Kapitel 4.1).

Vor allem vor dem Hintergrund, dass auch bei der technischen Anwendung der MeHNL Acetat als Puffersalz verwendet wird, erscheint diese Inhibition problematisch, auch wenn die MeHNL in Acetat-Puffer eine vergleichsweise hohe pH-Stabilität aufweist (Kapitel 3.4.2).

Der molekulare Mechanismus der Acetat-Inhibition wurde deshalb im Folgenden näher untersucht.

3.3.2 Acetat wird im aktiven Zentrum der MeHNL gebunden

Ein Hinweis auf den Inhibitionsmechanismus konnte durch eine Analyse der Kristallstruktur 1dwp [256] der MeHNL gefunden werden. In dieser Kristallstruktur befindet sich ein Acetat-Molekül des bei der Kristallisation verwendeten Puffers innerhalb des aktiven Zentrums. Vergleicht man diese Kristallstruktur mit der MeHNL-Struktur 1dwo, die im aktiven Zentrum Aceton, das Spaltprodukt des natürlichen Substrats Acetoncyanhydrin enthält, so ist deutlich zu sehen, dass sowohl Acetat als auch Aceton innerhalb des aktiven Zentrums fast exakt die gleiche Position besetzen (Abb. 3.4). Dies ist ein Hinweis auf eine kompetitive Inhibition durch Acetat.

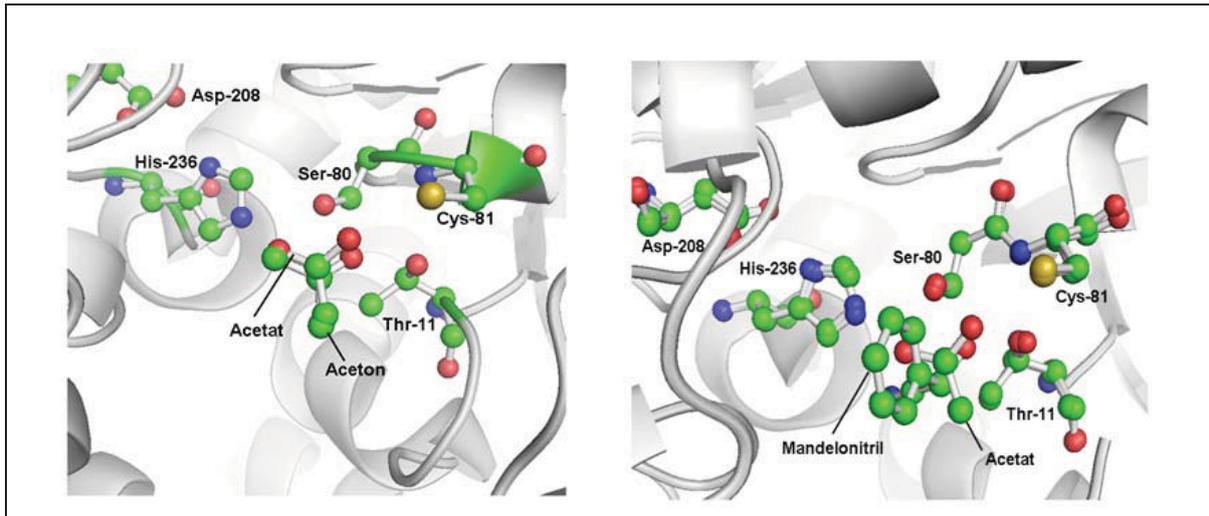


Abbildung 3.4: Links: Überlagerung der Kristallstrukturen 1dwo und 1dwp. Wichtige Aminosäuren des aktiven Zentrums sowie Acetat und Aceton sind hervorgehoben. Rechts: Überlagerung der Kristallstrukturen 1dwp (*MeHNL* mit Acetat) und 1yb6 (*HbHNL* mit Mandelonitril). Wichtige Aminosäuren des aktiven Zentrums der *MeHNL* und der *HbHNL* sind überlagert dargestellt. Die Nummerierung erfolgte entsprechend der Aminosäuresequenz der *MeHNL*. Im aktiven Zentrum sind des weiteren Acetat und Mandelonitril abgebildet.

Da *MeHNL* und *HbHNL* ein hohes Maß an struktureller Ähnlichkeit aufweisen (RMSD aller $C\alpha$ -Atome: 0,42 Å; RMSD der Atome des aktiven Zentrums: 0,23 Å) und für beide Enzyme ein ähnlicher oder sogar identischer katalytischer Mechanismus postuliert wurde [66], ist ein vergleichbarer Mechanismus der Acetat-Inhibierung in beiden Enzymen sehr wahrscheinlich. Um dies zu überprüfen, wurde die das Substrat Mandelonitril beinhaltende Kristallstruktur der *HbHNL* (PDB-Eintrag 1yb6) mit der Acetat beinhaltenden *MeHNL*-Struktur 1dwp verglichen (Abb. 3.4). Wie bereits von Gruber [66] postuliert, ist zu sehen, dass die Position der Aminosäuren des aktiven Zentrums bei beiden Enzymen nahezu identisch ist. Die Tatsache, dass auch bei diesem Strukturvergleich Acetat und Substrat die gleiche Position innerhalb des aktiven Zentrums belegen, lässt darauf schließen, dass auch die *HbHNL* durch eine Acetatbindung innerhalb des aktiven Zentrums kompetitiv inhibiert werden könnte.

Im Falle der *MeHNL* und der *HbHNL* wurde eine Stabilisierung des Spaltungsproduktes Aceton im aktiven Zentrum durch Wasserstoffbrücken zu den Hydroxygruppen des Threonin-11 und des Serin-80 sowie in geringerem Maße zur Thiolgruppe des Cystein-81 postuliert [59, 66].

Sowohl Serin-80 als auch Threonin-11 sind dabei von essenzieller Bedeutung für die Funktion beider Enzyme: Serin als Bestandteil der katalytischen Triade und Threonin bei der korrekten Positionierung des Substrates innerhalb des aktiven Zentrums [40, 58, 66, 257, 258]. Ein Austausch einer dieser beiden Aminosäuren führt zu einer kompletten Inaktivierung beider Enzyme, während ein Austausch des Cystein-81 gegen Alanin ohne große Aktivitätseinbußen möglich ist [59, 66]. Im Gegensatz dazu ist bei der nicht-inhibierten *AiHNL* an Position 11

kein Threonin und an Position 81 kein Cystein vorhanden; bei diesem Enzym wurde ein von den anderen beiden Enzymen abweichender Reaktionsmechanismus postuliert [56] (Kapitel 1.2.3, 1.2.4, Abb. 3.5 & 3.7).

<p> <i>Me</i>HNL: LIHT<u>I</u>CHGAW...GES<u>S</u>CAGLN <i>Hb</i>HNL: LIHT<u>I</u>CHGAW...GES<u>C</u>GGLN <i>At</i>HNL: LVH<u>N</u>AYHGAG...G<u>F</u>S<u>F</u>GGIN </p>
--

Abbildung 3.5: Primärstrukturen der *Me*HNL, der *Hb*HNL und der *At*HNL. Bei der *Me*HNL und der *Hb*HNL sind die für die Substratstabilisierung verantwortlichen Reste Threonin-11 und Cystein-81 (Nummerierung nach *Me*HNL-Sequenz) unterstrichen und das katalytisch aktive Serin fett gedruckt. *Me*HNL und *Hb*HNL unterscheiden sich in diesem Teil ihrer Sequenzen nur an Position 82 (*Me*HNL: Alanin; *Hb*HNL: Glycin). Im Vergleich ist unten die Aminosäuresequenz der *At*HNL gezeigt, wobei die von der *Me*HNL-Sequenz abweichenden Aminosäuren rot dargestellt sind. Die Positionen 11 und 81 sind auch hier unterstrichen.

3.3.3 Auch die Variante C81A wird durch Acetat inhibiert

Die Inhibition der *Me*HNL durch Acetat kann prinzipiell ein Problem bei ihrer Nutzung darstellen, da Acetat aus verschiedenen Gründen häufig in bestehenden industriellen Hydrocyanierungsprozessen verwendet wird. Gründe für die Nutzung von Acetat sind z.B. der im Sauren liegende Pufferungsbereich, die verhältnismäßig geringe Kohlenstofflast im Abwasser und der relativ niedrige Preis. Vor diesem Hintergrund erschien es sinnvoll, die bestehende *Me*HNL-Variante C81A auf ihre Aktivität in Acetat-Puffer zu überprüfen, da bei dieser im Vergleich zum Wildtyp Acetat durch eine Wasserstoffbrücke weniger im aktiven Zentrum stabilisiert wird.

Die Variante *Me*HNL-C81A wurde entsprechend dem für den Wildtyp verwendeten Protokoll gereinigt (Tab. 3.3). Anschließend wurde die gereinigte Variante *Me*HNL-C81A auf ihre Aktivität in Citrat-Phosphat- und Acetat-Puffer überprüft (Abb. 3.6).

Tabelle 3.3: Reinigung der *Me*HNL-C81A durch SEC und AEC.

Reinigungsschritt	Volumetrische Aktivität (U/ml)	Protein-Gehalt (mg/ml)	Gesamtaktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	99	9,5	3663	10,4	100	1
SEC (Sephadex G-25)	17	1,9	3060	9	84	0,9
AEC (Q-Sepharose FF)	62	0,9	2480	69	68	6,6

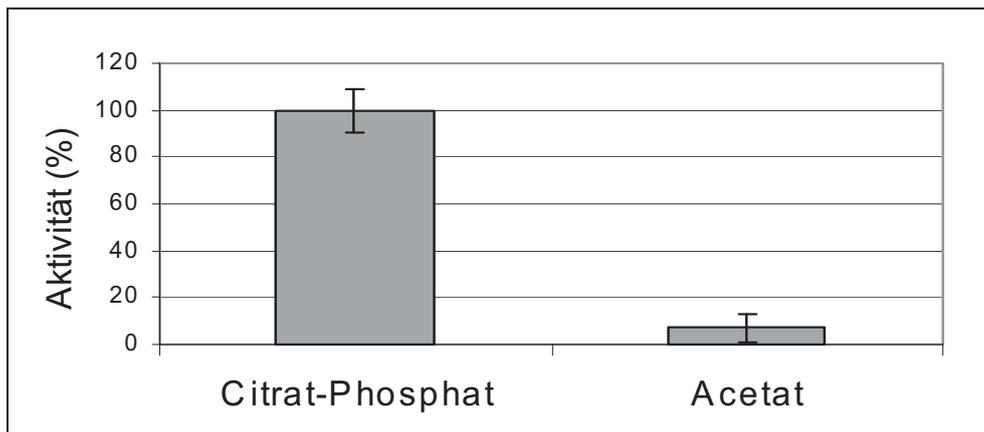


Abbildung 3.6: Aktivität der MeHNL-C81A in Citrat-Phosphat- und Acetat-Puffer. Die spezifischen Aktivitäten lagen zwischen 4,5-62 U/mg und wurden auf die Aktivität in Citrat-Phosphat-Puffer normiert. Die Aktivität wurde durch photometrischen Nachweis der Mandelonitrilspaltung (2.5.1) bestimmt.

Die spezifische Aktivität entspricht mit 69 U/ mg in etwa 85 % der Wildtyp-Aktivität, was in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten liegt [59].

Bei der anschließenden Bestimmung der Aktivität in Citrat-Phosphat- und Acetat-Puffer zeigte sich jedoch, dass auch die Variante C81A stark durch Acetat inhibiert wird (Abb. 3.6). Dies lässt darauf schließen, dass das im aktiven Zentrum vorhandene Acetat in erster Linie durch die Aminosäuren Threonin-11 und Serin-80 stabilisiert wird, wie auch bereits von Lauble *et al.* [59] für die MeHNL postuliert wurde. Da beide Aminosäuren für die Funktion der MeHNL essenziell sind, erscheint es unwahrscheinlich, dass die Acetat-Inhibierung des Enzyms durch den Austausch einer oder weniger Aminosäuren umgangen werden kann. Vielmehr bedarf es wahrscheinlich einer wesentlich veränderten Architektur des aktiven Zentrums zusammen mit einem damit einhergehenden veränderten Substratbindungsmechanismus, wie er im Falle der AtHNL postuliert wurde, um diese Inhibition zu vermeiden (Kapitel 1.2.3, 1.2.4, 4.1, Abb. 3.7).

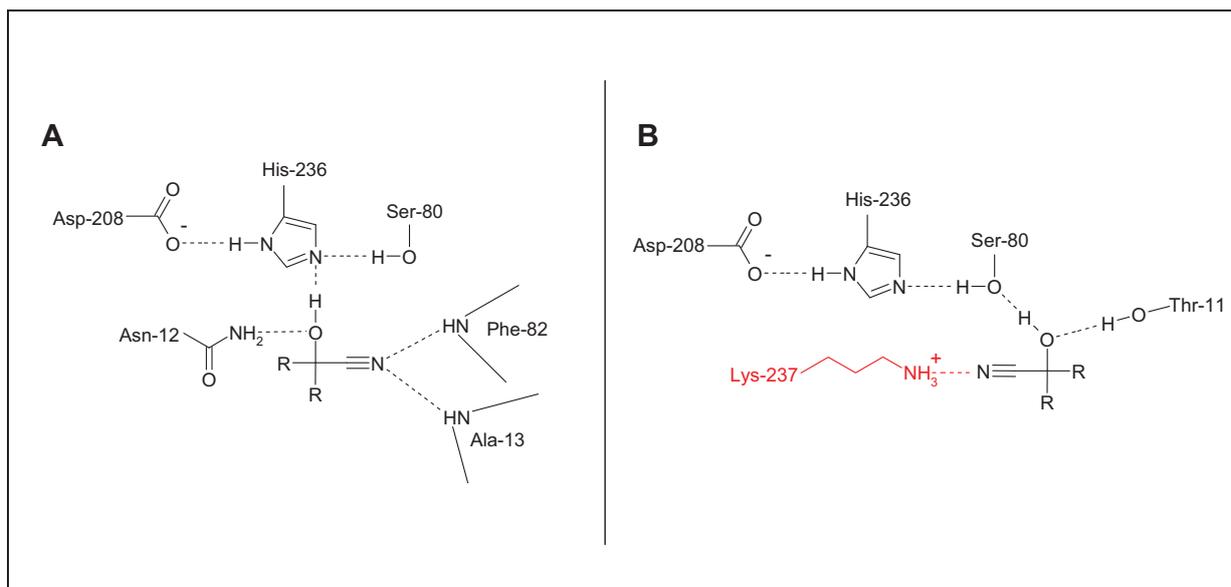


Abbildung 3.7: Stabilisierung der Substrate im aktiven Zentrum der *AtHNL* (A) und der *MeHNL/HbHNL* (B). Bei der *AtHNL* wird eine Stabilisierung der Cyanogruppe des Cyanhydrin-Substrats über Wasserstoffbrücken zu den Amidgruppen von Alanin-13 und Phenylalanin-82 und einem Helixdipolmoment sowie eine Stabilisierung der Hydroxylgruppe über die Carboxamidgruppe des Asparagin-12 postuliert. Anders als bei der *MeHNL* oder *HbHNL* interagiert das katalytisch aktive Histidin direkt mit der OH-Gruppe des Substrates. Bei *HbHNL* und *MeHNL* findet eine Stabilisierung des Cyanohydrins in erster Linie über Threonin-11 und Serin-80 statt. Unklar ist bislang die Rolle des Lysin-237 (rot) beim katalytischen Mechanismus der *MeHNL*. Modifiziert nach [56].

3.4 Der Einfluss des pH-Wertes auf Aktivität und Stabilität der *MeHNL*

Bei vielen Enzymen übt der Protonierungszustand der aktiven Reste einen großen Einfluss auf die enzymatische Aktivität aus, da ihre Katalysemechanismen auf den Transfer von Protonen angewiesen sind [259]. Dies gilt auch für den katalytischen Mechanismus der *MeHNL* [66]. Zudem kann sich eine Veränderung des pH-Wertes stark auf die Stabilität eines Enzyms auswirken [147]. Besonders im Falle der HNLs ist eine Stabilität im sauren pH-Bereich von Interesse, da die technische Anwendung dieser Enzyme oft einen niedrigen pH-Wert erfordert, um die basenkatalysierte chemische Nebenreaktion zu unterdrücken und die jeweiligen Reaktionsprodukte zu stabilisieren [12]. Aus diesen Gründen sollte der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität und die Stabilität der *MeHNL* näher untersucht werden.

3.4.1 Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der *MeHNL*

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der *MeHNL* wurde in Citrat-Phosphat-Puffer einem pH-Bereich von pH 3,5 – 6,0 untersucht.

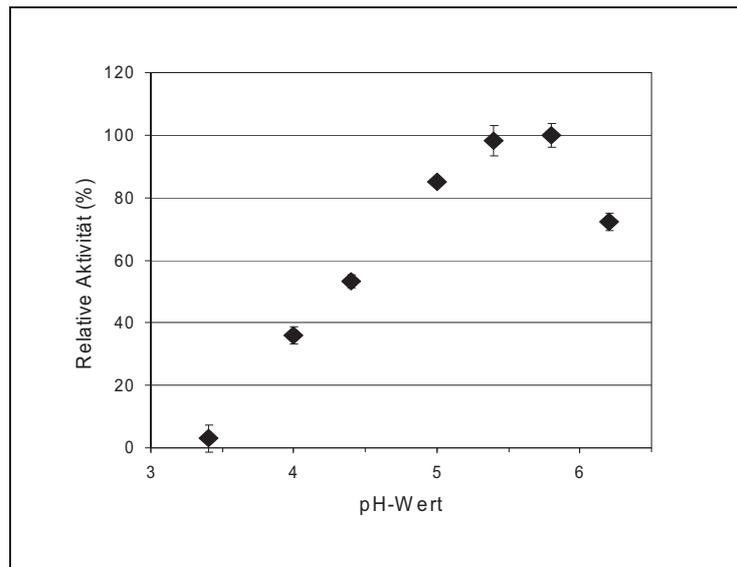


Abbildung 3.8: Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der *MeHNL* in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die spezifischen Aktivitäten wurden auf den Maximalwert bei pH 5,7 (=100%, entsprechend 81 U/mg) normiert.

Das pH-abhängige Aktivitätsoptimum der *MeHNL* liegt bei pH 5,7. Unterhalb von pH 3,5 ist das Enzym nahezu inaktiv, jedoch zeigt es bereits bei pH 4,0 ca. 40% seiner maximalen Aktivität. Im Hinblick auf das Aktivitätsmaximum sind diese Ergebnisse vergleichbar mit denen früherer Studien, bei denen die pH-abhängige Spaltung von Acetoncyanhydrin untersucht wurde. Die *MeHNL* wies dort eine maximale Aktivität bei pH 5,5 auf [64, 260]. Allerdings waren die Aktivitäten im sauren Bereich (pH 4) dort teilweise deutlich niedriger und variierten auch zwischen den beiden genannten Studien, was möglicherweise auf unterschiedliche experimentellen Vorgehensweisen in allen drei Fällen zurückzuführen ist. Für die homologe *HbHNL* in ihrer nicht-rekombinanten Form konnte eine ähnliche Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert gezeigt werden [255].

3.4.2 Die *MeHNL* ist im sauren pH-Bereich stabil

Von den bislang charakterisierten HNLs zeigt nur die *PaHNL* ein hohes Maß an Stabilität im sauren pH-Bereich [35]. Eine systematische Untersuchung der pH-Stabilität der *MeHNL*, wie sie z.B. auch für die homologe *HbHNL* durchgeführt wurde [253, 254, 261], fehlte bislang. Deshalb wurde die Stabilität der *MeHNL* in den vier Puffern Acetat, Citrat-Phosphat, Glutamat und Kaliumphosphat in einem pH-Bereich von 4,0 – 6,0 untersucht.

Da die Inaktivierung von Enzymen oft mit der Bildung unlöslicher Proteinaggregate einhergeht, wurde neben der Entwicklung der Aktivität auch die Entwicklung des löslichen Proteingehaltes beobachtet. In Abb. 3.9 sind repräsentativ die Entwicklung von Aktivität und Prote-

ingehalt in Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 6,0 und pH 4,0 dargestellt. Eine komplette Aufstellung aller ermittelten Aktivitäts-Halbwertszeiten ist in Tab. 3.4 gezeigt.

Tabelle 3.4: Halbwertszeiten (h) der MeHNL in verschiedenen Puffern bei verschiedenen pH-Werten. Die Inkubation erfolgte bei RT. a: Die Halbwertszeit wurde innerhalb des angegebenen Zeitraums nicht überschritten. n.b.: Wert wurde nicht bestimmt. Da unterhalb von pH 4,0 aufgrund der Unterschreitung der Pufferungsbereiche der verschiedenen Puffersysteme die pH-Werte nur schwierig einzustellen waren, wurden die pH-Werte als < 4 zusammengefasst.

pH-Wert	Acetat	Citrat-Phosphat	Glutamat	Kalium- Phosphat
< 4,0	2,5 (pH 3,8)	0,5 (pH 3,7)	0,45 (pH 3,2)	0,4 (pH 3,5)
4,0	14	2	4	9
4,6	> 48 ^a	13	> 48 ^a	n.b.
5,0	> 168 ^a	72	> 144 ^a	> 48 ^a
5,4	> 96 ^a	> 96 ^a	> 96 ^a	> 96 ^a
6,0	> 240 ^a	> 240 ^a	> 240 ^a	> 240 ^a

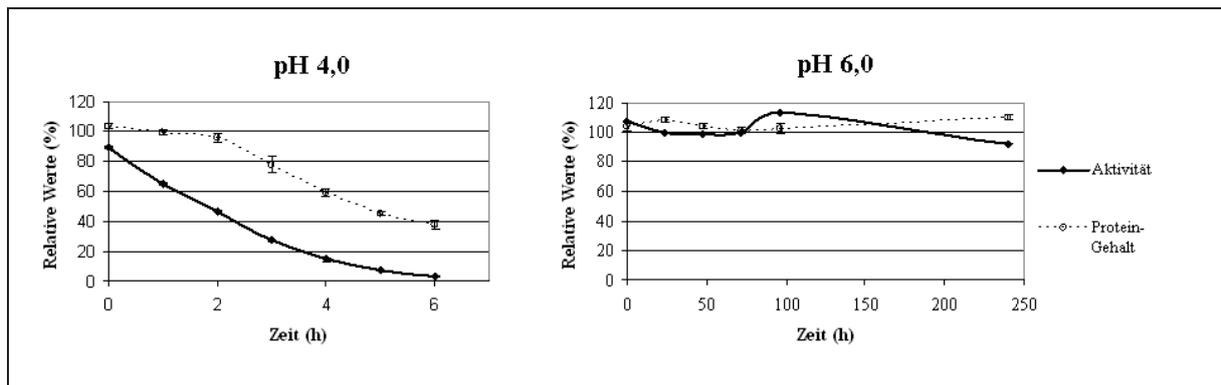


Abbildung 3.9: Zeitliche Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der MeHNL in Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 4,0 (links) und pH 6,0 (rechts). Dargestellt sind prozentuale Werte bezogen auf Aktivität und Proteingehalt zu Beginn der Inkubation.

Eine Inaktivierung der MeHNL konnte vor allem bei den pH-Werten unterhalb von pH 5,0 beobachtet werden. Oberhalb von pH 5,0 zeigt das Enzym unter den hier gewählten Bedingungen eine gute Stabilität. Der Verlust von Aktivität bei den niedrigeren pH-Werten geht mit einem zeitlich verzögerten Absinken des löslichen Proteingehaltes einher, was ein Hinweis auf einen Aggregationsprozess sein kann.

Hinsichtlich der pH-Stabilität ist die MeHNL der verwandten HbHNL deutlich überlegen: während beispielsweise bei pH 5,0 für die MeHNL in allen getesteten Puffern Halbwertszeiten von mehr als 48 h dokumentiert werden konnten, lagen die Halbwertszeit der HbHNL bei diesem pH, je nach genutztem Puffer, im Bereich zwischen 4 und 7 h. Auch unterhalb von

pH 5 war die *MeHNL* deutlich stabiler: während die *HbHNL* bei einem pH von 4,0 in Glutamat-Puffer eine Halbwertszeit von 67 min aufwies [253], lag diese mit 4 h für die *MeHNL* deutlich höher.

3.4.3 Die Sekundärstruktur der *MeHNL* bleibt bei niedrigem pH-Wert weitgehend erhalten

Der pH-abhängige Inaktivierungsprozess der *MeHNL* geht offenbar mit einer Aggregation des Enzyms einher (Kapitel 3.4.2). Dies kann auf eine zumindest partielle Entfaltung des Enzyms zurückgeführt werden (Kapitel 1.3.3, 1.3.5). Um den möglichen Effekt des pH-Wertes auf die Sekundärstruktur der *MeHNL* identifizieren und quantifizieren zu können, wurde diese unter denaturierenden Bedingungen mittels CD-Spektroskopie untersucht. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie können verschiedene Sekundärstrukturelemente eines Proteins aufgrund ihres unterschiedlichen dichroitischen Absorptionsverhaltens im fernen UV-Bereich identifiziert werden (Abb. 3.10). Wirkt sich ein denaturierender Einfluss wie der pH-Wert auf die Sekundärstrukturelemente des jeweiligen Enzyms aus, kann man diesen Prozess im CD-Spektrum verfolgen, sofern das Protein nicht vollständig präzipitiert wird.

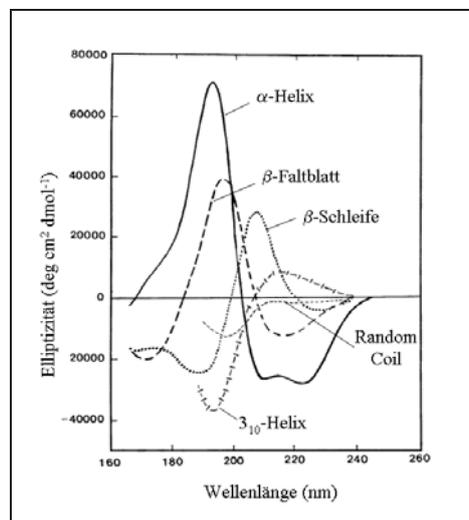


Abbildung 3.10: Charakteristische CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturelemente. Modifiziert nach Kelly [262].

Um eine mögliche Veränderung der Sekundärstruktur der *MeHNL* quantifizieren zu können, wurden zunächst Spektren der nativen *MeHNL* in Citrat-Phosphat-Puffer, pH 6,0, sowie einer denaturierten Probe in 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GnHCl), jeweils in einer Konzentration von 0,1 mg/ml, aufgezeichnet (Abb. 3.11). Beim Vergleich der beiden Spektren lässt sich im Falle des nativen Enzyms eine deutliche negative Elliptizität im Bereich von 210 – 230 nm

erkennen, die bei der denaturierten Probe nicht zu sehen ist. Die negative Elliptizität in diesem Spektralbereich ist auf die α -helikalen Anteile des Proteins zurückzuführen [262]. Da diese Elliptizität im Falle des GnHCl-denaturierten Enzyms nicht vorhanden ist, kann davon ausgegangen werden, dass eine Entfaltung α -helikaler Strukturen der MeHNL CD-spektroskopisch erfasst werden kann. Bei Wellenlängen unterhalb von 210 nm konnten aufgrund der niedrigen Signalstärke keine Messungen durchgeführt werden, so dass eventuell auftretende Veränderungen der vorhandenen β -Faltblattstrukturen nicht sichtbar waren.

Da die Unterschiede zwischen den Spektren der nativen und der denaturierten Form des Enzyms hinreichend groß waren, konnte unter Nutzung der Elliptizitätswerte bei 222 nm beider Spektren entsprechend 2.6.1 eine Zwei-Punkte-Kalibration erstellt werden, mit deren Hilfe das Maß struktureller Änderungen quantifiziert wurden (Abb. 3.11).

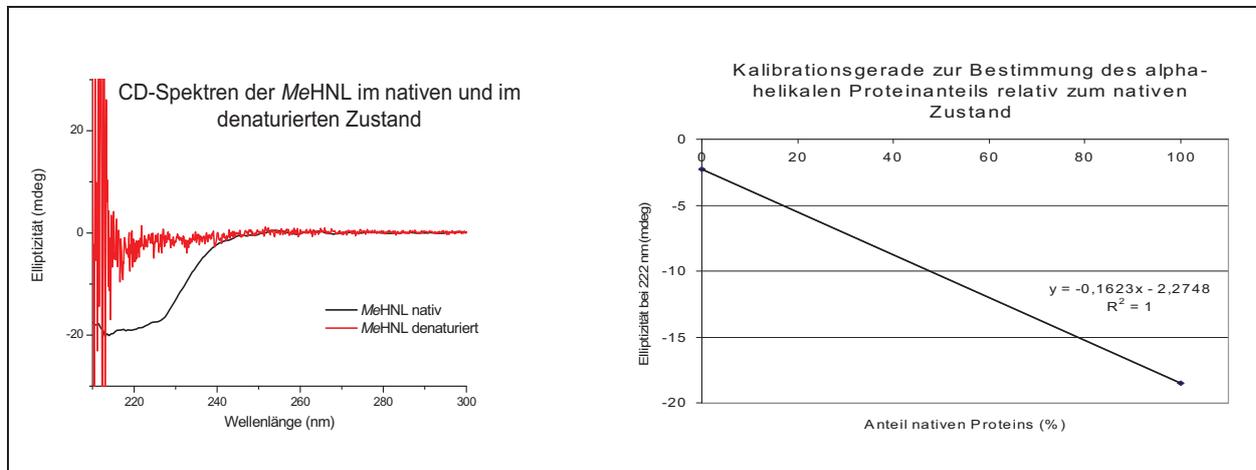


Abbildung 3.11: Links: CD-Spektren der MeHNL im nativen (schwarz) und denaturierten Zustand (rot). Rechts: Kalibrationsgerade zur Bestimmung des α -helikalen Proteinanteils relativ zum nativen und denaturierten Zustand.

Zur Analyse möglicher Veränderungen der Sekundärstruktur der MeHNL bei pH 4,0 wurden über einen Zeitraum von 220 min Spektren des Enzyms im Bereich von 210-300 nm aufgezeichnet (Abb. 3.13). Anschließend wurde anhand der Eichgeraden der Anteil nativen Proteins errechnet und gegen die Inkubationszeit aufgetragen (Abb. 3.13). Zur Kontrolle wurden dieselben Messungen ebenfalls bei pH 6,0 durchgeführt, wo das Enzym im gleichen Zeitraum keinen Aktivitätsverlust aufwies und deshalb keine strukturelle Veränderung erwartet und beobachtet wurde (Abb. 3.12). Bei der bei pH 4,0 inkubierten Probe hingegen waren vom Beginn der Messung an im Vergleich zur nativen pH 6,0-Probe nur ca. 80 % der α -helikalen Struktur vorhanden. Dieser Wert änderte sich im hier beobachteten Zeitraum nicht signifikant. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es direkt bei der Umpufferung des Enzyms in Citrat-Phosphat-Puffer, pH 4,0, zu einer schnellen Strukturänderung kam, die aufgrund ihrer Geschwindigkeit jedoch nicht mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau aufgelöst werden

konnte. Ferner kann eine strukturelle Veränderung der β -Faltblattanteile nicht ausgeschlossen werden. Die Ursache hierfür ist die unterhalb von 210 nm stark abfallende Signalstärke, die in dem für β -Faltblätter charakteristischen Absorptionsbereich keine akkuraten Messungen zuließ.

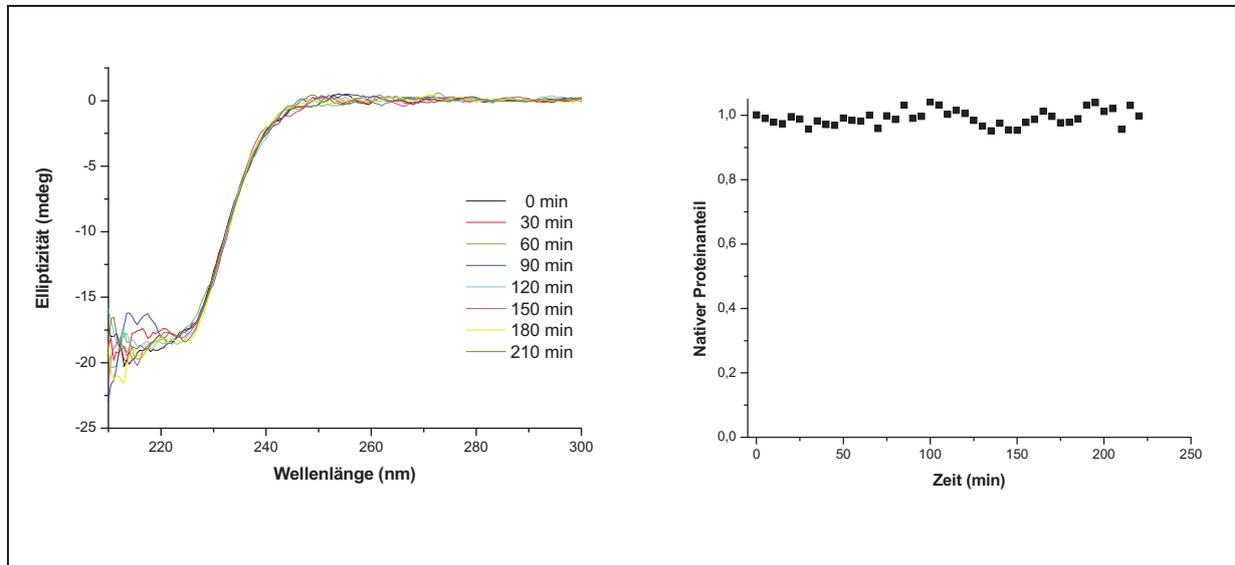


Abbildung 3.12: Einfluss von pH 6,0 auf die Sekundärstruktur der MeHNL. Links: Ausgewählte CD-Spektren der MeHNL bei pH 6,0 über einen Zeitraum von 220 min. Rechts: Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei pH 6,0.

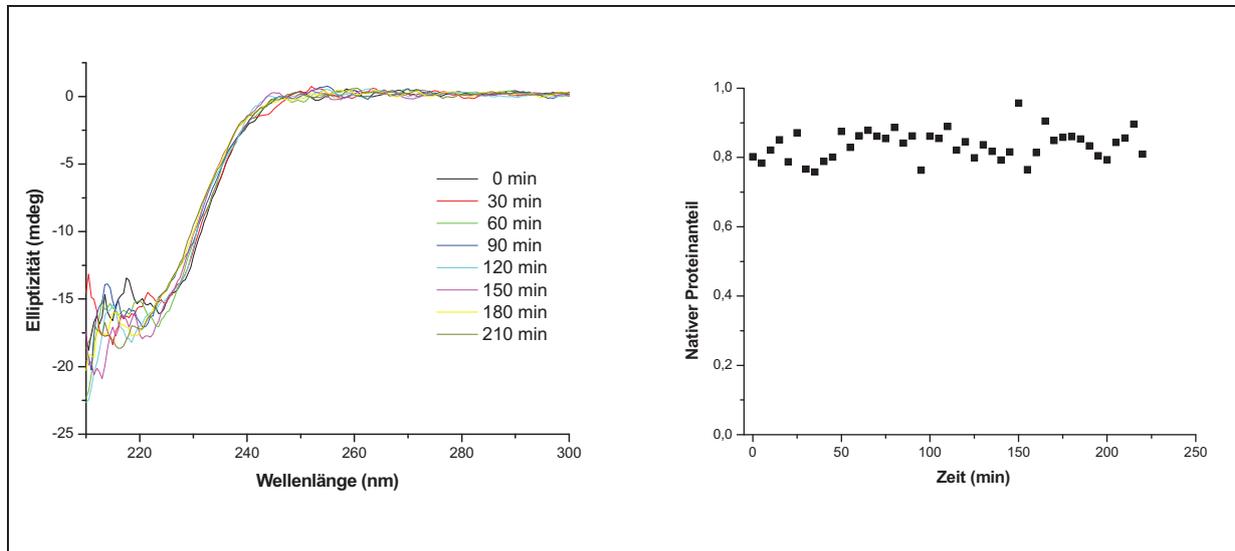


Abbildung 3.13: Einfluss von pH 4,0 auf die Sekundärstruktur der MeHNL. Links: Ausgewählte CD-Spektren der MeHNL bei pH 4,0 über einen Zeitraum von 220 min. Rechts: Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei pH 4,0.

3.4.4 Mittels Fluoreszenzspektroskopie kann eine strukturelle Veränderung beobachtet werden

Neben der CD-Spektroskopie können strukturelle Veränderungen eines Proteins auch mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert werden. Diese Methode beruht auf einer Veränderung

der intrinsischen Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan, welche stark von dessen jeweiliger Umgebung abhängig ist. Während freies Tryptophan in wässriger Lösung nach Anregung bei 295 nm ein Emissionsmaximum bei ca. 350 nm aufweist, kann die Emissionswellenlänge eines im Proteininneren vorliegenden Tryptophanrests, bedingt durch dessen geringe Beweglichkeit und die hydrophobe Umgebung, deutlich zu niedrigeren Wellenlängen verschoben sein (Blauverschiebung) [102]. Bei einer Entfaltung des Proteins kann das Tryptophan mit dem polaren Umgebungswasser in Kontakt kommen, so dass sich das Emissionsmaximum wieder dem des freien Tryptophans annähert (Rotverschiebung) [102]. Anders als bei der CD-Spektroskopie können bei der Fluoreszenz-Spektroskopie je nach Lage der Tryptophanreste auch Veränderungen der Tertiärstruktur beobachtet werden [263].

Wie in Abb. 3.14 ersichtlich ist, verfügt die *MeHNL* über insgesamt fünf Tryptophanreste pro Untereinheit. Zwei dieser Tryptophanreste (17 & 19) befinden sich nahe bzw. an der Grenzfläche der beiden Untereinheiten. Von den übrigen drei Tryptophanresten ist eines an der Oberfläche des Proteins lokalisiert (218), während die beiden anderen (128 & 204) im Inneren der Struktur liegen.

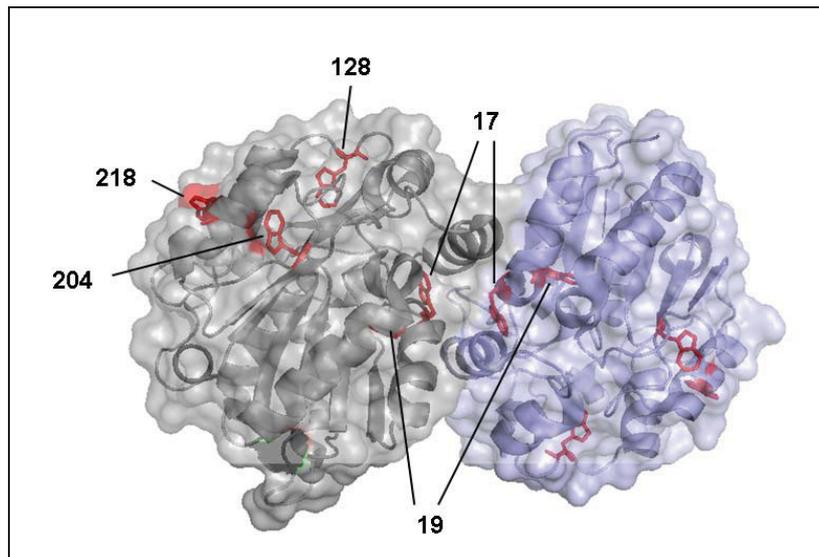


Abbildung 3.14: Lage der Tryptophanreste in der *MeHNL* (Struktur 1dwp). Die beiden Untereinheiten sind farblich voneinander abgesetzt, die Tryptophanreste sind rot hervorgehoben.

Um eine strukturelle Veränderung der *MeHNL* fluoreszenzspektroskopisch quantifizieren zu können, wurden zunächst Emissionsspektren des nativen Zustandes der *MeHNL* in Citrat-Phosphat-Puffer (pH 6,0) mit dem in 6 M GnHCl denaturierten Enzym verglichen (Abb. 3.15). Nach der Denaturierung konnte hier eine deutliche Rotverschiebung des Emissionsmaximums von 328 (nativ) nach 348 nm (denaturiert) beobachtet werden. Das Emissionsmaximum des denaturierten Zustands liegt dabei mit 348 nm nahe an dem von freiem Tryptophan in Lösung mit 350 nm [102]. Eine signifikante pH-induzierte Entfaltung der *MeHNL* sollte

somit also fluoreszenzspektroskopisch nachgewiesen werden können.

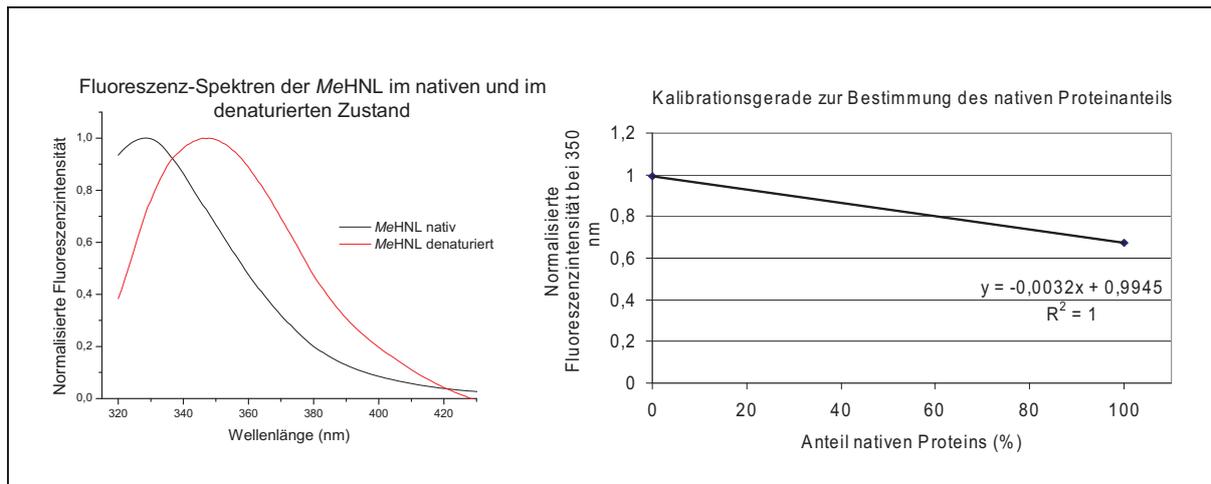


Abbildung 3.15: Links: Fluoreszenzspektren der *MeHNL* im nativen (schwarz) und denaturierten Zustand (rot). Die Spektren wurden auf 1 normalisiert. Rechts: Kalibrationsgerade zur Bestimmung des nativen Proteinanteils. Es wurde die normalisierte Fluoreszenzintensität bei 350 nm gegen den Anteil nativen Proteins aufgetragen. Die selektive Anregung der Tryptophanfluoreszenz erfolgte mit Licht der Wellenlänge 295 nm. Alle Spektren wurden bei 25°C aufgezeichnet, die Schlitzweite wurde für Anregung und Emission auf 10 nm eingestellt.

Zur Bestimmung des nativen Proteinanteils in einer Probe wurde zunächst entsprechend 2.6.2 eine Kalibrationsgerade erstellt (Abb. 3.15). Als 100 % natives Protein wurde hier die normierte Emissionsintensität bei 350 nm der pH 6,0-Probe genutzt, als 0%-Wert diente die normierte Emissionsintensität der GnHCl-denaturierten Probe.

Die pH-abhängigen Denaturierung der *MeHNL* wurde über einen Zeitraum von 3,5 h bei pH 4,0 verfolgt (Abb. 3.17). Zur Kontrolle wurde das gleiche Experiment bei einem pH von 6,0 durchgeführt, bei dem keine strukturelle Änderung des Enzyms erwartet und beobachtet wurde (Abb. 3.16).

Im Gegensatz zu pH 6,0 zeigt die *MeHNL* bei pH 4,0 deutliche Verschiebungen in der Tryptophan-Fluoreszenz, die auf eine Entfaltung des Enzyms deutet (Abb. 3.17). In den ersten drei Stunden nach Beginn der Inkubation sinkt der Anteil nativen Proteins auf ca. 70% des Ausgangswertes, danach treten keine weiteren Änderungen des Fluoreszenzverhaltens mehr auf.

Wie auch bei der CD-spektroskopischen Analyse des Denaturierungsvorganges gezeigt werden konnte, führt die Inkubation der *MeHNL* bei einem sauren pH-Wert nicht zu einer kompletten Entfaltung des Enzyms, vielmehr scheint der niedrige pH-Wert eine eher partielle strukturelle Veränderung hervorzurufen.

Im Gegensatz zu den Veränderungen der α -helikalen Struktur, die offenbar direkt bei der Umpufferung des Enzyms auftreten, konnte mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie eine progressiv fortschreitende strukturelle Veränderung festgestellt werden, die nach ca. 3 Stunden beendet ist.

Es lässt sich jedoch nicht mit Sicherheit sagen, welcher Teil des Enzyms von diesen strukturellen Veränderungen effektiv betroffen ist, da jedes Monomer der *MeHNL* insgesamt fünf verschiedene Tryptophanreste beinhaltet, die sich an verschiedenen Positionen der Struktur befinden (Abb. 3.14).

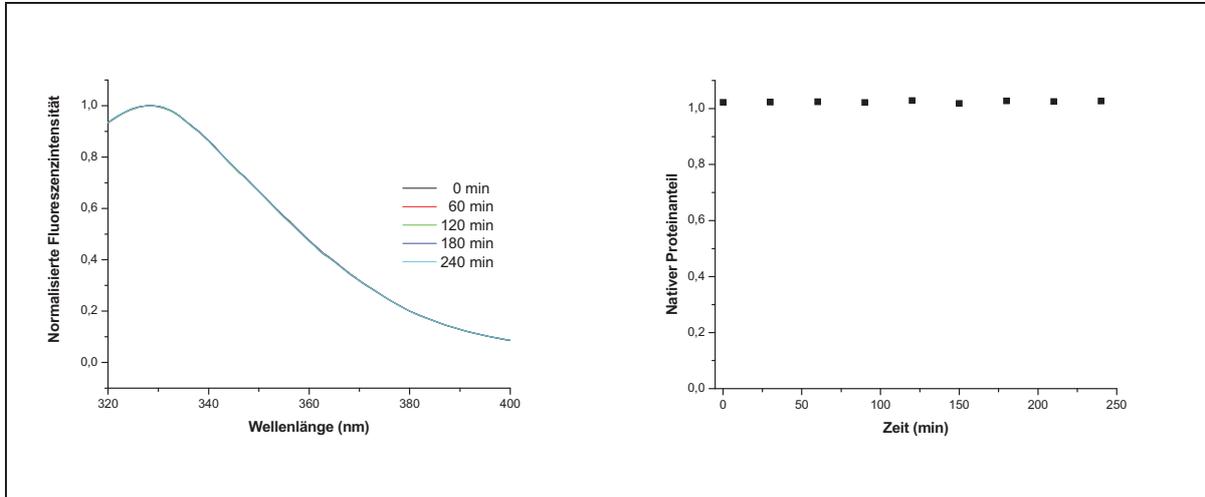


Abbildung 3.16: Einfluss von pH 6,0 auf die Struktur der *MeHNL*. Links: Normalisierte Fluoreszenzspektren der *MeHNL* bei pH 6,0 über einen Zeitraum von 240 min. Innerhalb dieses Zeitraumes konnte keine Veränderung der Spektren beobachtet werden. Rechts: Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei pH 6,0.

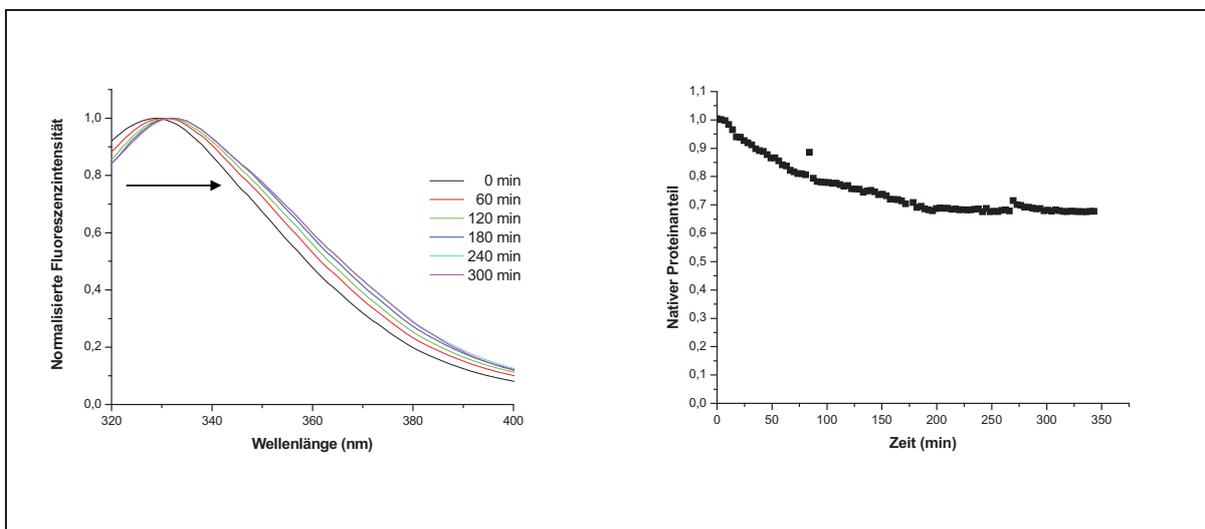


Abbildung 3.17: Einfluss von pH 4,0 auf die Struktur der *MeHNL*. Links: Ausgewählte normalisierte Fluoreszenzspektren der *MeHNL* bei pH 4,0 über einen Zeitraum von 300 min. Der Pfeil zeigt die Richtung der Verschiebung der Emissionsspektren an. Das Emissionsmaximum verschiebt sich während der Inkubation von 329 nach 333 nm. Rechts: Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei pH 4,0.

3.4.5 Ein niedriger pH-Wert bewirkt eine Aggregation der *MeHNL*

Nach einer partiellen oder kompletten Entfaltung sind Proteine irreversiblen Inaktivierungsprozessen wie z.B. der Aggregation leichter zugänglich als im nativen Zustand [103].

Mittels CD- und Fluoreszenzspektroskopie konnte ein Verlust nativer Struktur der *MeHNL* in Gegenwart eines niedrigen pH-Werts gezeigt werden. Zudem wurde im Verlauf der Halbwertszeitbestimmungen eine mit dem Aktivitätsverlust einhergehende Abnahme des löslichen Proteingehaltes beobachtet, was auf eine Aggregation hindeutet.

Aus diesen Gründen sollte das Aggregationsverhalten der *MeHNL* in Abhängigkeit des pH-Wertes mittels statischer Lichtstreuung (SLS) näher analysiert werden. Bei SLS-Experimenten wird die zu analysierende Probe, anders als bei CD- oder Fluoreszenz-Messungen, mit Licht einer Wellenlänge bestrahlt, die sich weitab des Absorptionsbereichs des zu untersuchenden Moleküls befindet. Trifft ein solcher Lichtstrahl auf einen Partikel in der Lösung, kommt es zu einer Streuung des Lichts. Die Intensität des Streulichts ist dabei neben der Wellenlänge vor allem von der Größe der streuenden Partikel abhängig. Diese Eigenschaft ermöglicht es, die Aggregation eines Proteins in Lösung anhand der Streulichtintensität zu verfolgen.

Zur Untersuchung der Aggregation wurde die *MeHNL* bei pH 4,0 inkubiert, und die Entwicklung der Streulichtintensität wurde bei einer Wellenlänge von 500 nm beobachtet (2.6.3). Zur Kontrolle wurde auch die Entwicklung der Streulichtintensität bei einem pH von 6,0 verfolgt, bei dem keine signifikante Aggregation erwartet wurde (Abb. 3.18).

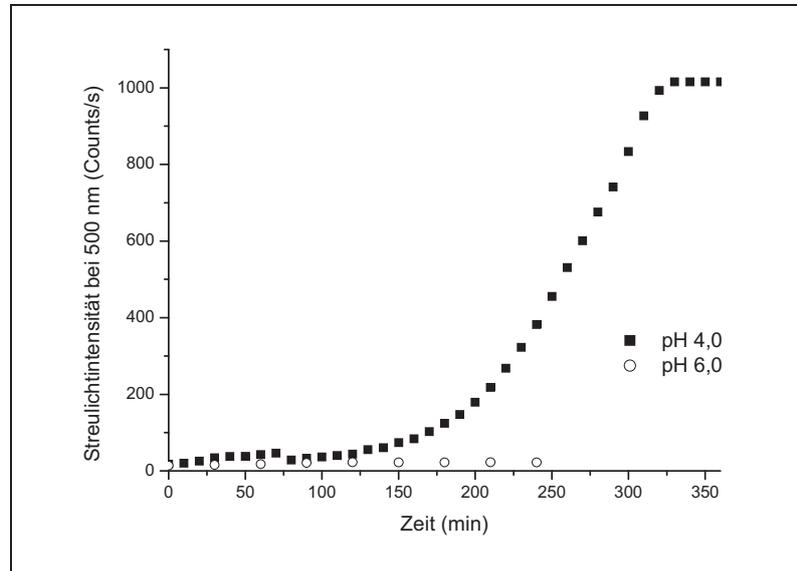


Abbildung 3.18: Zeitliche Entwicklung der Streulichtintensität bei 500 nm in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die *MeHNL* wurde in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml in Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 4,0 oder 6,0 bei 25°C inkubiert.

Wie erwartet, bleibt die Streulichtintensität bei pH 6,0 über einen Zeitraum von vier Stunden konstant auf einem niedrigen Niveau.

Bei pH 4,0 hingegen kann ca. zwei Stunden nach dem Beginn der Inkubation ein starker Anstieg der Lichtstreuung beobachtet werden, bis nach ca. fünf Stunden das obere Detektionsli-

mit des Photometers von 1015 Counts/s überschritten ist. Diese durch den niedrigen pH-Wert bedingte Zunahme der Partikelgröße lässt auf einen Aggregationsprozess schließen. Die hier gezeigte zeitliche Verzögerung der Aggregation von zwei Stunden konnte bereits bei der Abnahme des löslichen Proteingehalts beobachtet werden.

3.4.6 Der Effekt eines niedrigen pH-Wertes auf die Struktur der MeHNL

In Abb. 3.19 sind die bislang diskutierten Effekte eines niedrigen pH-Wertes auf die MeHNL zusammenfassend dargestellt.

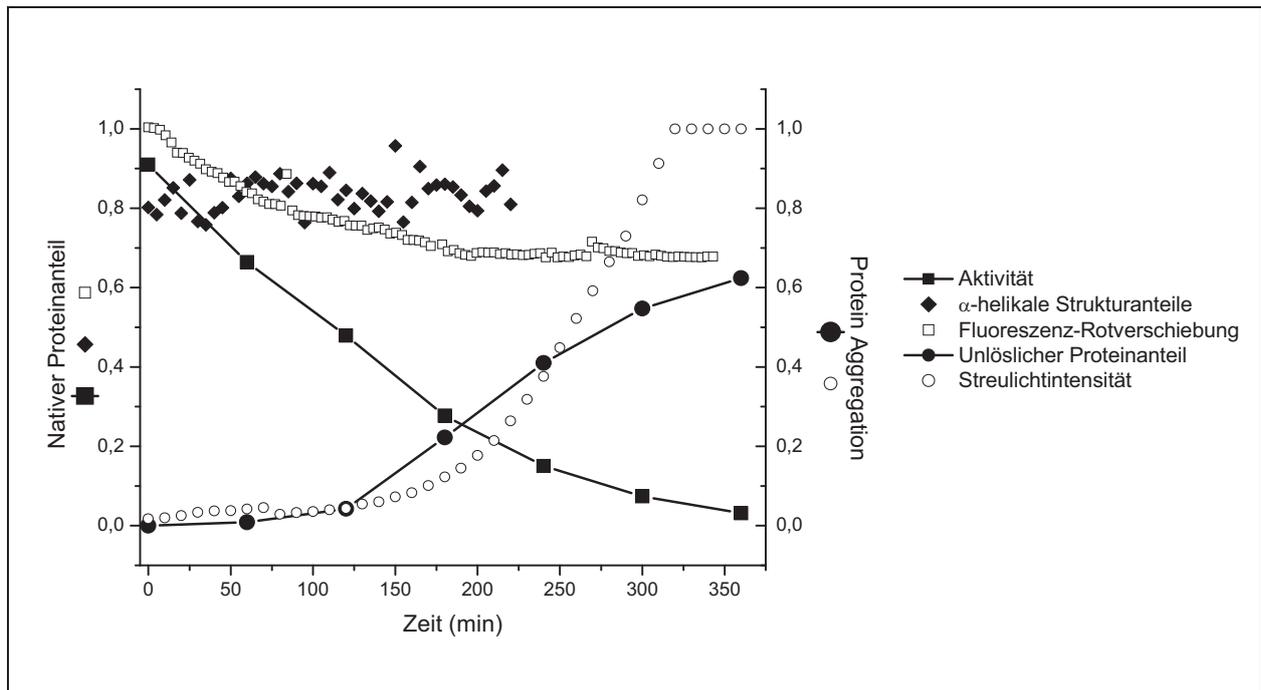


Abbildung 3.19: Der Einfluss von pH 4,0 auf die strukturelle Integrität und das Aggregationsverhalten der MeHNL. Linke Y-Achse: Abnahme des nativen Proteinanteils. Es sind die Abnahme der Aktivität (relativ zum Startwert), die Abnahme der α -helikalen Strukturelemente (relativ zum nativen und denaturierten Protein) und die relative Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums (relativ zum nativen und denaturierten Protein) dargestellt. Rechte Y-Achse: Zunahme der Proteinaggregate. Abgebildet sind die Zunahme des unlöslichen Proteinanteils (invertierte Abnahme des löslichen Anteils relativ zum Startwert) sowie die Zunahme der Streulichtintensität (relativ zum Detektionsmaximum des Photometers).

Die bei den Aktivitätsmessungen beobachtete, über einen Zeitraum von sechs Stunden progressiv verlaufende Inaktivierung des Enzyms bei pH 4,0 ist offenbar eher auf eine partielle als auf eine komplette Entfaltung der MeHNL zurückzuführen, wie sie nach der Inkubation mit 6 M GnHCl beobachtet wurde. Unmittelbar bei der Absenkung des pH-Wertes verringert sich der α -helikale Anteil des Enzyms. Nach diesem äußerst schnell verlaufenden Schritt, der mit den hier verwendeten Methoden und Apparaturen nicht zeitlich aufgelöst werden konnte, kommt es zumindest bei dem α -helikalen Anteil des Proteins offenbar zu keinen weiteren Veränderungen mehr. Anders als bei den CD-spektroskopischen Messungen konnte mittels

Fluoreszenz-Spektroskopie eine progressiv voranschreitende Verschiebung des Emissionsmaximums gezeigt werden. Diese innerhalb der ersten drei Stunden der Inkubation auftretende Rotverschiebung ist ein klarer Hinweis für einen zumindest partiellen pH-induzierten Entfaltungsprozess, wobei sich aufgrund der Lage der Tryptophanreste jedoch nicht konkret sagen lässt, welcher Teil des Enzyms entfaltet.

Die Tatsache, dass nach ca. drei Stunden keine weitere Verschiebung des Fluoreszenzspektrums mehr zu beobachten war, kann prinzipiell durch ein Ende des Entfaltungsvorganges erklärt werden. Jedoch könnte auch die zu diesem Zeitpunkt beginnende Aggregation eine weitere Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums unterbinden, da sich diese auch auf die Umgebungspolarität der einzelnen Tryptophanreste auswirken kann, wie es bereits am Beispiel anderer Proteine gezeigt wurde [102].

Aufgrund der zeitlichen Verzögerung von zwei Stunden, mit der die Aggregation hier auftrat, kann vermutet werden, dass der Aggregationsprozess bei der Inaktivierung der *MeHNL* eher eine untergeordnete Rolle spielt. Diese ist zwei Stunden nach dem Beginn der Inkubation erstmals messbar, während die Aktivität zu diesem Zeitpunkt bereits auf ca. 50 % ihres Ausgangswertes gefallen ist.

Für die homologe HNL aus *Hevea brasiliensis* (*HbHNL*) konnte durch umfangreiche spektroskopische Untersuchungen ebenfalls ein Modell der säureinduzierten Inaktivierung erstellt werden. Es wurde postuliert, dass mit zunehmend niedrigerem pH-Wert eine Entfaltung des Enzyms auf der Ebene der Tertiärstruktur einem Verlust von Sekundärstruktur vorangeht [254]. Zudem wurde bei niedrigen pH-Werten die Bildung von Mikroaggregaten mit erhöhter Fluoreszenzanisotropie beobachtet, die sich von den oligomeren Assoziationsformen bei höheren pH-Werten unterscheiden [253].

3.5 Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität der *MeHNL*

Außer dem pH-Wert und der Zusammensetzung des Puffers zählt auch die Temperatur zu den Faktoren, die die Aktivität und Stabilität eines Enzyms stark beeinflussen können. Daher sollte auch der Einfluss der Temperatur auf Aktivität und Stabilität der *MeHNL* hier umfassend untersucht werden.

3.5.1 Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der MeHNL

Um den Einfluss der Temperatur auf die *MeHNL* zu bestimmen, wurde die Aktivität des Enzyms hinsichtlich der Spaltung von Mandelonitril in Citrat-Phosphat-Puffer bei verschiedenen Temperaturen ermittelt.

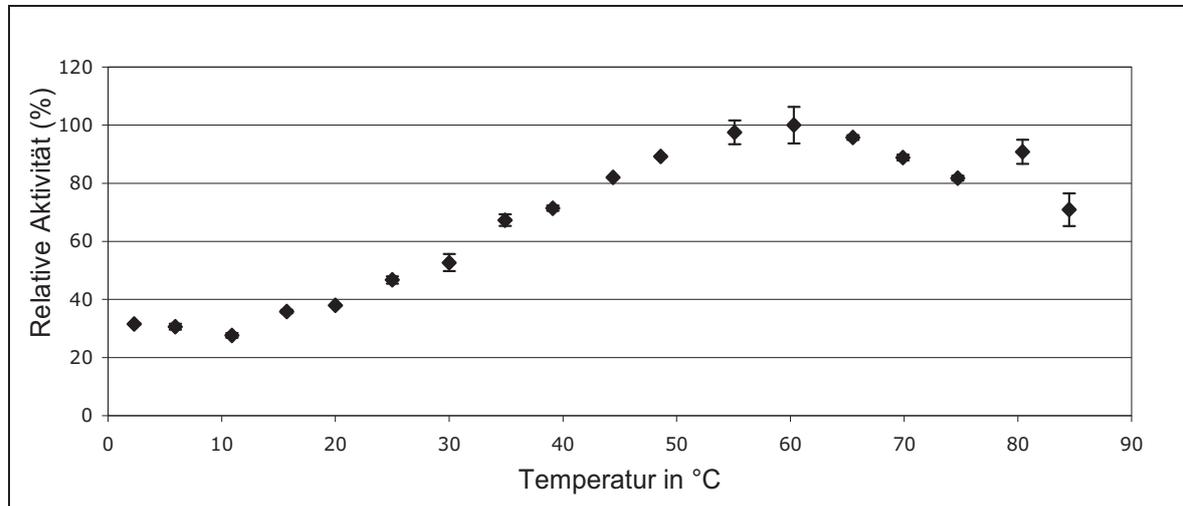


Abbildung 3.20: Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der *MeHNL* in Abhängigkeit von der Temperatur. Die spezifischen Aktivitäten lagen zwischen 39-122 U/mg und wurden auf den Maximalwert bei 60°C normiert. Alle Messungen wurden in Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0) über 2 min durchgeführt.

Die *MeHNL* zeigt eine maximale Aktivität bei einer Temperatur von 60°C (Abb. 3.20), während sie in dem für technische Applikationen relevanten Bereich unterhalb von 10°C noch ca. 30% ihrer maximalen Aktivität aufweist.

In vorangegangenen Studien wurde bei diesem Enzym eine maximale Aktivität bei einer Temperatur von 40°C beobachtet [64, 260]. Die Differenz zu dem hier bestimmten Temperaturoptimum von 60°C lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass bei diesen Studien ein anderer Aktivitätstest genutzt wurde, bei dem die Spaltung des Substrates Acetoncyanhydrin indirekt durch den Nachweis von Cyanid-Ionen quantifiziert wird. Im Gegensatz dazu wurde hier ein direkter photometrischer Test eingesetzt, bei dem der bei der Mandelonitrilspaltung entstehende Benzaldehyd kontinuierlich detektiert wird.

Die Bestimmung der Aktivierungsenergie der *MeHNL* erfolgte entsprechend Kapitel 2.5.3 durch Auftragung des natürlichen Logarithmus (ln) der Aktivität gegen die reziproke absolute Temperatur (Abb. 3.21). Die Aktivierungsenergie beträgt im Falle der *MeHNL* ca. 24 kJ/mol. Für die nicht-rekombinante *HbHNL* hingegen wurde eine Aktivierungsenergie von 54,9 kJ/mol bestimmt [255], so dass bei dieser HNL die Aktivität im applikationsrelevanten Bereich zwischen 0°C und 10°C dementsprechend niedriger ist.

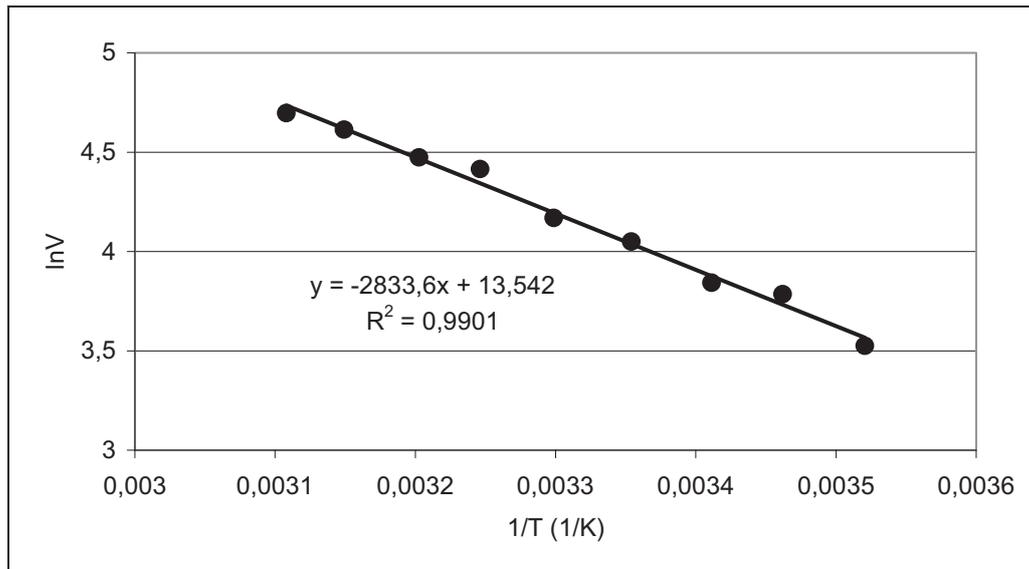


Abbildung 3.21: Arrhenius-Plot zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der MeHNL. Es wurde der natürliche Logarithmus (ln) der spezifischen Aktivität gegen die reziproke absolute Temperatur aufgetragen.

3.5.2 Der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der MeHNL

Neben dem direkten Einfluss auf die Aktivität eines Enzyms kann sich die Temperatur auch stark auf seine Stabilität auswirken. Ein häufig in der Literatur beschriebenes Phänomen ist die Denaturierung von Enzymen durch hohe Temperaturen; weniger geläufig ist die Tatsache, dass auch niedrige Temperaturen zur Inaktivierung eines Enzyms beitragen können (Kapitel 1.3.4).

Aus diesem Grund sollte ein breites Temperaturspektrum hinsichtlich seines Einflusses auf die Stabilität der MeHNL untersucht werden. Die MeHNL wurde, um einen inaktivierenden Einfluss des pH-Wertes auszuschließen, in Kaliumphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 6,0 inkubiert, der zuvor auf die jeweilige Temperatur eingestellt worden war. In bestimmten zeitlichen Abständen wurden den Inkubationsansätzen Proben entnommen, die auf Aktivität und löslichen Proteingehalt untersucht wurden.

Die MeHNL ist in einem breiten Temperaturbereich zwischen 0°C und 37°C äußerst stabil. Erst ab einer Temperatur von 50°C inaktiviert das Enzym mit zunehmender Geschwindigkeit (Tab. 3.5). Bei der strukturell verwandten HbHNL wurde bei einer Temperatur von 40°C eine Halbwertszeit von 11,5 h gemessen, jedoch kann dieses Enzym bei höheren Temperaturen in Abhängigkeit des genutzten Puffers genauso stabil oder sogar stabiler sein als die MeHNL [261].

Der Aktivitätsverlust der MeHNL verläuft nahezu parallel mit einem Absinken des löslichen Proteingehaltes, was ein deutlicher Hinweis auf einen temperaturinduzierten Aggregationsprozess ist (Abb. 3.22).

Tabelle 3.5: Halbwertszeiten (h) der MeHNL bei verschiedenen Temperaturen in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0. a: Die Halbwertszeit konnte innerhalb des angegebenen Zeitraums nicht überschritten werden.

0°C	4°C	10°C	22°C	30°C	37°C	50°C	60°C
>96 ^a	>96 ^a	>96 ^a	>96 ^a	>48 ^a	64	2.7	0.5

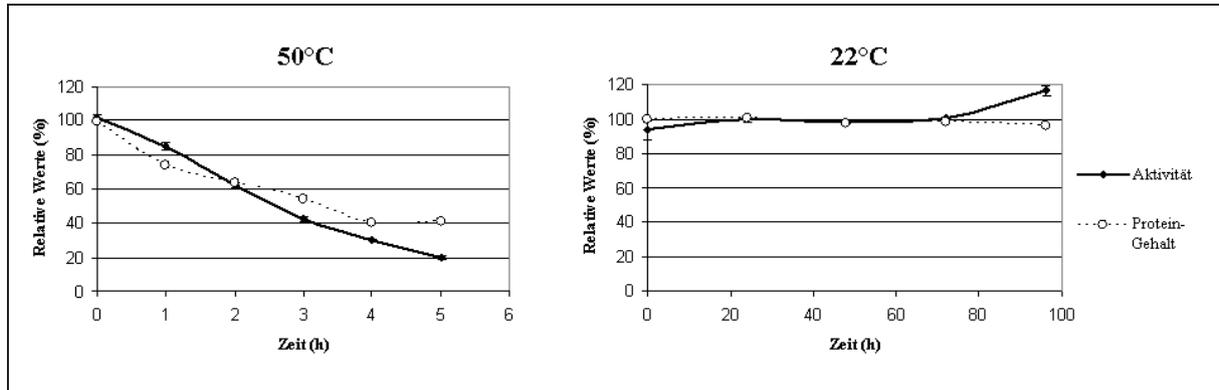


Abbildung 3.22: Zeitliche Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der MeHNL in Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0, bei 50°C (links) und 22°C (rechts). Dargestellt sind prozentuale Werte bezogen auf Aktivität und Proteingehalt zu Beginn der Inkubation.

Als Vorteil der MeHNL kann in jedem Fall ihre hohe Stabilität bei Temperaturen unterhalb von 10°C gewertet werden, da bei der technischen Anwendung vornehmlich in diesem Temperaturbereich gearbeitet wird [12].

3.5.3 Die MeHNL entfaltet bei erhöhter Temperatur

Im Gegensatz zur pH-abhängigen Inaktivierung konnte unter dem Einfluss erhöhter Temperatur bei der MeHNL vom Beginn der Inkubation an eine Abnahme des löslichen Proteingehaltes beobachtet werden, was auf eine schnelle Aggregation hindeutet. Da dies auf einen Unterschied zwischen dem thermischen und dem pH-abhängigen Inaktivierungsprozess schließen ließ, sollte eine zusätzliche Untersuchung der thermischen Denaturierung der MeHNL mittels CD-Spektroskopie erfolgen.

Die MeHNL wurde hierfür bei 50°C inkubiert und die Veränderung der CD-Spektren über einen Zeitraum von 220 min beobachtet (Abb. 3.23). Bei 25°C konnte beim gleichen pH-Wert keine Entfaltung des Enzyms gemessen werden (3.4.3, Abb. 3.12).

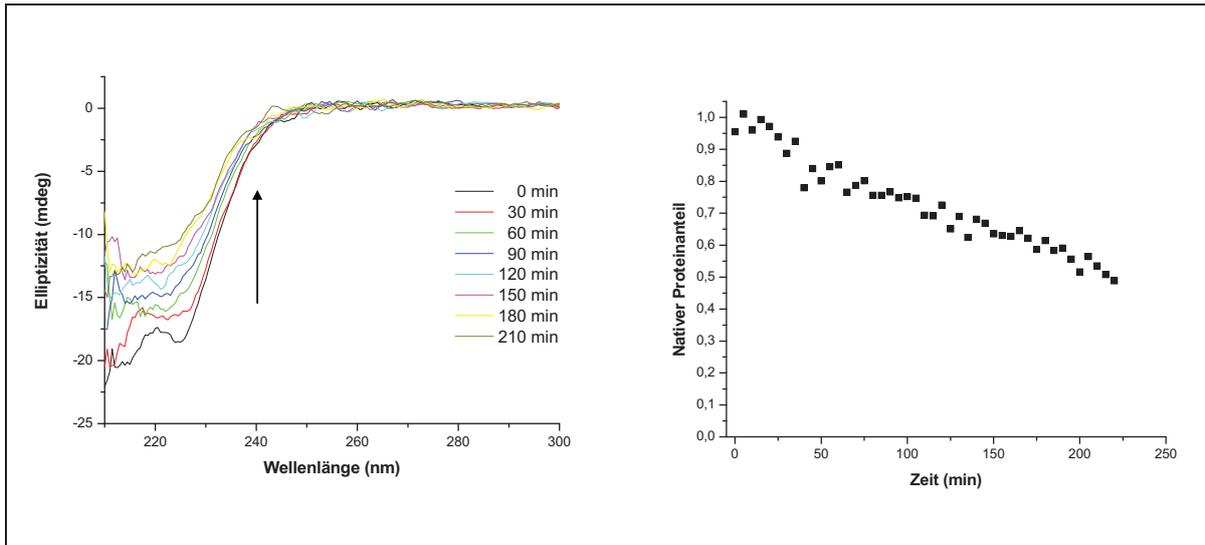


Abbildung 3.23: Links: Ausgewählte CD-Spektren der *MeHNL* bei 50°C und pH 6,0 über einen Zeitraum von 220 min. Der Pfeil zeigt die Verschiebungsrichtung der Spektren an. Rechts: Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei 50°C. Der native Proteinanteil wurde mittels der Eichgeraden aus Abb. 3.10 errechnet.

Anders als bei der pH-abhängigen Inaktivierung der *MeHNL* konnte bei 50°C eine deutliche und zeitabhängige Abnahme der α -helikalen Anteile des Proteins beobachtet werden.

Vergleicht man diesen Rückgang der Sekundärstruktur mit der zeitlichen Abnahme der Aktivität und der voranschreitenden Zunahme der unlöslichen Proteinfraktion, lässt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Aktivitätsverlust, Verlust der Sekundärstruktur und der Aggregation erkennen (Abb. 3.24).

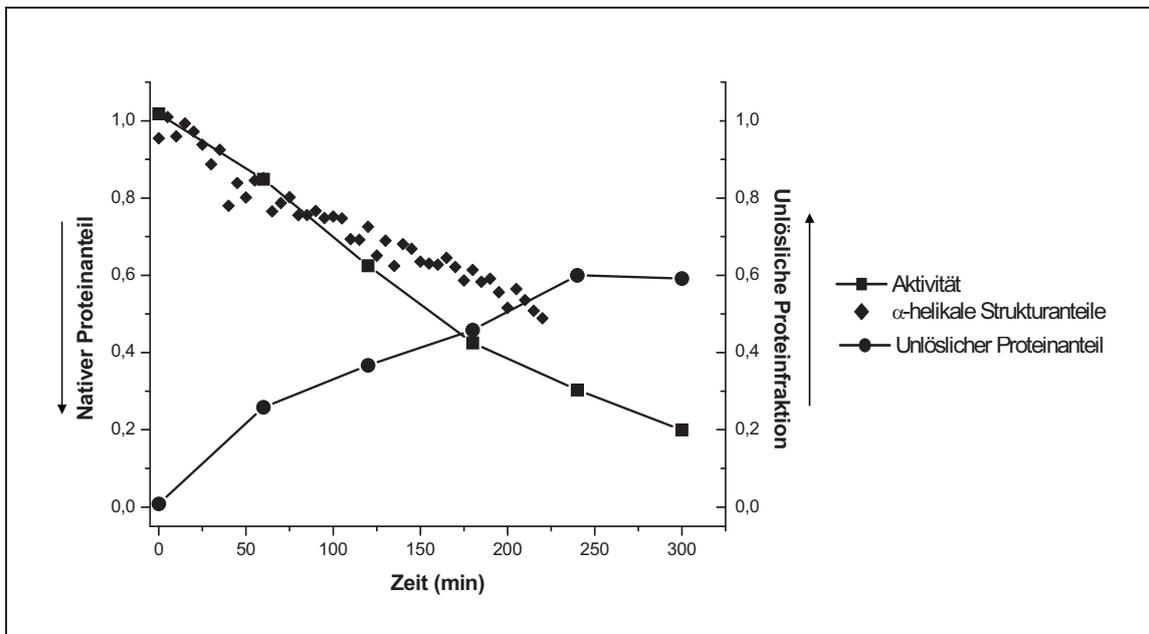


Abbildung 3.24: Der Einfluss der Temperatur auf die strukturelle Integrität und den löslichen Proteinanteil der *MeHNL*. Linke Y-Achse: Abnahme des nativen Proteinanteils. Es sind die Abnahme der Aktivität (relativ zum Startwert) und die Abnahme der α -helikalen Strukturelemente (relativ zum nativen und denaturierten Protein) dargestellt. Rechte Y-Achse: Zunahme der Proteinaggregate. Abgebildet ist die Zunahme des unlöslichen Proteinanteils (invertierte Abnahme des löslichen Anteils relativ zum Startwert).

Unmittelbar nach dem Start der Inkubation bei 50°C sinken Aktivität und α -helikaler Anteil der MeHNL nahezu parallel ab, während der relative Anteil des unlöslichen Proteins im gleichen Maße zunimmt. Dies lässt den Schluss zu, dass es bei der thermischen Inaktivierung zu einer zeitabhängigen Abnahme der Sekundärstruktur durch Entfaltung kommt. Diese Entfaltung bewirkt neben dem Verlust der Aktivität eine Aggregation der denaturierten Proteinfraction, die in diesem Fall ohne Zeitverzögerung stattfindet. Damit entspricht das thermische Denaturierungsverhalten der MeHNL dem vieler anderer mesophiler Proteine, die ebenfalls bei erhöhter Temperatur entfalten und aggregieren [103].

3.5.4 Bestimmung der Schmelztemperatur der MeHNL

Zusätzlich zu den kinetischen Aspekten der Stabilität eines Enzyms, bei der die Aktivität oder strukturelle Integrität eines Enzyms als Funktion der Zeit nach der Exposition gegenüber einem denaturierenden Einfluss bestimmt wird, kann auch die thermodynamische Stabilität ein wichtiges Charakteristikum eines Enzyms sein. Ein Maß für die thermodynamische Stabilität eines Proteins ist seine Schmelztemperatur: bei dieser handelt es sich um die Temperatur, bei der die energetische Differenz zwischen ge- und entfaltetem Zustand eines Proteins gleich null ist und bei der die Hälfte einer Proteinpopulation im entfaltenen Zustand vorliegt [264].

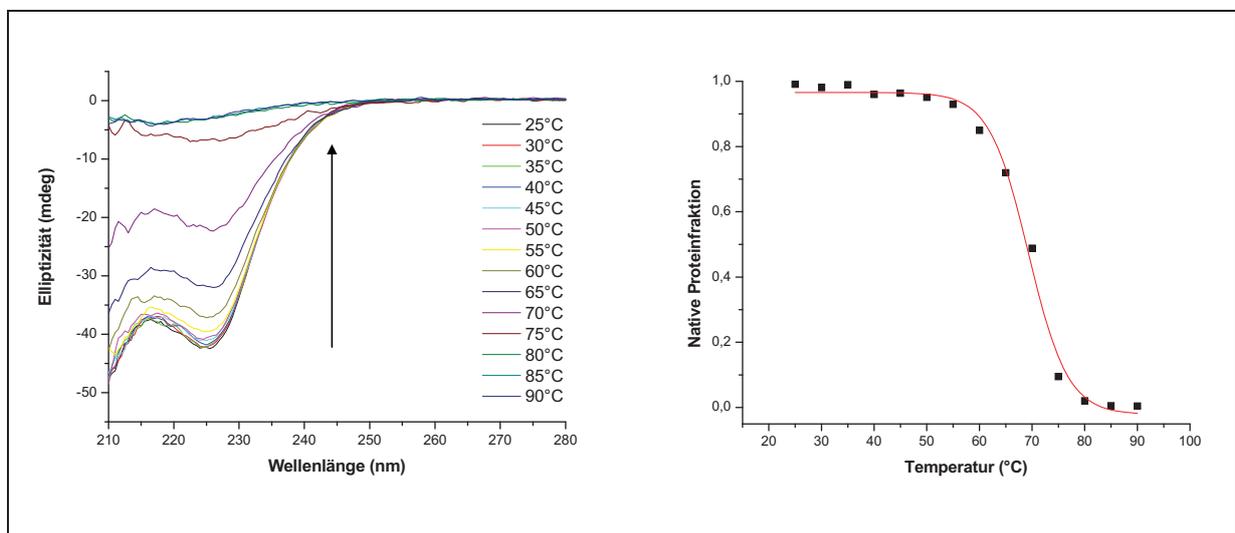


Abbildung 3.25: CD-spektroskopische Bestimmung der Schmelztemperatur der MeHNL. Links: CD-Spektren in Abhängigkeit der Temperatur. Der Pfeil gibt die Richtung der Entwicklung der Spektren mit steigender Temperatur an. Rechts: Auftragung der nativen Proteinfraction gegen die Temperatur. Die Schmelztemperatur entspricht dem Wendepunkt der Kurve und liegt hier bei $69,3 \pm 0,47^\circ\text{C}$.

Zur Bestimmung der Schmelztemperatur der MeHNL wurde diese in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Citrat-Phosphat-Puffer (pH 6,0) alle 5 Minuten in 5°C-Schritten von 25°C auf 90°C erwärmt. Nach dem Erreichen der jeweils eingestellten Temperatur wurden von der Pro-

teinlösung CD-Spektren aufgenommen. Die Schmelztemperatur der *MeHNL* liegt bei $69,3 \pm 0,47^\circ\text{C}$ (Abb. 3.25).

3.6 Stabilisierung der *MeHNL* bei niedrigen pH-Werten

Während die *MeHNL* bei den produktionstechnisch relevanten Temperaturen zwischen 0°C und 10°C ein hohes Maß an Stabilität aufweist, führt der Kontakt zu niedrigen pH-Werten im Bereich von pH 4 zu einer Inaktivierung des Enzyms, die mit einer partiellen Entfaltung sowie einem Aggregationsprozess einhergeht. Da niedrige pH-Werte bei den derzeit gängigen Produktionsbedingungen für Hydrocyanierungsreaktionen eher die Regel sind, ist es notwendig, dass die jeweils verwendete HNL zumindest für den benötigten Zeitraum der Synthesereaktion stabil ist.

Zwar konnte für die *MeHNL* in den vorangegangenen Experimenten eine klare Vorstellung über den bei niedrigem pH-Wert ablaufenden Inaktivierungsprozess gewonnen werden, jedoch war die Datenlage nicht ausreichend, um die Rolle einzelner Aminosäuren zu benennen, so dass ein rationaler Ansatz zur pH-Stabilisierung des Enzyms hier nicht verfolgt werden konnte.

Daher wurden im Folgenden zwei unterschiedliche Stabilisierungsstrategien verfolgt, die nicht auf rationalem Design basieren: einerseits sollte durch den Zusatz kompatibler Osmolyte eine Steigerung der pH-Stabilität erzielt werden, wie es bereits für die homologe *HbHNL* gelungen war [253]. Im zweiten Ansatz sollte durch gerichtete Evolution versucht werden, eine Enzymvariante zu finden, die bei niedrigen pH-Werten stabiler ist als das Wildtyp-Enzym.

3.6.1 Stabilisierung durch niedermolekulare Zusätze

Der Einsatz kompatibler Osmolyte stellt prinzipiell eine relativ unkomplizierte Möglichkeit zur Enzymstabilisierung dar; deshalb, sollte auch für die *MeHNL* untersucht werden, ob sich diese durch niedermolekulare Substanzen stabilisieren lässt.

Als Ausgangspunkt für die durchgeführten Untersuchungen dienten die von Hickel *et al.* [253] und Bauer *et al.* [261] publizierten Ergebnisse, denen zufolge für einen signifikanten stabilisierenden Effekt Saccharose in einer Konzentration von 200 – 400 mg/ml oder 100 – 200 mg/ml Sorbitol einzusetzen waren.

Die Halbwertszeiten der *MeHNL* bei pH 4,0 unter Zusatz verschiedener Konzentrationen Saccharose oder Sorbitol sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tabelle 3.6: Halbwertszeiten (h) der MeHNL bei pH 4,0 mit verschiedenen Zusätzen.

Ohne Zusatz	Saccharose		Sorbitol	
	200 mg/ml	400 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml
2	7,5	13	4	5,5

Durch den Zusatz von hohen Saccharose-Konzentrationen kann die MeHNL leicht stabilisiert werden, jedoch bleibt dieser Effekt deutlich hinter dem bei der HbHNL beobachteten zurück. Bei diesem Enzym verlängerte sich Halbwertszeit bei pH 3,75 um ein Vielfaches von weniger als 10 Minuten auf 100 Minuten beim Zusatz von 400 mg/ml Saccharose [253].

Noch deutlicher war der Unterschied zwischen MeHNL und HbHNL im Falle der Stabilisierung durch Sorbitol: während die HbHNL durch Zusatz von 200 mg/ml Sorbitol bei pH 3,75 eine Steigerung der Halbwertszeit von unter 10 min auf 380 min erfuhr [253], war bei der MeHNL keine signifikante Stabilisierung zu beobachten.

3.6.1 Stabilisierung durch gerichtete Evolution

Da für eine Stabilisierung der MeHNL im sauren pH-Bereich mittels rationalem Design nicht genügend Informationen hinsichtlich des Entfaltungsprozesses verfügbar waren und eine Stabilisierung durch den Zusatz kompatibler Osmolyte unter den hier getesteten Bedingungen nur bedingt funktionierte, sollte versucht werden, die MeHNL mittels gerichteter Evolution gegenüber niedrigen pH-Werten zu stabilisieren.

3.6.1.1 Etablierung eines Hochdurchsatz-Screening-Systems

Neben der eigentlichen Mutagenese ist ein verlässliches Screeningsystem zur Identifizierung der gewünschten Enzymvarianten ein wesentlicher Aspekt bei der gerichteten Evolution. Wichtig ist bei einem solchen Screeningsystem neben einem hohen Probendurchsatz auch die Vergleichbarkeit der Enzymvarianten einer Variantenbank untereinander. Diese Vergleichbarkeit kann durch eine Reihe von Faktoren wie z.B. Varianzen beim Zellwuchs oder bei der Proteinexpression beeinträchtigt werden [265]; deshalb gilt es, ein Screeningsystem sorgfältig an die jeweiligen Ansprüche anzupassen.

Grundlage für das hier verwendete Screeningsystem war ein modifiziertes Protokoll von Puls [266], bei dem entgegen der klassischen Vorgehensweise die Induktion der Proteinexpression nicht in der logarithmischen Phase des Zellwuchses, sondern in der stationären Phase erfolgt. Vorteil dieses Vorgehens ist, dass die einzelnen Kulturen einer *Deepwell*-Mikrotiterplatte

(DW-MTP) in der stationären Wachstumsphase eine relativ homogene Zelldichte aufweisen; Variationen der Expression aufgrund von unterschiedlichen Zelldichten zum Zeitpunkt der Induktion, wie sie z.B. in der logarithmischen Wachstumsphase auftreten, können auf diese Weise minimiert werden. Nach der Expression, Sedimentation und dem gegebenenfalls darauf folgenden Zellaufschluss (Kapitel 2.2.4, 2.7) wurde die Aktivität der Zell-Lysate oder Zell-Suspensionen gegenüber racemischem Mandelonitril mittels Cyanid-Assay (2.5.2) gemessen.

Zur Validierung des Screeningsystems wurde zunächst die Homogenität des Zellwachstums vor der Induktion sowie Expression und Aktivität der Wildtyp-*MeHNL* fünf Stunden nach der Induktion überprüft.

Zur Überprüfung der Homogenität des Zellwachstums wurden zwei DW-MTPs mit insgesamt 176 *E. coli* BL21(DE3)-p*MeHNL*-Kulturen inokuliert und die OD_{580} nach 16 Stunden Wuchs bestimmt. Die OD_{580} lag durchschnittlich bei $1,46 \pm 0,06$, was einer Standardabweichung von 4,2 % entspricht.

Die Homogenität der *MeHNL*-Expression innerhalb einer DW-MTP wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert. Zu diesem Zweck wurden von verschiedenen, willkürlich ausgewählten Kulturen einer DW-MTP (OD_{580} von 0,15) Proben entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 3.26).

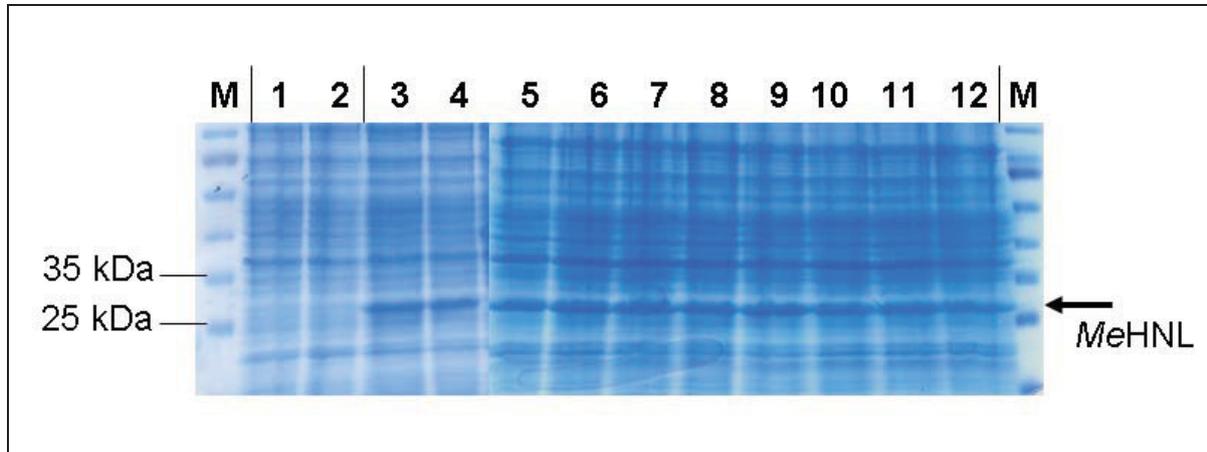


Abbildung 3.26: SDS-PAGE der DW-MTP-Expression der *MeHNL*. M: Marker (Fermentas PAGE-Ruler), Spur 1 und 2: *E. coli* BL21(DE3) mit Leervektor pET28a, Spur 3-12: *E. coli* BL21(DE3) mit Vektor p*MeHNL*. Die Laufhöhe der *MeHNL* ist mit einem Pfeil markiert. Die den Leervektor pET28a enthaltenden Kulturen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert wie die *MeHNL*-exprimierenden Kulturen. Pro Spur wurde jeweils eine Zellmenge aufgetragen, die einer OD_{580} von 0,15 entspricht.

Wie Abb. 3.26 zeigt, wird die *MeHNL* unter den hier verwendeten Bedingungen in ausreichender Menge exprimiert und es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Menge an exprimierter *MeHNL* zwischen den einzelnen Kulturen beobachtet werden.

Nachdem Zellwuchs und die Homogenität der *MeHNL*-Expression gezeigt werden konnten, galt es nun die Varianz der Aktivität sowie den Einfluss des Zellaufschlusses auf den Aktivitätsassay zu bestimmen.

Gerade im Falle von Stabilitätsmessungen ist es notwendig, eine möglichst vollständige Lyse der eingesetzten Zellen zu gewährleisten, um eine optimale Exposition der Enzyme zu den denaturierenden Bedingungen zu erreichen. Zur Zell-Lyse wurde das kommerziell erhältliche Lyse-Reagenz BugBusterTM Master Mix genutzt, das neben einigen nicht näher beschriebenen Inhaltsstoffen auch Lysozym und Benzonase enthält. Neben der durch die Detergenzien und Lysozym verursachten Lyse der Zellen werden durch die vorhandene Benzonase auch alle Arten von Nukleinsäure in einer Probe hydrolysiert. Dadurch wird das Pipettieren der Proben nicht durch die Viskosität von freigesetzten Nukleinsäuren erschwert.

Um den Einfluss der Zell-Lyse und des BugBuster-Mastermixes auf die auf den beim Screening verwendeten Cyanid-Assay (Kapitel 2.5.2) zu untersuchen, wurden jeweils *MeHNL*-exprimierende *E. coli* BL21(DE3)-p*MeHNL*- Zellen aus 40 Wells nach der Expression entweder mit Bugbuster behandelt oder in A. dest. resuspendiert (Kapitel 2.7) und auf ihre Aktivität gegenüber Mandelonitril getestet.

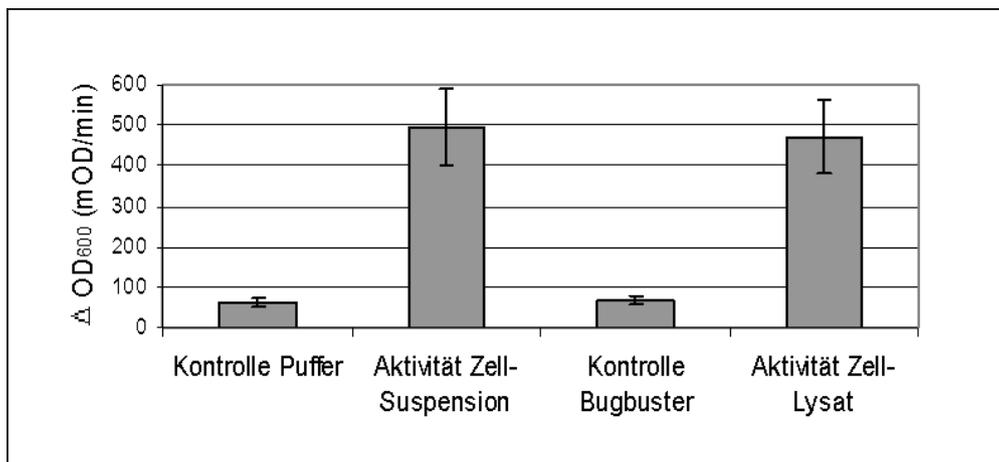


Abbildung 3.27: Effekt der Zell-Lyse auf die Aktivität der *MeHNL* unter Screening-Bedingungen. Die Aktivität wurde mittels des Cyanid-Assays (Kapitel 2.5.2) ermittelt, als Substrat diente racemisches Mandelonitril. Als Zell-Lysate wurden die in A. dest. resuspendierten Zellpellets, als Zell-Lysate die mit Bugbuster behandelten Zellen bezeichnet. Der Erfolg der Zell-Lyse wurde mikroskopisch kontrolliert; nach der Behandlung mit BugBuster wurden keine intakten Zellen oder Zellstrukturen mehr vorgefunden. Es wurden jeweils 10 µl des Zell-Lysates oder der Zell-Suspension in den Assay eingesetzt. Als Kontrolle wurden jeweils die Autohydrolyse des Substrates Mandelonitril in 150 µl Puffer oder in 140 µl Puffer inklusive 10 µl BugBuster-Reagenz ermittelt. Die Reaktionszeit betrug 5 min. Alle Werte sind in mOD₆₀₀/min angegeben.

Das Ergebnis zeigt, dass auch beim Einsatz von nicht-aufgeschlossenen Zell-Suspensionen HNL-Aktivität mit dem Cyanid-Nachweisassay (Kapitel 2.5.2) gemessen werden kann (Abb. 3.27). Vermutlich werden die Zellen durch das Substrat Mandelonitril sowie dessen ebenfalls toxischen Spaltprodukten Benzaldehyd und HCN partiell lysiert. Zum anderen wur-

de gezeigt, dass der Einsatz des Bugbuster-Mixes keinen Einfluss auf die Autohydrolyse des Substrates, den Assay oder die Aktivität der *MeHNL* hat.

Neben Zellwuchs und Zellaufschluss galt es außerdem noch die Varianz der Aktivitäten der *MeHNL* zu untersuchen. Da sich gezeigt hatte, dass der Zellaufschluss nahezu keinen Effekt auf die Höhe der Aktivität hat, wurde zunächst die Varianz der *MeHNL*-Aktivität anhand von Zellsuspensionen bestimmt, die entsprechend Kapitel 2.7 präpariert wurden.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 3.7 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3.7: Analyse der Mandelonitril-Spaltung in Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0 (Kontrolle), in Zell-Lysaten ohne HNL (BL21(DE3)-pET28a) und in Zell-Lysaten mit exprimierter *MeHNL* (BL21(DE3)-p*MeHNL*). Alle Werte entsprechen den Mittelwerten von 88 Einzelmessungen und sind in mOD/min angegeben. Von den Zellsuspensionen wurden jeweils 10 µl als Probe in den Cyanid-Assay (Kapitel 2.5.2) eingesetzt, wobei racemisches Mandelonitril als Substrat diente. Die Reaktionszeit betrug 5 min. 197,2 mOD/min entsprechen abzüglich des Kontrollwerts von 29,6 einer Aktivität von ca. 0,8 U/ml.

	Kontrolle (Puffer)	BL21(DE3)-pET28a	BL21(DE3)-p <i>MeHNL</i>
ΔOD_{600} (mOD/min)	29,6 ± 4,9	27,1 ± 10,5	197,2 ± 19,2
Standardabweichung (In % relativ zum Mittelwert)	16,6	38,9	9,7

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, hat die Anwesenheit von Zell-Lysaten des Kontrollstammes BL21(DE3)-pET28a keinen Einfluss auf den Aktivitätsassay, da die Geschwindigkeit der Autohydrolyse des Mandelonitrils der des Kontrollwertes (Puffer und Substrat) entspricht. Die bei BL21(DE3)-p*MeHNL* beobachteten Steigungen sind also allein auf die Anwesenheit einer überexprimierten HNL zurückzuführen. Im Falle der Aktivitätsmessungen war die Standardabweichung im Rahmen eines HTS-Systems akzeptabel niedrig (< 10%).

Zusätzlich zur Vergleichbarkeit der Aktivitätswerte ist das untere Detektionslimit und die damit verbundene Mindestaktivität einer Enzymvariante ein wichtiger Punkt bei der Festlegung der Screening-Parameter. Zum einen gilt es, möglichst alle aktiven Varianten herauszufiltern, auch wenn diese nur eine niedrige Aktivität aufweisen; zum anderen müssen falsch-positive Treffer möglichst von vorneherein ausgeschlossen werden, um den Zeitaufwand für die detaillierte Untersuchung der aktiven Varianten möglichst gering zu halten.

Zur Bestimmung der unteren Detektionsgrenze des Assays für eine minimale Aktivität im Verhältnis zum Hintergrund wurden je 44 unter Standard-Bedingungen (Kapitel 2.2.4) in einer DW-MTP kultivierte Kulturen von BL21(DE3)-pET28a und BL21(DE3)-p*MeHNL* zunächst pelletiert und die einzelnen Zellpellets jeweils in 200 µl Millipore-Wasser resuspendiert. Die Kulturen wurden homogenisiert und in verschiedenen Konzentrationen in den MTP-Assay eingesetzt, wobei racemisches Mandelonitril als Substrat genutzt wurde. Es wur-

den jeweils 10 μl Zellsuspension eingesetzt, wobei die Verdünnung der BL21(DE3)-pMeHNL-Kultur mit der Zellsuspension der BL21(DE2)-pET28a-Kultur erfolgte, um eine niedrige Aktivität innerhalb einer Zellsuspension zu simulieren. Selbst bei einer hundertfachen Verdünnung der MeHNL-Zellsuspension lag die gemessene Steigung ca. 50% über der maximalen Steigung des Hintergrundwerts. Wie mittels des Standard-Mandelonitril-Assays (Kapitel 2.5.1) bestimmt wurde, lag die untere Detektionsgrenze bei einer volumetrischen Aktivität von 0,01 U/ml.

Da sowohl Kontroll- als auch Aktivitätswerte zwischen einzelnen Platten voneinander abweichen konnten, wurde als minimaler Aktivitätswert eine Steigung der OD_{600} festgesetzt, die mindestens 30% über der maximalen Steigung des Kontrollwertes lag (Abb. 3.28). Auf diese Weise wurden mögliche Schwankungen der Kontroll- und Aktivitätswerte berücksichtigt.

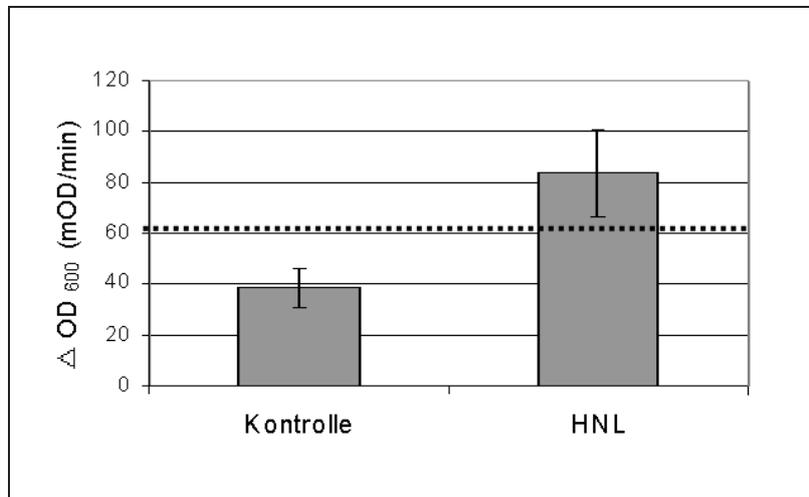


Abbildung 3.28: Festlegung der Minimalaktivität für Treffer beim Hochdurchsatz-Screening. Die gestrichelte Linie gibt die festgelegte Minimalaktivität (Kontrollwert + 30%) an.

3.6.1.2 Die MeHNL ist unter Screeningbedingungen stabil

Zusätzlich zu den allgemeinen Parametern hinsichtlich der Homogenität von Zellwuchs, Expression und Aktivität sowie der Festlegung eines Minimalwertes für einen Treffer beim Screening mussten auch die eigentlichen Screeningbedingungen festgelegt werden.

Maßgeblich waren dabei die Bedingungen der technischen Applikation, die in diesem Fall in erster Linie einen niedrigen pH-Wert von 4,0 vorgaben. Weitere Parameter, wie etwa die Anwesenheit von HCN oder einer Carbonylkomponente, waren aufgrund der hohen Flüchtigkeit und Toxizität dieser Stoffe im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screenings nicht zu realisieren.

Bei ersten Vorexperimenten hatte sich gezeigt, dass die MeHNL trotz kompletter Zell-Lyse und sechzehnständiger Inkubation in Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 4,0 noch eine signifikante Restaktivität aufwies.

Ein wesentlicher Unterschied zu den im Vorfeld durchgeführten Untersuchungen am isolierten Enzym war beim Screening der Einsatz von Zell-Lysaten. Um einen möglichen stabilisierenden Effekt dieser Zell-Lysate auf die *MeHNL* auszuschließen, wurde die Stabilität der *MeHNL* in einem solchen Zell-Lysat analysiert (Kapitel 2.5.4), wobei aus einer HZD-Kultivierung stammende *E. coli* BL21(DE3)-*pMeHNL*-Zellen als Zellmaterial genutzt wurden. Die Inkubation erfolgte in Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,0) oder, zur Kontrolle, im gleichen Puffer bei pH 5,4, bei dem wie erwartet über einen Zeitraum von 48 Stunden kein Verlust von Aktivität beobachtet werden konnte.

Im Vergleich zum gereinigten Enzym erwies sich die *MeHNL* im Zell-Lysat bei pH 4,0 als ungleich stabiler: während die Halbwertszeit bei diesem pH für das gereinigte Enzym zwei Stunden beträgt, bleibt die *MeHNL* im Zell-Lysat über einen Zeitraum von mehr als 48 Stunden stabil, auch wenn die Aktivität der Proben vom Beginn der Inkubation an unter der der Vergleichsprobe bei pH 5,4 liegt (Abb. 3.29). Ein weiterer Unterschied zum gereinigten Enzym besteht zudem in der raschen Abnahme des löslichen Proteingehaltes in der Rohextrakt-Probe bei pH 4,0: bereits zu Beginn der Inkubation bildet sich ein weißer, flockiger Niederschlag, während beim gereinigten Enzym die Bildung von Aggregaten erst mit einer zeitlichen Verzögerung von zwei Stunden beginnt (Kapitel 3.4.6, Abb. 3.29).

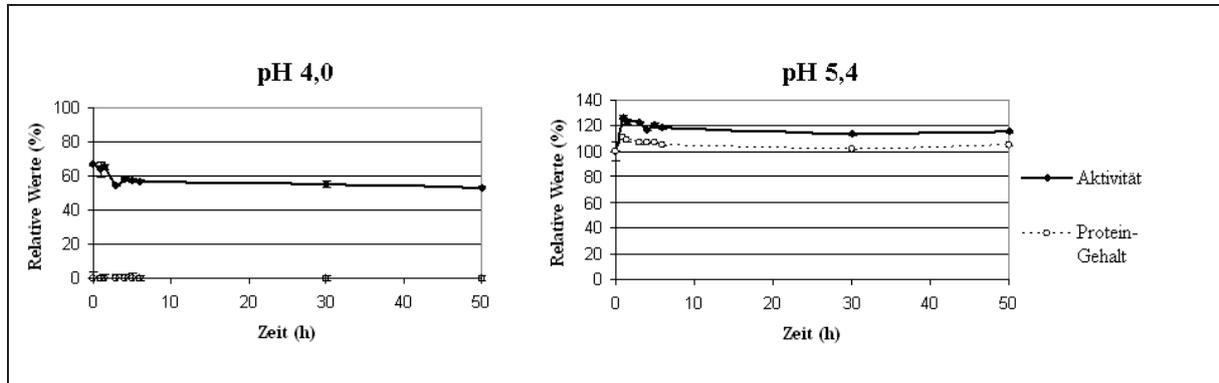


Abbildung 3.29: Zeitliche Entwicklung der Aktivität und des löslichen Proteingehaltes von *MeHNL*-enthaltenden Zell-Lysaten bei pH 4,0 (links) und pH 5,4 (rechts). Dargestellt sind prozentuale Werte bezogen auf Aktivität und Proteingehalt zu Beginn der Inkubation. Bei pH 4,0 fällt der lösliche Proteingehalt direkt zu Beginn der Inkubation auf ein Minimum ab.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zum gereinigten Protein besteht darin, dass die unter dem Einfluss des niedrigen pH-Wertes gebildeten Aggregate weiter aktiv bleiben: zwar fällt bereits direkt zu Beginn der Inkubation der lösliche Proteingehalt auf ein Minimum ab, jedoch kann über den gesamten Zeitraum von 48 Stunden ein signifikantes Maß an Aktivität in den Proben gemessen werden, sofern diese nicht zuvor zentrifugiert werden (Abb. 3.30).

Werden die Proben jedoch vor den Aktivitätsmessungen zentrifugiert, sinkt nicht nur der lösliche Proteingehalt, sondern auch die im Überstand enthaltene Aktivität auf ein Minimum ab.

Werden die dabei erhaltenen unlöslichen Pellets wieder in Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5) gelöst, kann ein großer Teil der vor dem Zentrifugationsschritt vorhandenen Aktivität und des Proteingehaltes wieder gefunden werden. Jedoch lassen sich trotz des bei der Resuspendierung erhöhten pH-Wertes die zuvor gebildeten Aggregate nicht wieder in Lösung bringen, denn eine wiederholten Zentrifugation hat auch hier ein starkes Absinken des Proteingehaltes und der Aktivität im Überstand zur Folge [267].

Diese massive Bildung von Aggregaten, die bereits mit dem bloßen Auge zu beobachten ist, zusammen mit der starken Bindung der vorhandenen Aktivität an die Aggregate und der stark erhöhten Stabilität bei pH 4,0 beweisen klar, dass sich die *MeHNL* in Zell-Lysaten wesentlich anders verhält als in ihrer gereinigten Form.

Eine mögliche Ursache für die stabilisierende Wirkung des Zell-Lysats könnte die äußerst schnelle Bildung von großen Aggregaten sein: da in dem Zeitfenster, in dem diese Aggregate gebildet werden (< 5 min), nicht mit einem starken Aktivitätsverlust der *MeHNL* zu rechnen ist, erscheint es möglich, dass der größte Teil der Enzympopulation in einer aktiven Form innerhalb der Proteinaggregate gebunden wird. Ein deutlicher Hinweis darauf ist die starke Kopplung von Aktivität und unlöslichem Proteingehalt. Bei den Proteinen, die diese unlöslichen Aggregate bilden, handelt es vermutlich in erster Linie um die löslichen Zellproteine des heterologen Wirtes *E. coli*, von denen viele eine niedrigere pH-Stabilität aufweisen als die *MeHNL*.

Bei diesem Stabilisierungsvorgang könnte es sich um eine Art des so genannten „*Molecular Crowding*“-Effekts handeln, der auch für die Thermostabilisierung von Enzymen in heterogenen Proteinlösungen verantwortlich gemacht wird. In diesem Fall wurde postuliert, dass in heterogenen Lösungen mit Enzymen verschiedener Thermostabilität eine Entfaltung der am wenigsten stabilen Proteine eine Steigerung der Stabilität der stabileren Proteine durch Volumenausschluss bewirkt. Da die weniger stabilen Proteine unter dem Einfluss einer erhöhten Temperatur schneller entfalten, üben diese im entfalteten Zustand auf die stabileren, nativen Proteine sterische Zwänge aus, die deren Entfaltung behindern und somit eine Stabilisierung verursachen [268]. Auch hier könnten die weniger pH-stabilen *E. coli*-Zellproteine, die offenbar unter dem Einfluss des niedrigen pH-Wertes entfalten und aggregieren, die deutlich stabilere *MeHNL* durch die Bildung einer sterisch beengten Mikroumgebung an der Entfaltung hindern und somit eine Stabilisierung bewirken.

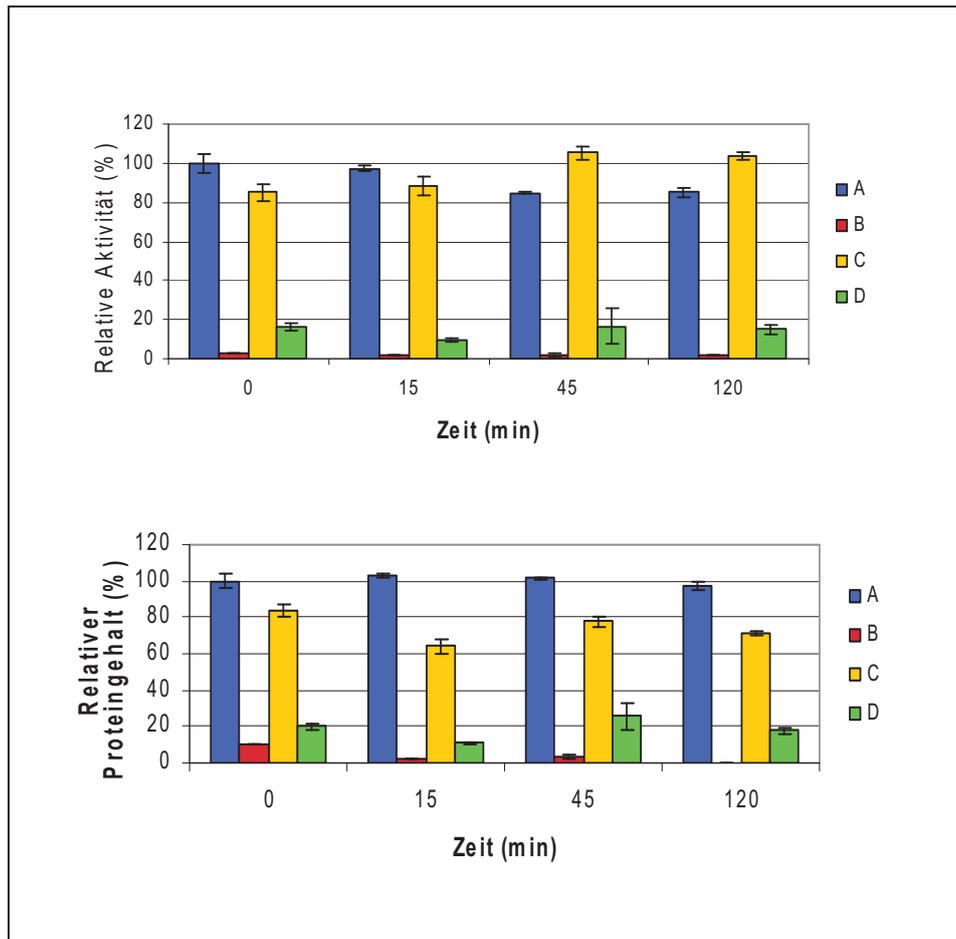


Abbildung 3.30: Kopplung von Aktivität und Proteingehalt bei der Inkubation der MeHNL-enhaltenden Zell-Lysate bei pH 4,0. A: In Citrat-Phosphat-Puffer pH 4,0 gelöstes Zell-Lysat; B: Überstand des bei pH 4,0 inkubierten Zell-Lysates nach einem Zentrifugationsschritt; C: In Citrat-Phosphat, pH 5,0, resuspendiertes Pellet des bei pH 4,0 inkubierten Zell-Lysates nach einem Zentrifugationsschritt; D: Überstand nach einem weiteren Zentrifugationsschritt [267].

Eine Konsequenz aus diesem stark vom gereinigten Enzym abweichenden Verhalten ist im Hinblick auf Stabilitätsoptimierung durch gerichtete Evolution, dass ein Screening auf eine verbesserte pH-Stabilität unter Nutzung von Zell-Lysaten nicht möglich ist, da sämtliche Varianten der MeHNL für ein Screening zumindest partiell gereinigt werden müssten.

Da für die homologe HbHNL bereits demonstriert wurde, dass Zell-Lysate generell für Hydrocyanierungsprozesse eingesetzt werden können [269], könnte die Nutzung dieser Zell-Lysate eine kostengünstige Alternative zu der gängigen Nutzung partiell gereinigter Enzympräparationen darstellen, die zudem noch den Vorteil einer erhöhten pH-Stabilität bietet.

4. Die HNL aus *Arabidopsis thaliana*

4.1 Der Einfluss des Puffers auf die Aktivität der AtHNL

Wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben, kann die Auswahl eines geeigneten Puffers essenziell für die biotechnologische Nutzung einer HNL sein. Daher sollte auch für die AtHNL der Einfluss verschiedener Puffer auf die Aktivität untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der AtHNL in den bereits für die MeHNL getesteten Puffern (Kapitel 3.3.1) bei einem pH von 5,0 bestimmt.

Wie in Abb. 4.1 dargestellt ist, sind die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Citrat-Phosphat-, Phosphat- und Acetat-Puffer vergleichbar und ist lediglich in Glutamat-Puffer ca. 40% niedriger. Unerwarteter Weise wird die AtHNL jedoch im Gegensatz zur MeHNL oder HbHNL offenbar nicht durch Acetat inhibiert, was prinzipiell einen Vorteil bei der kommerziellen Nutzung dieses Enzyms darstellt.

Ein von den beiden anderen α/β -Hydrolase-HNLs abweichender Substratbindungsmodus trägt im Falle der AtHNL offenbar dazu bei, dass diese nicht durch Acetat inhibiert wird (Kapitel 3.3.3).

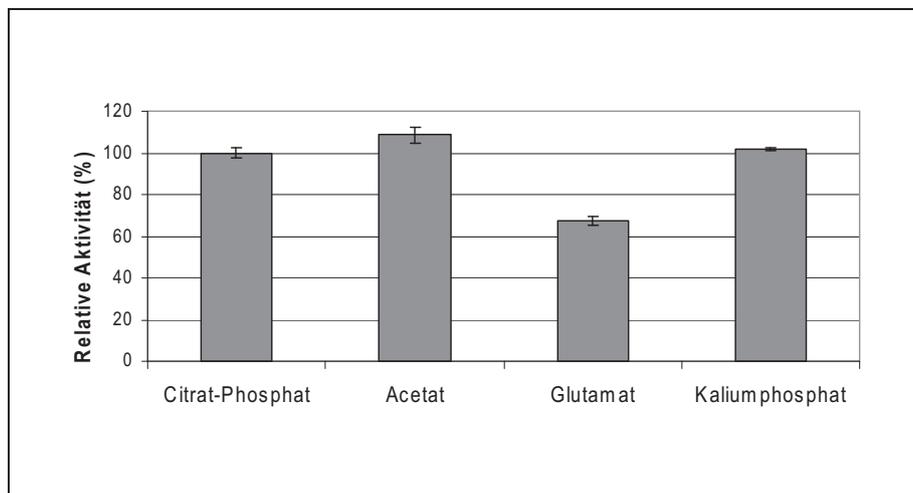


Abbildung 4.1: Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der AtHNL in verschiedenen Puffern bei pH 5,0. Die spezifische Aktivität lag zwischen 11 und 19 U/mg und wurde auf die Aktivität in Citrat-Phosphat-Puffer (= 100 %) normiert.

4.2 Der Einfluss des pH-Wertes auf Aktivität und Stabilität der AtHNL

Entsprechend der Arbeiten an der homologen MeHNL (Kapitel 3.4), wurde die AtHNL hinsichtlich des Einflusses des pH-Werts auf die Aktivität und Stabilität untersucht.

4.2.1 Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der *At*HNL

Die Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wurde in Citrat-Phosphat-Puffer im pH-Bereich zwischen 3,5 und 6,5 untersucht (Abb. 4.2).

Unterhalb von pH 5 ist die Aktivität der *At*HNL äußerst niedrig, was möglicherweise auf eine schnell stattfindende Inaktivierung in diesem pH-Bereich zurückzuführen sein könnte (Kapitel 4.2.2). Oberhalb von pH 5 wurde ein Anstieg der Aktivität beobachtet, die bei pH 5,7 ein Maximum erreicht, das wesentlich breiter ist als das der HNL aus *Manihot esculenta*, die ein schmales Aktivitätsoptimum im Bereich von pH 5,5 zeigt und zudem bereits bei pH 4 ein signifikantes Maß an Aktivität aufweist (Abb. 3.8). Somit ist das pH-abhängige Aktivitätsprofil der *Me*HNL im direkten Vergleich der beiden Enzyme im Hinblick auf die technische Nutzung bei sauren pH-Werten deutlich günstiger.

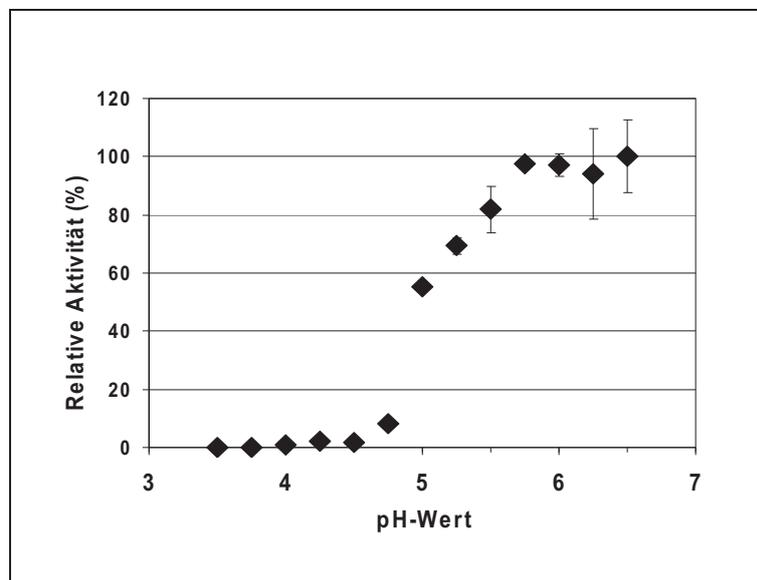


Abbildung 4.2: Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der *At*HNL in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die spezifischen Aktivitäten wurden auf den Maximalwert (=100%, entsprechend 70 U/mg) normiert. (Nach [65]; Daten wurden von J. Andexer erhoben.)

4.2.2 Der Einfluss des pH-Werts auf die Stabilität der *At*HNL

Das Inaktivierungsverhalten der *At*HNL im sauren pH-Bereich wurde entsprechend dem für die *Me*HNL beschriebenen Verfahren untersucht (Kapitel 3.4.2, 2.5.4).

Wie Tabelle 4.1 zu entnehmen ist, inaktiviert die *At*HNL in einem pH-Bereich unterhalb von pH 5,4 rasch; erst ab pH 5,8 kann das Enzym in Abhängigkeit vom Puffer über mehrere Tage gelagert werden. Insgesamt ist die *At*HNL jedoch im Vergleich zur *Me*HNL deutlich instabiler gegenüber sauren pH-Werten (vgl. Tab. 3.4).

Die rasche Inaktivierung dieses Enzyms, vor allem bei pH-Werten unterhalb von pH 5, erklärt auch die niedrige Aktivität des Enzyms in diesem Bereich (Abb. 4.2). Anders als bei der *MeHNL* ging eine pH-abhängige Inaktivierung der *AtHNL* in jedem Fall mit einem Absinken des löslichen Proteingehaltes einher, was auf eine Aggregation dieses Proteins hindeutet (Abb. 4.3).

Tabelle 4.1: Halbwertszeiten (h) der *AtHNL* in verschiedenen Puffern bei verschiedenen pH-Werten. Die Inkubation erfolgte bei RT. a: Die Halbwertszeit wurde innerhalb des angegebenen Zeitraums nicht überschritten.

pH-Wert	Acetat	Citrat-Phosphat	Glutamat	K- Phosphat
3,4	0	0	0	0
4,0	0	0	0	0
4,4	0	0	0	0
5,0	0.5	0.16	0.5	0.16
5,4	3	2	3	1
5,6	12	4	5	3
5,8	> 24 ^a	> 24 ^a	12	16
6,0	> 72 ^a	60	40	48

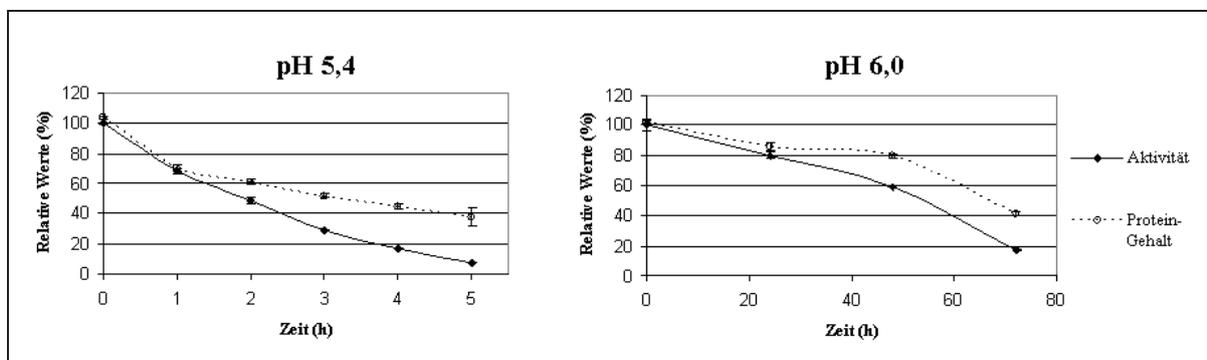


Abbildung 4.3: Zeitliche Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der *AtHNL* in Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 5,4 (links) und pH 6,0 (rechts). Dargestellt sind prozentuale Werte bezogen auf Aktivität und Proteingehalt zu Beginn der Inkubation.

Zur näheren Charakterisierung möglicher struktureller Änderungen, die der Aggregation voraus gehen, wurde die *AtHNL* mit den bereits bei der *MeHNL* beschriebenen spektroskopischen Methoden untersucht.

Eine Ursache für die hohe Stabilität der *MeHNL* im Vergleich zur *AtHNL* könnte unter anderem ihre von der *AtHNL* abweichende Quartärstruktur sein: anders als *AtHNL* liegt die *MeHNL* nicht als Dimer, sondern in tetramerer Form vor (Kapitel 3.2). Zumindest für die

thermische Stabilität von Proteinen wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhter Stabilität und einem höheren Oligomerisierungszustand postuliert [103].

4.2.3 Die AtHNL entfaltet bei niedrigem pH-Wert

Anhand der CD-Spektren des nativen Enzyms bei pH 6,4 und der GnHCl-denaturierten Probe wurde wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, eine Zwei-Punkt Kalibrationsgerade erstellt (Abb. 4.4), mit deren Hilfe der native Proteinanteil bei den nachfolgenden Messungen errechnet wurde.

Die Entfaltung der AtHNL wurde bei pH 5,4 über einen Zeitraum von 220 min verfolgt, da bei diesem pH-Wert aufgrund der zuvor durchgeführten Aktivitätsmessungen (Kapitel 4.2.2) von einer im Messzeitraum kontinuierlich verlaufenden Inaktivierung des Enzyms ausgegangen werden konnte.

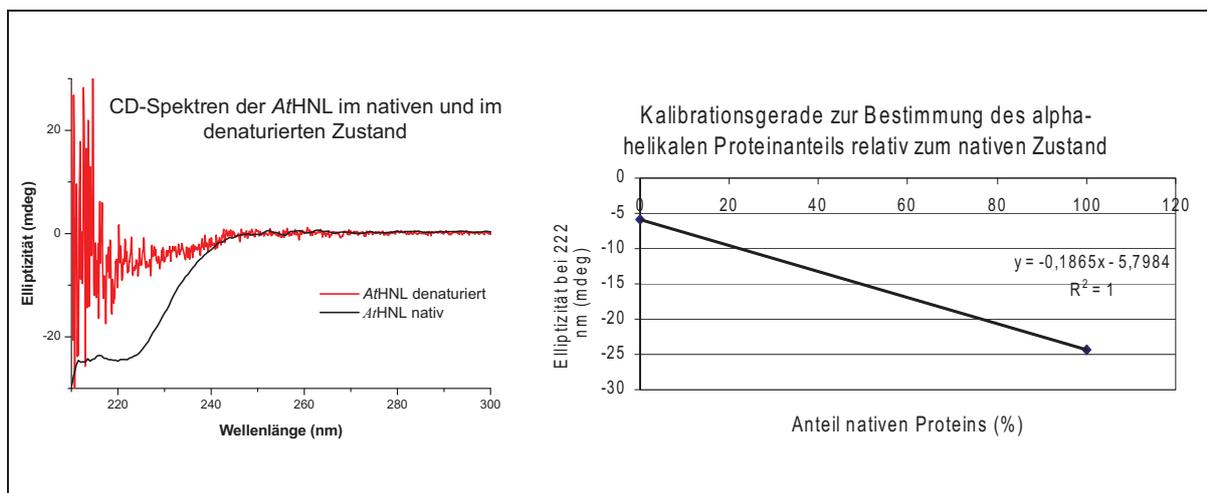


Abbildung 4.4: CD-Spektren der AtHNL im nativen (schwarz) und denaturierten Zustand (rot). Rechts: Eichgerade zur Bestimmung des α -helikalen Proteinanteils relativ zum nativen und denaturierten Zustand. Unterhalb von 210 nm konnten aufgrund der niedrigen Signalstärke keine akkuraten Messungen durchgeführt werden.

Wie erwartet, konnte bei pH 6,4 im Zeitraum von 220 min keine Veränderung der CD-Spektren beobachtet werden (Abb. 4.5), während bei pH 5,4 ein deutlicher Verlust an Elliptizität in dem für α -Helices charakteristischen Spektralbereich zu sehen ist, was auf einen signifikanten Verlust an Sekundärstruktur schließen lässt (Abb. 4.6).

Diese Abnahme des nativen Proteinanteils fand vor allem in den ersten 120 min der Inkubation statt, danach traten keine signifikanten Änderungen im CD-Spektrum mehr auf.

Wie auch bei der MeHNL kann hier nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob Änderungen bei den β -Faltblatt-Anteilen des Enzyms auftraten, da auch hier im spektralen Bereich unterhalb

von 210 nm aufgrund der niedrigen Signalstärke keine Messungen durchgeführt werden konnten.

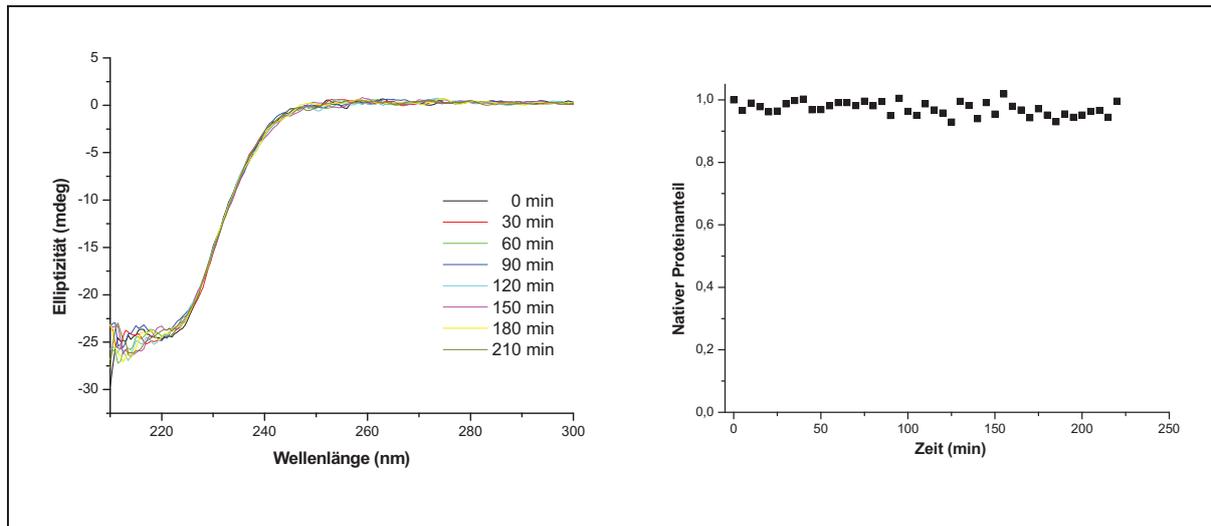


Abbildung 4.5: Einfluss von pH 6,4 auf die Sekundärstruktur der *AtHNL*. Links: Ausgewählte CD-Spektren der *AtHNL* bei pH 6,4 über einen Zeitraum von 220 min. Rechts: Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei pH 6,4.

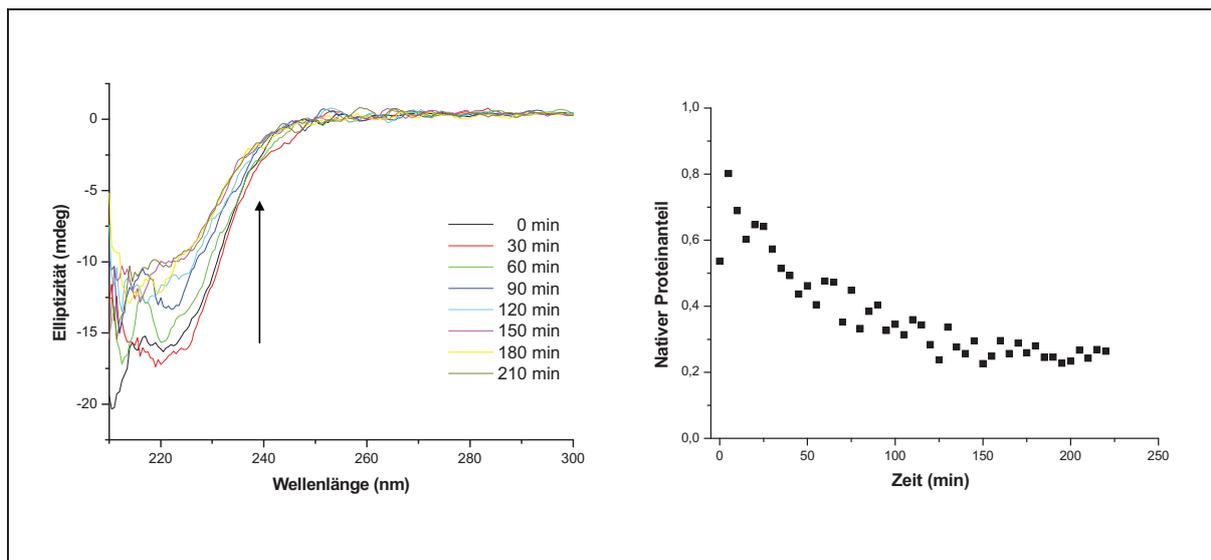


Abbildung 4.6: Einfluss von pH 5,4 auf die Sekundärstruktur der *AtHNL*. Links: Ausgewählte CD-Spektren der *MeHNL* bei pH 5,4 über einen Zeitraum von 220 min. Der Pfeil zeigt die Verschiebung der Spektren an. Rechts: Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei pH 5,4. Als Kontrolle diente eine Probe, die unter ansonsten gleichen Bedingungen bei pH 6,4 inkubiert wurde (Abb. 4.5).

4.2.4 Die strukturellen Änderungen der *AtHNL* sind im Fluoreszenzspektrum nicht sichtbar

Die *AtHNL* enthält drei Tryptophanreste an den Positionen 18, 20 und 218. Diese entsprechen den Tryptophanresten 17, 19 und 218 in der Struktur der *MeHNL* (Abb. 3.14).

Analog der Vorgehensweise bei der CD-spektroskopischen Untersuchung wurden auch hier zunächst Spektren der *At*HNL im nativen Zustand bei pH 6,4 sowie nach der Denaturierung mit 6 M GnHCl aufgezeichnet. Die Entfaltung des Enzyms geht mit einer deutlichen Rotverschiebung des Emissionsmaximums der Fluoreszenz von 331 nm nach 347 nm einher, so dass das Emissionsmaximum der entfalteten *At*HNL nahe dem von freiem Tryptophan in wässriger Lösung liegt (ca. 350 nm, Abb. 4.7). Um strukturelle Veränderungen der *At*HNL fluoreszenzspektroskopisch quantifizieren zu können, wurde auf der Grundlage dieser Spektren entsprechend 2.6.2 eine Zweipunkt-Kalibrationsgerade erstellt, bei der die normierte Fluoreszenzintensität bei 350 nm gegen den nativen Proteinanteil in der Population aufgetragen wurde (Abb. 4.7).

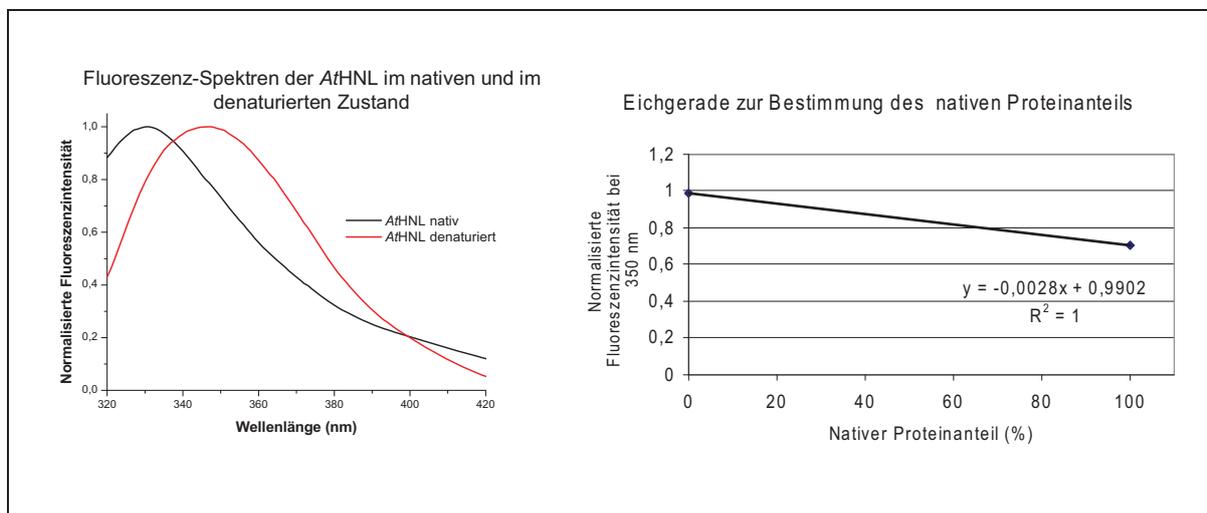


Abbildung 4.7: Fluoreszenzspektren der *At*HNL im nativen (schwarz) und denaturierten Zustand (rot). Die Spektren wurden auf 1 normalisiert. Rechts: Kalibrationsgerade zur Bestimmung des nativen Proteinanteils. Es wurde die normalisierte Fluoreszenzintensität bei 350 nm gegen den Anteil nativen Proteins aufgetragen.

Wie bei den vorangegangenen CD-Messungen wurde die spektrale Änderung der Fluoreszenzspektren bei pH 5,4 über einen Zeitraum von 200 min relativ zu einer Kontrolle bei pH 6,4 untersucht (Abb. 4.8, 4.9).

Bei beiden pH-Werten ist zwar eine leichte Verschiebung der Spektren zu sehen, wobei sich das Emissionsmaximum jedoch nicht signifikant veränderte. Zumindest bei pH 5,4 steht diese äußerst geringfügige Verschiebung nicht in Relation zum beobachteten Aktivitätsverlust oder zum mittels CD-Spektroskopie dokumentierten Strukturverlust im gleichen Zeitraum.

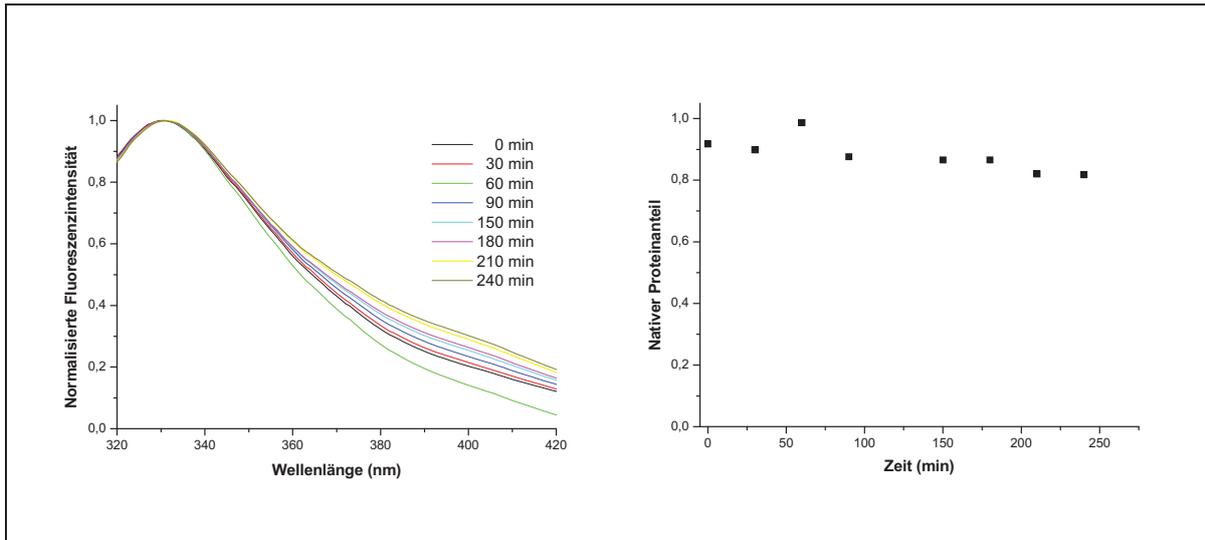


Abbildung 4.8: Einfluss von pH 6,4 auf die Struktur der *AtHNL*. Links: Ausgewählte normalisierte Fluoreszenz-Spektren der *AtHNL* bei pH 6,4 über einen Zeitraum von 240 min. Innerhalb dieses Zeitraumes konnte keine signifikante Veränderung der Spektren beobachtet werden. Rechts: Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei pH 6,4.

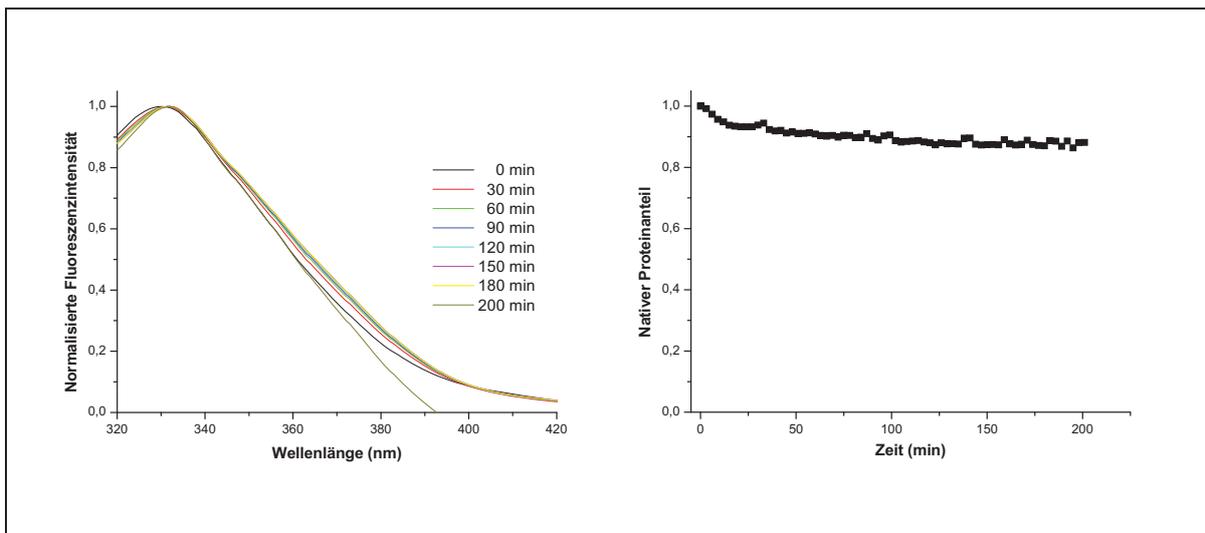


Abbildung 4.9: Einfluss von pH 5,4 auf die Struktur der *AtHNL*. Links: Normalisierte Fluoreszenz-Spektren der *AtHNL* bei pH 5,4 über einen Zeitraum von 200 min. Anders als bei der CD-Spektroskopie konnte hier nur eine schwache Verschiebung der Spektren beobachtet werden, so dass sich auch das Emissionsmaximum während der Inkubation nicht signifikant verschiebt. Rechts: Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei pH 5,4.

4.2.5 Die *AtHNL* aggregiert bei schwach saurem pH

Das Aggregationsverhalten der *AtHNL* wurde mittels SLS-Spektroskopie (Kapitel 2.6.3) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.10 gezeigt.

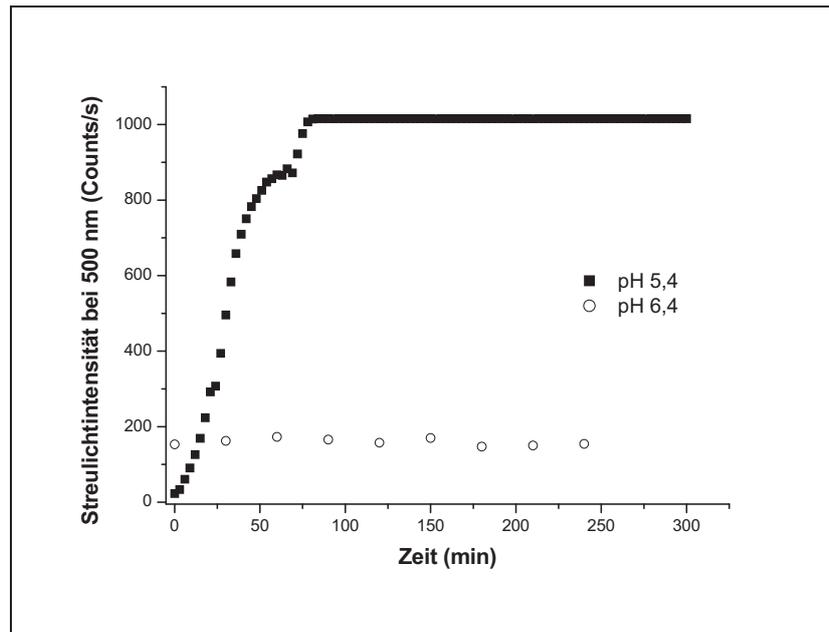


Abbildung 4.10: Zeitliche Entwicklung der Streulichtintensität der *AtHNL* bei 500 nm in Abhängigkeit des pH-Wertes. Untersucht wurde das Verhalten bei pH 5,4, bei dem eine Aggregation erwartet wurde, relativ zu einer stabilen Kontrolle bei pH 6,4.

Zwar konnte in der bei pH 6,4 inkubierten Probe eine im Vergleich zur *MeHNL* (Kapitel 3.4.5) leicht erhöhte Streulichtintensität vorgefunden werden, jedoch bleibt diese im Verlauf der Messung konstant. Anders hingegen verhält sich die Probe bei pH 5,4: bei diesem pH-Wert wurde vom Anfang der Messung an ein schneller Anstieg der Streulichtintensität verzeichnet, bis nach ca. 100 min das obere Detektionslimit des Photometers überschritten war. Dieser rasche Anstieg der Streulichtintensität beweist die bei diesem pH-Wert stattfindende Aggregation.

4.2.6 Effekt eines niedrigen pH-Wertes auf die Struktur der *AtHNL*

Alle bezüglich der pH-abhängigen Inaktivierung der *AtHNL* ermittelten Daten sind zusammenfassend in Abb. 4.11 dargestellt.

Bei der *AtHNL* bewirkt die Inkubation des Enzyms auch in eher schwach sauren pH-Werten einen Verlust der Aktivität. Dieser Aktivitätsverlust geht einerseits mit einer starken Abnahme der Sekundärstruktur einher, wie durch CD-Messungen demonstriert werden konnte, andererseits wird das Absinken der Aktivität von einer schnellen Aggregatbildung begleitet. Fluoreszenzspektroskopisch ist der mittels CD-Spektroskopie beobachtete Strukturverlust nicht erfassbar.

Eine mögliche Ursache für die eher geringfügige Veränderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz der *AtHNL* könnte der direkt zu Beginn der Inkubation einsetzende und

schnell fortschreitende Aggregationsprozess sein, der sich sowohl durch eine Abnahme des löslichen Proteingehaltes als auch durch eine steigende Intensität des Streulichtes bemerkbar macht. Ein solcher Einfluss der Aggregation auf das Fluoreszenzverhalten denaturierender Proteine wurde beispielsweise auch bei verschiedenen α -Amylasen nachgewiesen [102].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die partielle Entfaltung der *At*HNL bereits im schwach sauren pH-Bereich einsetzt, was mit einer Inaktivierung des Enzyms sowie einer schnell verlaufenden Aggregation einhergeht. Die *At*HNL zeigt dabei erst oberhalb von pH 6 ein gewisses Maß an Stabilität. Die Inaktivierung des Enzyms im sauren pH-Bereich (< pH 5) ist so schnell, dass selbst Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten nicht messbar sind (Abb. 4.2).

Bei der strukturell verwandten *Me*HNL hingegen bewirkt der Kontakt zum niedrigen pH-Wert eher zu einem partiellen, aber rasch verlaufenden Verlust an Sekundärstruktur sowie einem darauf folgenden und langsamer verlaufenden partiellen Entfaltungsprozess, der mit einem zeitlichen Abstand von zwei Stunden von der Aggregation des Proteins begleitet wird (Kapitel 3.4.6).

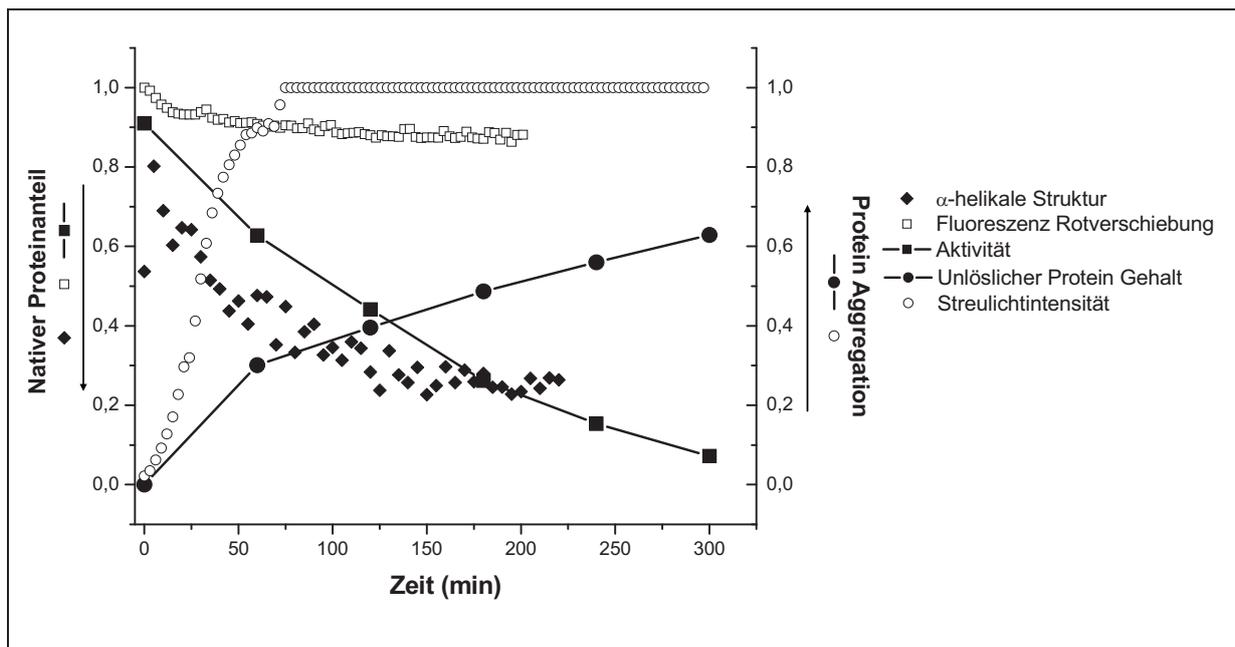


Abbildung 4.11: Der Einfluss von pH 5,4 auf die strukturelle Integrität und das Aggregationsverhalten der *At*HNL. Linke Y-Achse: Abnahme des nativen Proteinanteils. Es sind die Abnahme der Aktivität (relativ zum Startwert), die Abnahme der α -helikalen Strukturelemente (relativ zum nativen und denaturierten Protein) und die relative Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums (relativ zum nativen und denaturierten Protein) dargestellt. Rechte Y-Achse: Zunahme der Proteinaggregate. Abgebildet sind die Zunahme des unlöslichen Proteinanteils (invertierte Abnahme des löslichen Anteils relativ zum Startwert) sowie die Zunahme der Streulichtintensität (relativ zum Detektionsmaximum des Photometers).

4.3 Stabilisierung der AtHNL durch niedermolekulare Zusätze und Zell-Lysate

Zwar zeigt die AtHNL im Temperaturbereich zwischen 0°C und 10°C, in dem Hydrocyanierungsreaktion üblicherweise durchgeführt werden, ein hinreichendes Maß an Stabilität (Kapitel 4.4), jedoch ist die Stabilität des Enzyms auch gegenüber schwach sauren pH-Werten wie pH 5,4 eher gering; für einen Einsatz dieser HNL im technischen System muss diese also zunächst ausreichend stabilisiert werden.

Im Falle der homologen Enzyme aus *Hevea brasiliensis* und *Manihot esculenta* konnte eine Stabilisierung des jeweiligen Enzyms bei niedrigen pH-Werten durch den Zusatz von Saccharose oder Sorbitol (*HbHNL*, [253, 261]) bzw. den Einsatz von *E. coli*-Zell-Lysaten (*MeHNL*, Kapitel 3.6.1.2) erzielt werden. Da alle drei Möglichkeiten verhältnismäßig einfach zu realisieren sind und, wie im Falle der Zell-Lysate, aufgrund der wegfallenden Aufarbeitungsprozedur sogar einen Kostenvorteil bieten können, wurde der Einfluss dieser Zusätze auf die Stabilität der AtHNL untersucht. Hierzu wurde der AtHNL Saccharose in einer Endkonzentration von 200 oder 400 mg/ml oder Sorbitol in eine Endkonzentration von 100 oder 200 mg/ml zugesetzt; darüber hinaus wurden *E. coli*-Zellrohextrakte einer AtHNL-Expressionskultur auf ihre pH-Stabilität getestet.

Die Stabilität der AtHNL kann durch den Zusatz von Saccharose oder Sorbitol signifikant gesteigert werden: während die Halbwertszeit bei pH 5,4 ohne Zusatz bei zwei Stunden liegt, ist das Enzym nach dem Zusatz von 200 mg/ml Sorbitol oder 400 mg/ml Saccharose über 72 Stunden stabil (Tab. 4.2). Bei einem niedrigeren pH von 4,0 konnte hingegen keine Stabilisierung erzielt werden, das Enzym inaktivierte bei allen getesteten Zusätzen unmittelbar zu Beginn der Inkubation.

Die Inkubation der AtHNL im *E. coli*-Zellrohextrakt bewirkt keine Steigerung der Stabilität bei pH 5,4. Anders als bei *MeHNL*-Rohextrakten kann bei diesem pH-Wert auch keine Bildung von massiven Proteinaggregaten beobachtet werden, da möglicherweise ein schwach saurer pH von 5,4 noch nicht ausreicht, die Aggregation der schützenden Zell-Proteine zu initiieren. Daher wurde zusätzlich getestet, ob bei pH 4,0 ein stabilisierender Effekt des Zell-Lysates auf die AtHNL messbar ist. Zwar konnte die Bildung eines flockigen Niederschlags beobachtet werden, was auf eine Aggregation der in der Lösung vorhandenen Proteine hindeutet, jedoch wurde auch hier keine Stabilisierung erzielt, da das Enzym sofort bei Kontakt zum niedrigen pH-Wert inaktiviert.

Tabelle 4.2: Halbwertszeiten (h) der AtHNL bei pH 5,4 mit verschiedenen Zusätzen. a: Die Halbwertszeit konnte innerhalb des angegebenen Zeitraums nicht überschritten werden.

Ohne Zusatz	Saccharose		Sorbitol		Zell-Lysat
	200 mg/ml	400 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml	
2	24	> 72 ^a	24	> 72 ^a	2

4.4 Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität der AtHNL

4.3.1 Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der AtHNL

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der AtHNL bezüglich der Spaltung von Mandelonitril wurde im Temperaturbereich von 5 bis 50° C bestimmt (Abb. 4.12).

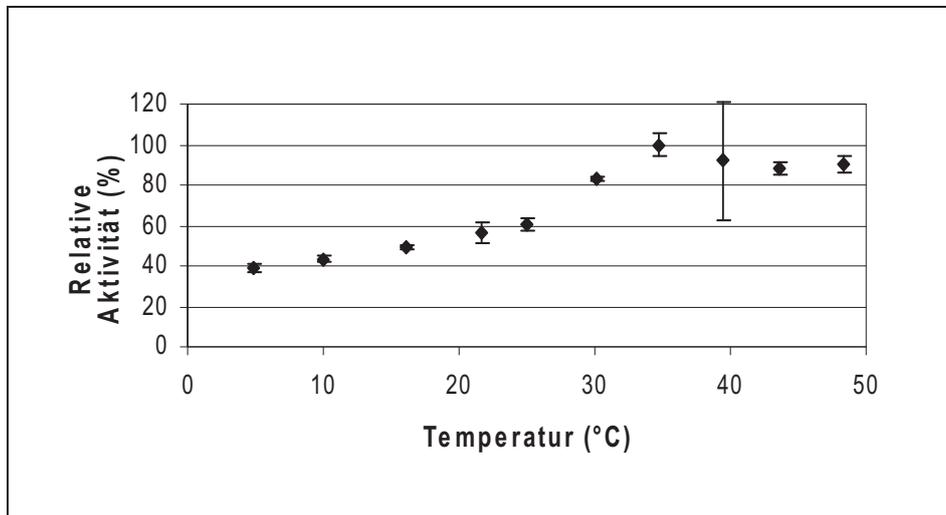


Abbildung 4.12: Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der AtHNL in Abhängigkeit von der Temperatur. Die spezifischen Aktivitäten lagen zwischen 7-18 U/mg und wurden auf den Maximalwert bei 35°C normiert. Alle Messungen wurden in Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0) durchgeführt. (Nach [65]; Daten wurden von J. Andexer erhoben)

Die AtHNL weist eine maximale Aktivität bei einer Temperatur von 35°C auf, aber auch in dem für die technische Anwendung interessanten Bereich zwischen 0 und 10°C ist bereits ein signifikantes Maß an Aktivität messbar (ca. 40 % des Maximalwertes). Die Aktivierungsenergie der AtHNL für die Spaltung von Mandelonitril beträgt 15 kJ/mol (Abb. 4.13). Entsprechend ihrer höheren Aktivierungsenergie von 24 kJ/mol liegt die Aktivität der strukturell ähnlichen MeHNL mit ca. 30 % der Maximalaktivität im technisch relevanten Temperaturbereich niedriger als die der AtHNL, was zumindest im Bezug auf die Temperaturabhängigkeit der Aktivität einen Vorteil für die AtHNL darstellt.

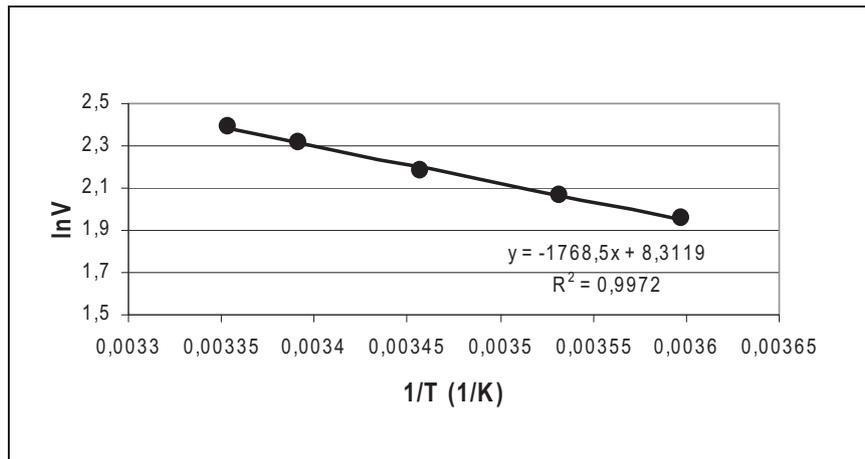


Abbildung 4.13: Arrhenius-Plot zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der *AtHNL*. Es wurde der natürliche Logarithmus (ln) der spezifischen Aktivität gegen die reziproke absolute Temperatur aufgetragen.

4.3.2 Der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der *AtHNL*

Die Stabilität der *AtHNL* wurde im Temperaturbereich von 0°C bis 60°C untersucht, wobei wie bei der Bestimmung der pH-Stabilität die zeitliche Entwicklung von Aktivität und löslichem Proteingehalt beobachtet wurden.

Im Temperaturbereich zwischen 0°C und 30°C ist die *AtHNL* über mehr als 50 h stabil (Tab. 4.3). Ab einer Temperatur von 37°C inaktiviert das Enzym zunehmend schnell. Der Verlust der Aktivität geht dabei mit einem Absinken des löslichen Proteingehaltes einher, was wiederum auf eine entfaltungsinduzierte Aggregation des Enzyms schließen lässt (Abb. 4.14).

Wie die pH-Stabilität ist auch die Thermostabilität der *MeHNL* im Vergleich zur *AtHNL* deutlich höher (Kapitel 3.5.2); beides könnte auf den höheren Oligomerisierungszustand der *MeHNL* (Kapitel 3.2) zurückzuführen sein [103].

Tabelle 4.3: Halbwertszeiten (h) der *AtHNL* bei verschiedenen Temperaturen in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0. a: Die Halbwertszeit konnte innerhalb des angegebenen Zeitraums nicht überschritten werden. (Nach [65]; Daten wurden von J. Andexer erhoben)

0°C	4°C	10°C	22°C	30°C	37°C	50°C	60°C
>96 ^a	>96 ^a	>96 ^a	80	33	6.6	0.3	<0.16

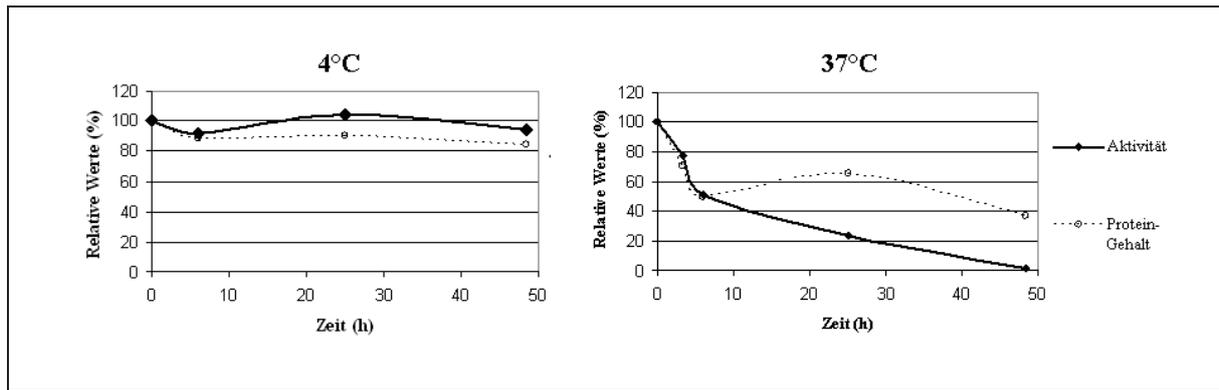


Abbildung 4.14: Zeitliche Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der *AtHNL* in Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,0) bei 4°C (links) und 37°C (rechts). Dargestellt sind prozentuale Werte bezogen auf Aktivität und Proteingehalt zu Beginn der Inkubation. (Nach [65]; Daten wurden von J. Andexer erhoben.)

4.3.3 Die thermische Inaktivierung der *AtHNL* geht mit einer Entfaltung einher

Die thermische Inaktivierung wurde bei 37°C mittels CD-Spektroskopie untersucht. Bei dieser Temperatur hat die *AtHNL* eine Halbwertszeit von 6,6 h. Wie in Abb. 4.15 gezeigt, kommt es, wie bei der *MeHNL* auch (Kapitel 3.5.3), unmittelbar mit der Inkubation zum kontinuierlichen Verlust α -helikaler Struktur, was ein deutlicher Hinweis auf eine thermische Entfaltung des Enzyms ist.

Beim Vergleich der zeitlichen Entwicklung von Aktivität, Sekundärstruktur und Proteingehalt (Abb. 4.16) wird deutlich, dass die Aktivität des Enzyms im gleichen Maße abnimmt wie der lösliche Proteingehalt, jedoch schneller fällt als der Anteil der α -helikalen Struktur.

Eine mögliche Erklärung für diese Divergenz zwischen der Abnahme der Aktivität und der Abnahme der Sekundärstrukturanteile des Proteins könnte in diesem Fall darin bestehen, dass auch geringfügige strukturelle Veränderungen ausreichen, um einerseits die Aktivität des Enzyms zu mindern und andererseits den beobachteten Aggregationsprozess auszulösen, der sich wahrscheinlich zusätzlich auf die in der Probe vorhandene Aktivität auswirkt.

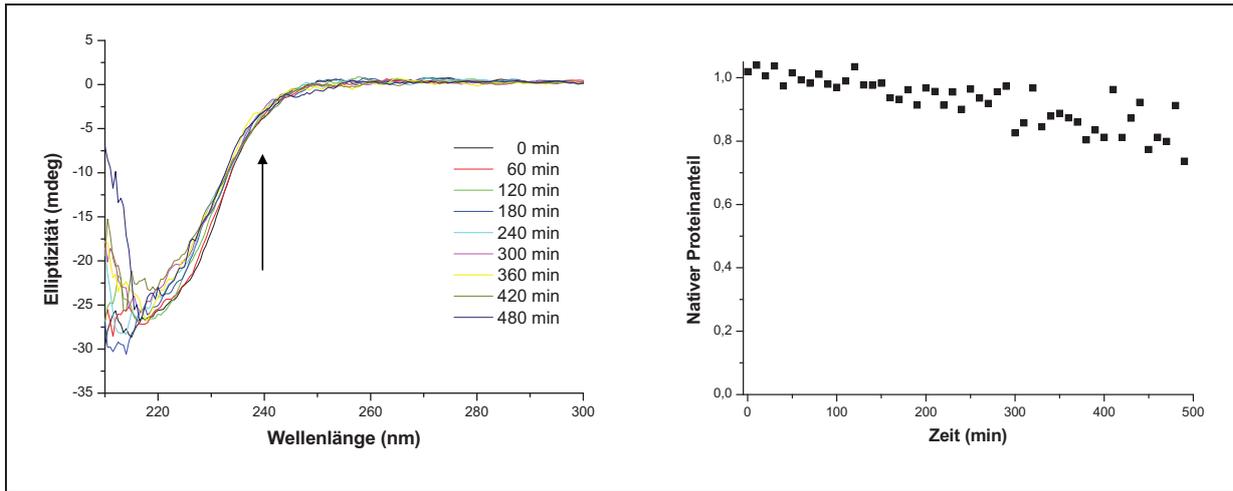


Abbildung 4.15: Links: Ausgewählte CD-Spektren der AtHNL bei 37°C und pH 6,0 über einen Zeitraum von 480 min. Der Pfeil zeigt die Verschiebungsrichtung der Spektren an. Rechts: Zeitliche Entwicklung des nativen Proteingehaltes bei 37°C. Der native Proteinanteil wurde mittels der Eichgeraden aus Abb. 4.4 errechnet.

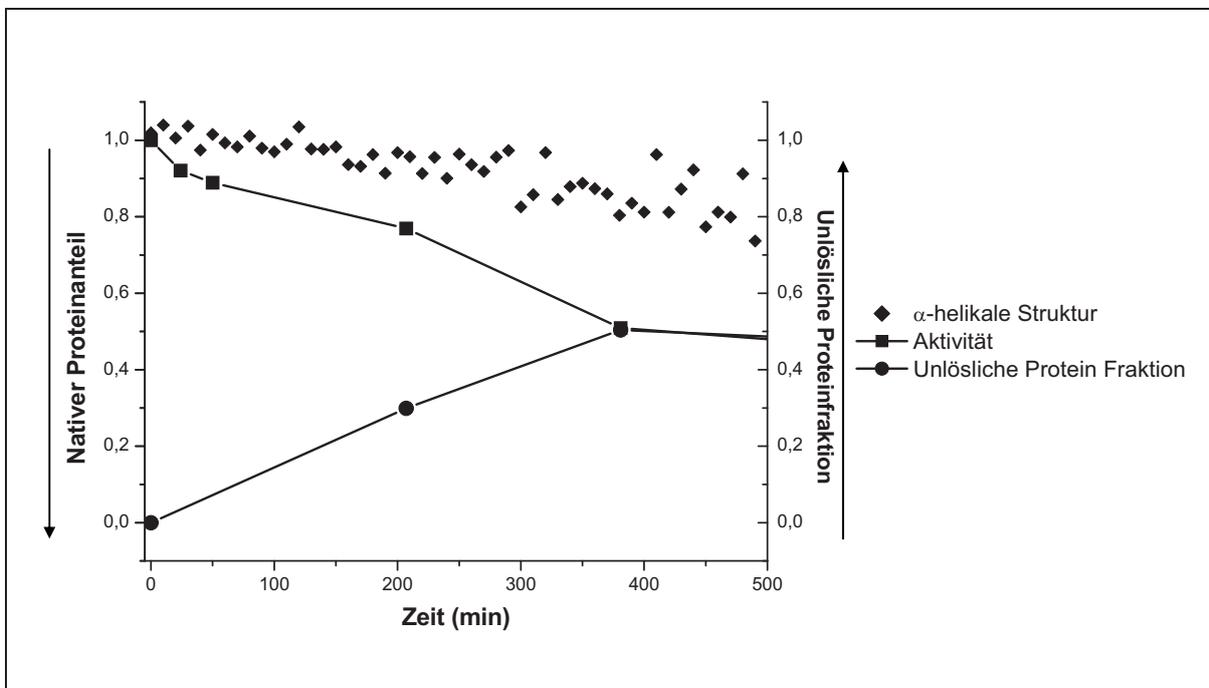


Abbildung 4.16: Der Einfluss der Temperatur auf die strukturelle Integrität und den löslichen Proteinanteil der AtHNL. Linke Y-Achse: Abnahme des nativen Proteinanteils. Es sind die Abnahme der Aktivität (relativ zum Startwert und die Abnahme der α -helikalen Strukturelemente (relativ zum nativen und denaturierten Protein) dargestellt. Rechte Y-Achse: Zunahme der Proteinaggregate. Abgebildet ist die Zunahme des unlöslichen Proteinanteils (invertierte Abnahme des löslichen Anteils relativ zum Startwert).

4.3.4 Bestimmung der Schmelztemperatur der *At*HNL

Neben der kinetischen Stabilität der *At*HNL, die vor allem unter Reaktionsbedingungen wichtig ist, kann auch die thermodynamische Stabilität eines Enzyms ein wichtiges Charakteristikum sein. Eine zuverlässige Möglichkeit, eine Aussage über die thermodynamische Stabilität eines Enzyms zu treffen, ist die Bestimmung der Schmelztemperatur mittels CD-Spektroskopie (Kapitel 2.6.1). Im Falle der *At*HNL lag diese bei $57,0^{\circ}\text{C} \pm 0,22^{\circ}\text{C}$ (Abb. 4.17). Dies zeigt, dass die *Me*HNL, deren Schmelztemperatur bei $69,3^{\circ}\text{C}$ liegt, nicht nur kinetisch, sondern auch thermodynamisch stabiler ist als die *At*HNL (Kapitel 3.5.4).

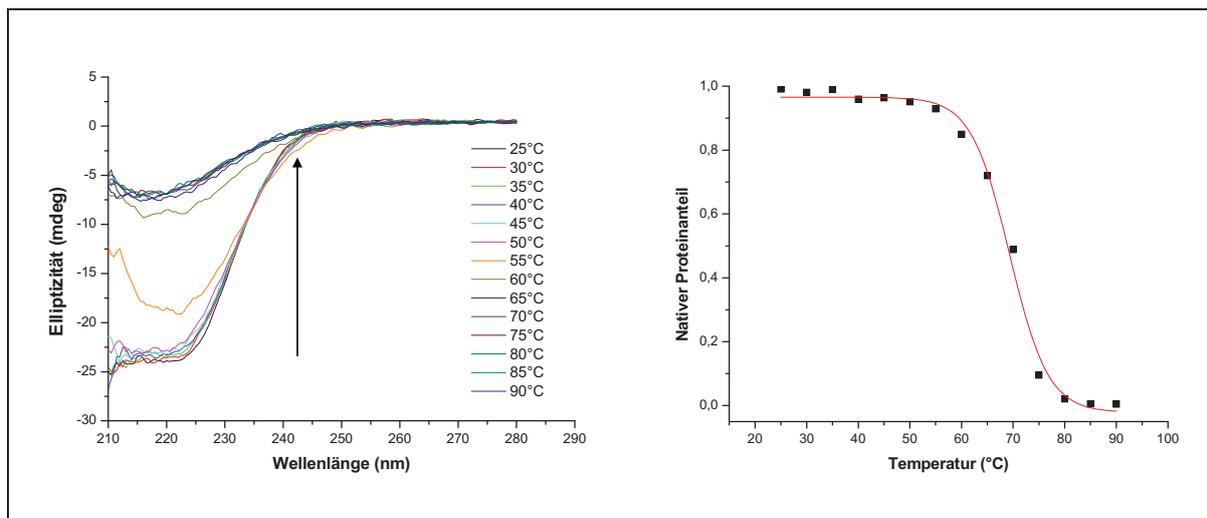


Abbildung 4.17: CD-spektroskopische Bestimmung der Schmelztemperatur der *At*HNL. Links: CD-Spektren in Abhängigkeit der Temperatur. Der Pfeil gibt die Richtung der Entwicklung der Spektren mit steigender Temperatur an. Rechts: Auftragung der nativen Proteinfraction gegen die Temperatur. Die Schmelztemperatur liegt hier bei $57,0 \pm 0,22^{\circ}\text{C}$.

5. Die HNL aus *Linum usitatissimum*

Bei der HNL aus *Linum usitatissimum* handelt es sich um ein kommerziell verfügbares Enzym, das jedoch im Vergleich zu anderen HNLs wenig genutzt wird. Ein Grund hierfür ist unter anderem das auf aliphatische Aldehyde und Ketone beschränkte Substratspektrum. Dieses lässt zum einen die Produktion vieler kommerziell interessanter Chemikalien wie z.B. Mandelonitril oder 3-Phenoxy-Benzaldehydcyanhydrin nicht zu, zum anderen erschwert es die Charakterisierung des Enzyms, da die gängigen direkten photometrischen Assays, die auf der Spaltung aromatischer Cyanhydrine wie Mandelonitril oder p-Hydroxy-Mandelonitril beruhen [244, 270], nicht genutzt werden können.

Außerdem lässt sich die *LuHNL* im Vergleich zu anderen HNLs wie z.B. der *MeHNL* eher schlecht in mikrobiellen Wirten wie *E. coli* exprimieren, was ein Nachteil bei der Produktion dieses Enzyms ist.

Neben der notwendigen Optimierung des Substratspektrums sollten im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich Experimente zur pH- und Thermostabilität des Enzyms durchgeführt werden.

5.1 Klonierung, Expression und Reinigung der *LuHNL*

Zum Zweck der Charakterisierung wurde das für die *LuHNL* codierende Gen zunächst über die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* in das Plasmid pET28a kloniert, so dass das Enzym mit einem N-terminalen Hexahistidin-Tag exprimiert werden konnte (s. Anhang).

In vorangegangenen Studien war bereits gezeigt worden, dass sich ein solcher His-Tag nicht negativ auf die Aktivität der *LuHNL* auswirkt und deren Aufarbeitung wesentlich vereinfacht [70].

Die Expression der *LuHNL* erfolgte auf der Basis eines Protokolls von JCS/Codexis (J. Henemann, persönliche Mitteilung) im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) in Autoinduktionsmedium (Kapitel 2.2.1, 2.2.4), die Aufarbeitung mittels IMAC (Kapitel 2.4.2.2). Ausgehend von 12,3 g Zellen konnten 5,1 mg gereinigte *LuHNL* mit einer Reinheit von ca. 95% und einer spezifischen Aktivität von 50 U/mg gewonnen werden (Abb. 5.1, Tab. 5.1).

Hinsichtlich der eher geringen Ausbeute an Enzym ist diese Bilanz mit der anderer Reinigungen vergleichbar [70, 87]. Auch die spezifische Aktivität der gereinigten *LuHNL* mit N-terminalem His-Tag liegt mit 50 U/mg im Bereich vorangegangener Studien, bei denen spezifische Aktivitäten von 40, 76 oder 92 U/mg erzielt wurden [70, 71, 87]. Die Varianzen zwischen den jeweiligen Aktivitätswerten sind vermutlich zumindest teilweise auf die Nutzung

unterschiedlicher Aktivitäts-Assays sowie auf Unterschiede bei der Bestimmung der Proteinkonzentration zurückzuführen.

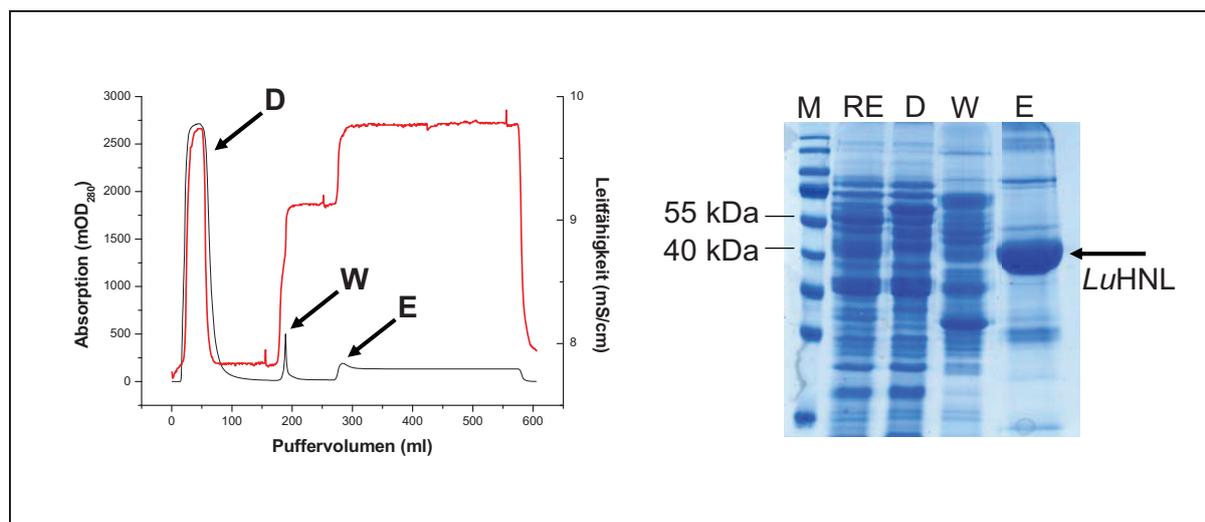


Abbildung 5.1: Chromatogramm (links) und SDS-PAGE-Analyse (rechts) der *LuHNL*-Reinigung mittels Immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Schwarz: OD₂₈₀, Rot: Leitfähigkeit. Die Peaks des Durchlaufs, der Waschfraktion und der Aktivität aufweisenden Elutionsfraktion sind mit einem Pfeil markiert. SDS-PAGE: RE: Rohextrakt, D: Durchlauf bei der IMAC, W: Waschfraktion (20 mM Imidazol), E: Elutionspeak (200 mM Imidazol).

Tabelle 5.1: Reinigung der *LuHNL* durch IMAC.

Reinigungs-schritt	Volumetrische Aktivität (U/ml)	Protein-Gehalt (mg/ml)	Gesamt-aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungs-Faktor
Rohextrakt	7,5	5	472,5	1,5	100	1
IMAC (Ni-NTA)	11,3	0,2	452	56,5	96	38
Amicon YM-10	15	0,3	255	50	66	33

5.2 Der Einfluss des Puffers auf die Aktivität der *LuHNL*

Die Aktivität der *LuHNL* wurde in Acetat-, Citrat-Phosphat-, Glutamat- und Kaliumphosphat-Puffer bei einem pH-Wert von 5,0 analysiert (Abb. 5.2). Eine Puffer-bedingte Inhibition, wie sie z.B. bei der *MeHNL* auftrat (Kapitel 3.3.1), wurde in keinem der Fälle beobachtet. In allen vier Puffern liegen die Aktivitäten in einem vergleichbaren Rahmen, wobei das Enzym maximale Aktivität in Citrat-Phosphat-Puffer zeigte.

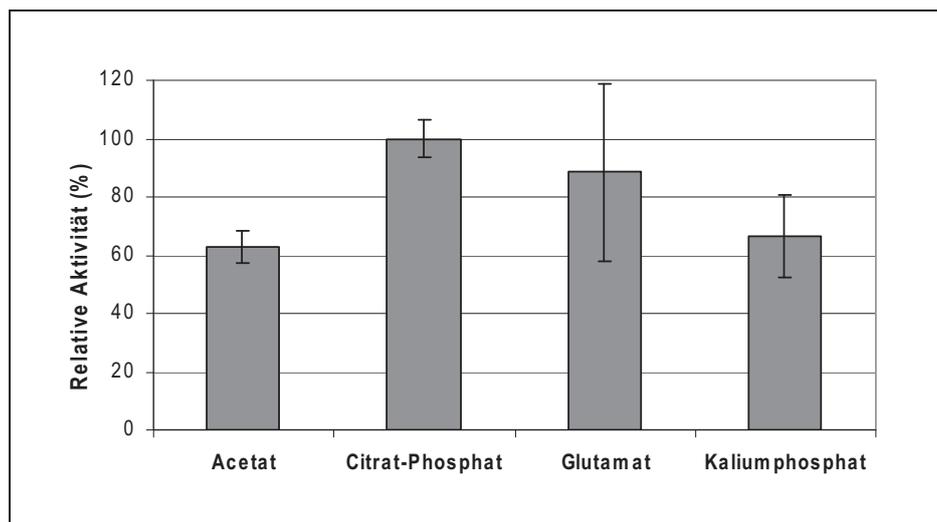


Abbildung 5.2: Aktivität der *LuHNL* in verschiedenen Puffern. Die spezifische Aktivität lag zwischen 57 – 90 U/mg und wurde auf die Aktivität in Citrat-Phosphat-Puffer (=100%) normiert.

5.3 Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität und Stabilität der *LuHNL*

Im Hinblick auf die tatsächliche Nutzbarkeit der *LuHNL* zur Synthese chiraler Cyanhydrine wurde zunächst der Einfluss des pH-Wertes auf Aktivität und Stabilität näher untersucht. Im Vordergrund stand, wie bei den vorangegangenen Untersuchungen, der pH-Bereich unterhalb von pH 6.

5.3.1 Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der *LuHNL*

Die Aktivität der *LuHNL* wurde in einem pH-Bereich von pH 3,5 bis 6,0 in Citrat-Phosphat-Puffer analysiert. Oberhalb von pH 6 war es aufgrund der rasch zunehmenden Autohydrolyse des Substrats Acetoncyanhydrin nicht möglich, Aktivitätsmessungen durchzuführen.

Ein Maximalwert der Aktivität im eigentlichen Sinne konnte in dem hier betrachteten pH-Bereich nicht beobachtet werden, da die Aktivität im gesamten Bereich mit dem pH-Wert ansteigt. Wie in Abb. 5.3 dargestellt, steigt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der *LuHNL* zwischen pH 3,4 und 5,0 konstant mit dem pH-Wert an, wobei das Enzym auch bei den niedrigen pH-Werten bereits eine deutliche Aktivität zeigt. Oberhalb von pH 5 nimmt die Aktivität mit steigendem pH-Wert deutlich schneller zu.

Für das aus *Linum usitatissimum* isolierte Wildtyp-Enzym wurde ein pH-Optimum von pH 5,5 beschrieben [271]. Die Differenz zwischen den hier ermittelten Werten und denen aus der Literatur lässt sich möglicherweise auf die Nutzung verschiedener Assays zurückführen,

bei denen zwar die genutzten Puffer übereinstimmen, die dafür jedoch hinsichtlich der Vorgehensweise und der genutzten Nachweisreagenzien voneinander abweichen [245, 272].

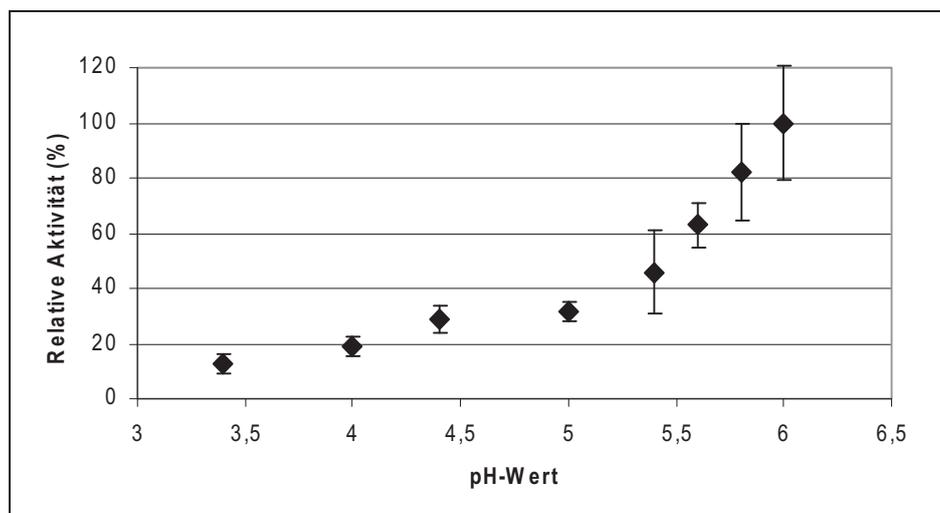


Abbildung 5.3: Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der *LuHNL* in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die spezifischen Aktivitäten lagen zwischen 8 und 235 U/mg und wurden auf die maximale hier detektierte Aktivität bei pH 6 (=100%) normiert.

5.3.2 Der Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der *LuHNL*

Trotz ihrer kommerziellen Nutzung fehlten bislang Daten zur pH-abhängigen Stabilität der *LuHNL*. Um diese Lücke zu schließen, wurde die Stabilität der *LuHNL* in Abhängigkeit des pH-Wertes in Citrat-Phosphat-Puffer im pH-Bereich von pH 3,4 bis 6,4 untersucht. Hierbei wurde, zusätzlich zur Desaktivierung, auch der lösliche Proteingehalt verfolgt, um einen möglichen Aggregationsprozess erkennen zu können. Wie in Tab. 5.2. gezeigt, sinkt die Halbwertszeit unterhalb von pH 6 drastisch.

Anders als bei anderen untersuchten HNLs geht die pH-abhängige Inaktivierung der *LuHNL* nur mit einem anfänglichen geringen Verlust an löslichem Proteingehalt einher, was auf ein eher niedriges Maß an Aggregation schließen lässt. Dies könnte auf einen Inaktivierungsmechanismus hindeuten, der von dem der *MeHNL* und der *AtHNL* abweicht und nicht mit einer Entfaltung des Enzyms einhergeht, die einer Aggregation vorausgeht. Vor dem Hintergrund, dass die Proteinkonzentrationen in den Inkubationsansätzen in allen drei Fällen ähnlich waren und ein abweichendes Aggregationsverhalten aufgrund einer niedrigeren Enzymkonzentration dadurch nicht plausibel ist, könnte eine mögliche Erklärung beispielsweise eine Aufspaltung von Salzbrücken zwischen den beiden Untereinheiten der *LuHNL* sein, die eine Dissoziation des Homodimers bewirkt (Kapitel 1.3.5). Da das aktive Zentrum der *LuHNL* von beiden Untereinheiten gebildet wird (Kapitel 1.2.5), ist diese für ihre korrekte Funktion auf ein Vorliegen als Dimer angewiesen. Eine pH-abhängige Dissoziation der beiden Untereinheiten, wie

sie auch für andere Proteine nachgewiesen werden konnte [162], könnte also den Aktivitätsverlust erklären.

Darüber hinaus ist die Bindung der beiden katalytisch bzw. strukturell wichtigen Zinkionen sowie von NAD⁺ für die Funktion erforderlich. Alle diese Bindungen könnten durch eine pH-Änderung ebenfalls beeinflusst werden [57].

Tabelle 5.2: Halbwertszeiten (h) der LuHNL in Citrat-Phosphat-Puffer bei verschiedenen pH-Werten. Die Inkubation erfolgte bei RT. a: Die Halbwertszeit wurde innerhalb des angegebenen Zeitraums nicht überschritten.

pH-Wert	3,4	4	4,4	5	5,4	6	6,4
Halbwertszeit (h)	<0,66	1,33	5	24	>24 ^a	>120 ^a	>120 ^a

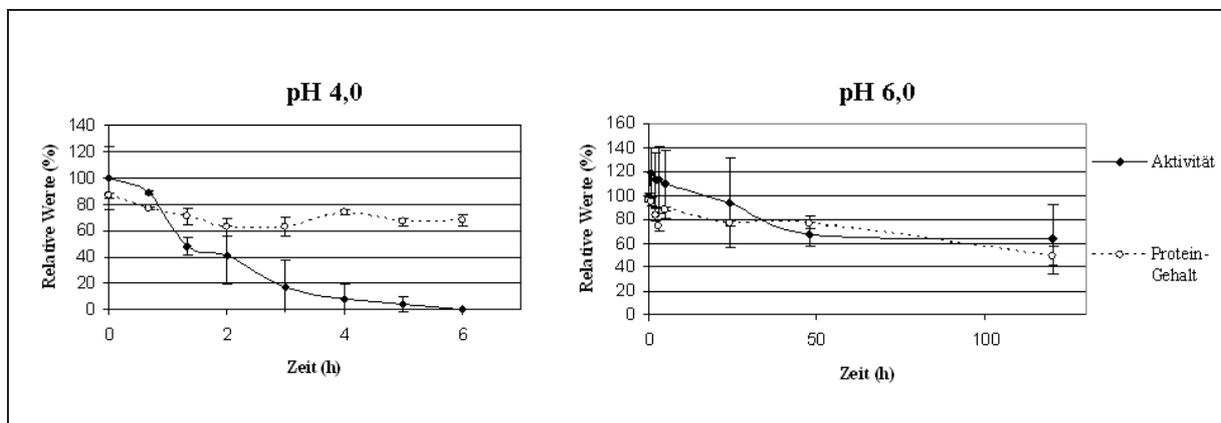


Abbildung 5.4: Zeitliche Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der LuHNL in Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 4,0 (links) und pH 6,0 (rechts). Dargestellt sind prozentuale Werte bezogen auf Aktivität und Proteingehalt zu Beginn der Inkubation.

5.4 Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität der LuHNL

5.4.1 Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der LuHNL

Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität wurde in einem Bereich zwischen 16°C und 35°C untersucht (Abb. 5.5). Oberhalb von 35°C konnte die enzymatische Aktivität aufgrund der mit der Temperatur steigenden Autohydrolyse des Substrates Acetoncyanhydrin nicht mehr bestimmt werden. Innerhalb dieses Temperaturbereichs wurde eine linear mit der Temperatur zunehmende Aktivität der LuHNL beobachtet; ein Temperaturmaximum im eigentlichen Sinne wurde jedoch im untersuchten Bereich nicht gefunden.

Aus dem dargestellten Aktivitätsprofil wurde die Aktivierungsenergie der LuHNL für die Spaltung von Acetoncyanhydrin errechnet. Diese liegt bei 107 kJ/mol (Abb. 5.6).

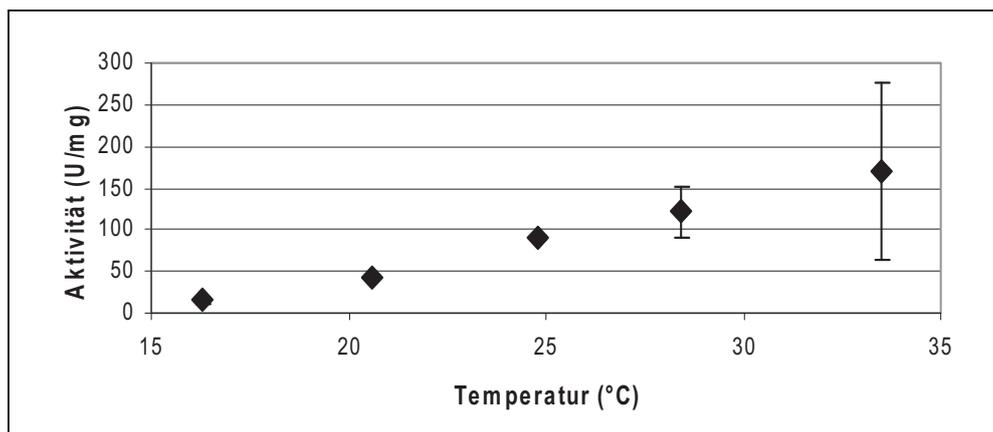


Abbildung 5.5: Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der *LuHNL* in Abhängigkeit von der Temperatur. Die spezifischen Aktivitäten lagen zwischen 14-170 U/mg. Alle Messungen wurden in Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0) durchgeführt

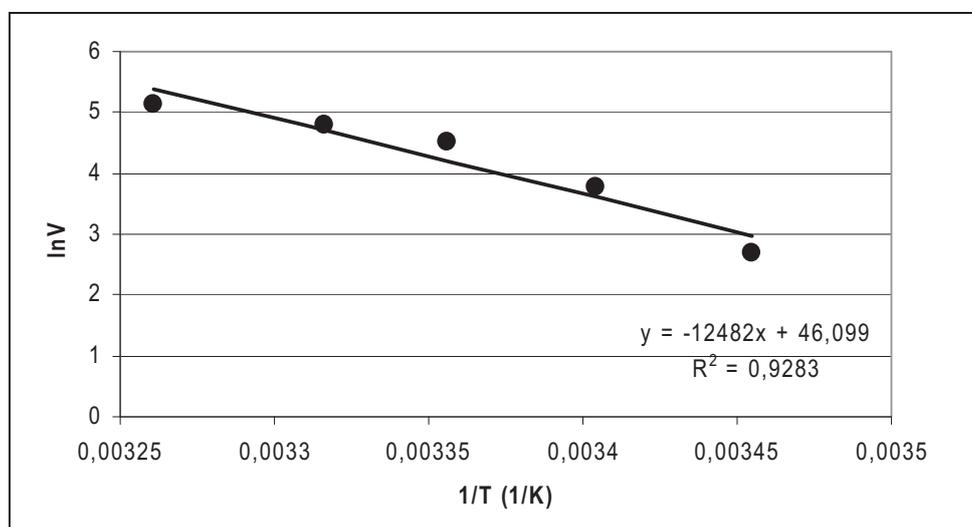


Abbildung 5.6: Arrhenius-Plot zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der *LuHNL*. Es wurde der natürliche Logarithmus (ln) der spezifischen Aktivität gegen die reziproke absolute Temperatur aufgetragen.

5.4.2 Der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der *LuHNL*

Die Stabilität der *LuHNL* wurde in einem Temperaturbereich zwischen 0°C und 60°C untersucht. Im Temperaturbereich zwischen 0°C und 30°C ist die *LuHNL* mehrere Tage stabil, während sie oberhalb von 37°C schnell inaktiviert (Tab. 5.3). Im Gegensatz zur pH-induzierten Inaktivierung geht die thermische Inaktivierung mit dem Verlust an löslichem Protein einher.

Tabelle 5.3: Halbwertszeiten (h) der *LuHNL* bei verschiedenen Temperaturen in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5. a: Die Halbwertszeit wurde innerhalb des angegebenen Zeitraums nicht überschritten.

Temperatur (°C)	0	10	20	30	37	50	60
Halbwertszeit (h)	>144 ^a	135	85	60	15	<1	<0,3

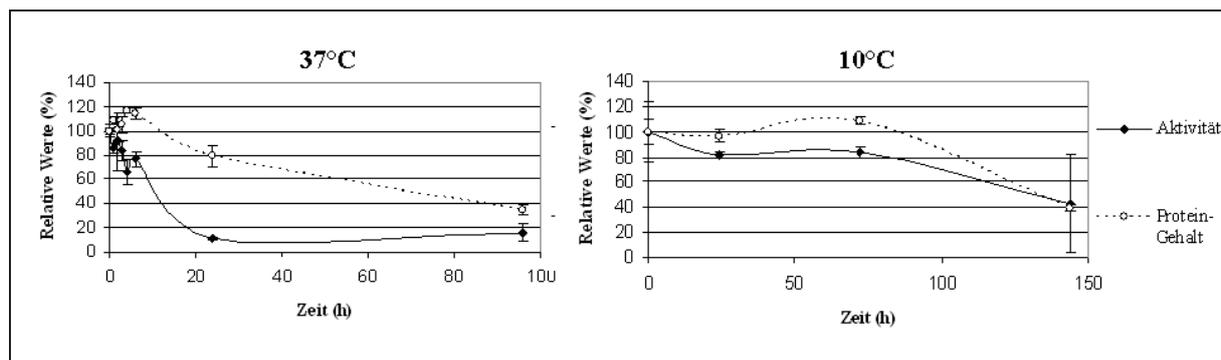


Abbildung 5.7: Zeitliche Entwicklung von Aktivität und Proteingehalt der *LuHNL* in Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5, bei 37°C (links) und 10°C (rechts). Dargestellt sind prozentuale Werte bezogen auf Aktivität und Proteingehalt zu Beginn der Inkubation.

5.5 Erweiterung des Substratspektrums

Ein wesentlicher Nachteil der *LuHNL* ist vor allem ihr eng begrenztes Substratspektrum (Kapitel 1.2.5). Zwar konnte in einer neueren Studie gezeigt werden, dass die *LuHNL* Substrate umsetzen kann, die über ein aromatisches Ringsystem verfügen. Es handelte sich jedoch bei diesen Substraten nicht um durchgängig konjugierte Doppelbindungssysteme, da die aromatischen Ringsysteme jeweils durch mindestens eine Methylgruppe von der Carbonylfunktion getrennt vorlagen. Substrate wie das im eigentlichen Sinne aromatische Acetophenon wurden auch im Rahmen dieser Studie kaum und wenn, dann nicht enantioselektiv umgesetzt [73]. Um diesen gravierenden Nachteil auszugleichen, sollte das Substratspektrum des Enzyms unter Beibehaltung der Enantioselektivität erweitert werden. In erster Linie sollte es hierbei ermöglicht werden, das aromatische Modell-Substrat Mandelonitril umzusetzen. Dieses wird, wie das strukturell sehr ähnliche Acetophenoncyanhydrin, nicht von der *LuHNL* als Substrat akzeptiert [271]. Da zu Beginn der Experimente die Kristallstruktur der *LuHNL* noch nicht verfügbar war, wurde zunächst mittels gerichteter Evolution versucht, das Substratspektrum des Enzyms zu erweitern (Kapitel 5.5.1). Nachdem die *LuHNL*-Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst war [57], wurde diese zur rationalen Planung geeigneter Mutationen verwendet (Kapitel 5.5.2).

5.5.1 Erweiterung des Substratspektrums durch gerichtete Evolution

Da zu Beginn der Experimente wenig gesicherte Informationen hinsichtlich des katalytischen Mechanismus und der Struktur der *LuHNL* verfügbar waren und die einzige bislang getestete sequenziell ähnliche ADH keinerlei HNL-Aktivität aufwies [273], erschien es am aussichtsreichsten, zur Optimierung der *LuHNL* eine ungerichtete Mutagenesemethode, wie epPCR, zu

nutzen. Mögliche Treffer eines solchen Screenings können prinzipiell in weiteren Mutagenese-Schritten durch z.B. Sättigungsmutagenese oder rekombinative Methoden, wie das DNA-Shuffling, miteinander kombiniert werden, um weitere Verbesserungen zu erzielen.

5.5.1.1 Validierung des Screening-Systems

Für ein Screening auf eine erweiterte Substratazeptanz der *LuHNL* musste zunächst das für die gerichtete Evolution der *MeHNL* entwickelte Protokoll entsprechend angepasst und validiert werden.

Die Homogenität des Zellwachses wurde bestimmt, indem auf drei DW-MTPs mit insgesamt 264 die Wildtyp-*LuHNL* exprimierende *E. coli* (BL21)DE2-pROx-Kulturen unter Standardbedingungen (Kapitel 2.7) kultiviert und induziert wurden. Die OD_{580} betrug nach 16 h Wuchs und 3 h Expression $1,61 \pm 0,101$, was einer Standardabweichung von ca. 6,3 % entspricht.

Anschließend wurde die Homogenität der *LuHNL*-Expression innerhalb einer DW-MTP mittels SDS-PAGE kontrolliert. Zu diesem Zweck wurden von verschiedenen, willkürlich ausgewählten Kulturen einer DW-MTP Proben entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb 5.8). Wie in Abb. 5.8 gezeigt ist, wird die *LuHNL* in einer für die gerichtete Evolution ausreichenden Menge exprimiert und es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen bezüglich der Menge des exprimierten Proteins sichtbar.

Neben der Homogenität der Expression wurde auch die Homogenität der Aktivität im vorliegenden System gegenüber dem natürlichen Substrat Acetoncyanhydrin sowie dem Screening-Substrat Mandelonitril unter Nutzung von Zell-Suspensionen getestet (Tab. 5.4).

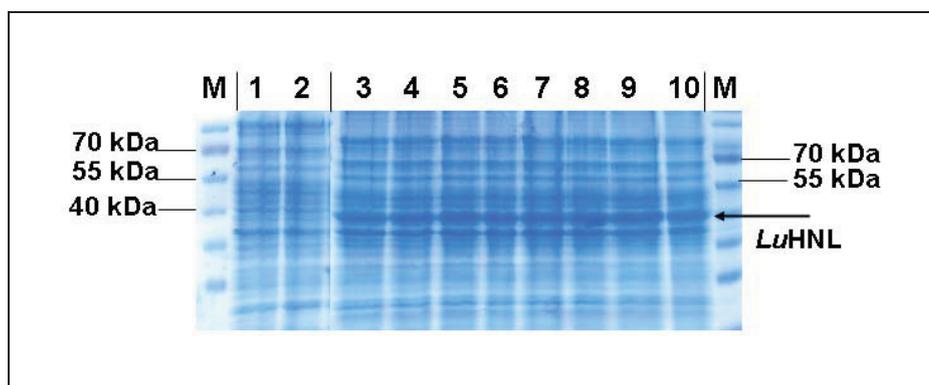


Abbildung 5.8: SDS-PAGE der DW-MTP-Expression der *LuHNL*. M: Marker (Fermentas PAGE-Ruler), Spur 1 und 2: *E. coli* BL21(DE3) mit Leervektor pET28a, Spur 3-12: *E. coli* BL21(DE3) mit Vektor pROx. Die *LuHNL* ist mit einem Pfeil markiert (ca. 40 kDa). Die den Leervektor pET28a enthaltenden Kulturen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert wie die *LuHNL*-exprimierenden Kulturen. Pro Spur wurde jeweils eine Zellmenge aufgetragen, die einer OD_{580} von 0,15 entspricht.

Tabelle 5.4: Analyse der Acetoncyanhydrin- und Mandelonitril-Spaltung in Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0 (Kontrolle), in Zell-Lysaten ohne HNL (pET28a) und in Zell-Lysaten mit exprimierter LuHNL (pROx). Alle Werte entsprechen den Mittelwerten von 16 Einzelmessungen und sind in mOD/min angegeben. Von den Zellsuspensionen wurden jeweils 10 μ l als Probe in den Cyanid-Assay (2.5.2) eingesetzt, wobei racemisches Mandelonitril oder Acetoncyanhydrin als Substrat diente. Die Reaktionszeit betrug 5 min.

	Kontrolle (Puffer)	BL21(DE3)-pET28a	BL21(DE3)-pROx
Δ OD ₆₀₀ (mOD/min) , Acetoncyanhydrin	26 \pm 6	31 \pm 10	326 \pm 143
Standardabweichung (in % relativ zum Mittelwert)	23	32	44
Δ OD ₆₀₀ (mOD/min), Mandelonitril	50 \pm 12	50 \pm 12	55 \pm 11
Standardabweichung (in % relativ zum Mittelwert)	24	24	22

Wie Tabelle 5.4 zeigt, hat zum einen die Anwesenheit von Zell-Suspensionen keinen Einfluss auf die Autohydrolyse der Substrate Acetoncyanhydrin oder Mandelonitril, zudem zeigte die Wildtyp-LuHNL gemäß den Erwartungen keine Aktivität gegenüber Mandelonitril. Die Aktivität gegenüber Acetoncyanhydrin war im Rahmen des Screeningsystems hinreichend homogen.

Da das Screeningsystem für die gerichtete Evolution der LuHNL dem der MeHNL (Kapitel 3.6.1.1) auch im Hinblick auf das Substrat Mandelonitril gleicht, wurde hier der bereits für die MeHNL festgelegte Mindestaktivitätswert (Kontrollwert + 30%, Kapitel 3.6.1.1) als Kriterium für einen Treffer beim Screening genutzt.

5.5.1.2 Erzeugung von Variantenbanken und Screening

Zur Optimierung des Substratspektrums der LuHNL wurden zwei Variantenbanken mit unterschiedlichen Mutationsraten durch Variation der MnCl₂-Konzentration bei der epPCR erstellt (Kapitel 2.3.5.3 unter Nutzung der Oligonukleotide LuHNL-up und LuHNL-down, Kapitel 2.1.5). Um eine hohe Mutationsfrequenz von durchschnittlich 8,3 Austauschen pro 1000 bp zu erzielen, wurde den Reaktionsansätzen MnCl₂ in einer Konzentration von 0,3 mM zugeetzt, eine niedrige Mutationsrate von 1,8 Austauschen pro 1000 bp wurde durch eine MnCl₂-Konzentration von 0,05 mM erzielt. Im Anschluss an die PCR wurden die DNA-Fragmente über die Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Bam*HI in den Vektor pET28a kloniert. Die Klonierungseffizienz der Variantenbanken wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft und lag in jedem Fall bei mindestens 80%.

Neben der Mutationsfrequenz und der Klonierungseffizienz wurde zudem stichprobenartig die Aktivität der Varianten gegenüber dem natürlichen Substrat Acetoncyanhydrin getestet. Im Falle der Variantenbank mit der hohen Mutationsrate (epLuHNL Bank I) zeigten noch ca. 42% der Klone eine restliche Aktivität, jedoch konnte nur in 5 % der Fälle eine dem Wildtyp vergleichbare Aktivität beobachtet werden. Bei der zweiten Bank zeigten 43 % der Klone Aktivität, diese lag in 85 % der Fälle nahe der Wildtyp-Aktivität. Dementsprechend wurden bei den folgenden Screenings vor allem Klone aus der zweiten Bank verwendet.

Insgesamt wurden ca. 1800 Klone aus der ersten und ca. 7300 Klone aus der zweiten Bank durchmustert, wobei jedoch kein Klon mit Aktivität gegenüber dem Substrat Mandelonitril gefunden werden konnte. Da eine Fortsetzung des Screenings zu diesem Zeitpunkt wenig aussichtsreich erschien und zudem die Kristallstruktur der LuHNL mittlerweile verfügbar wurde, wurde von einer weiteren Fortsetzung des Screenings abgesehen.

5.5.2 Erweiterung des Substratspektrums der LuHNL durch rationales Design

Da bislang nur ein auf *Docking*-Simulationen beruhendes Modell des katalytischen Mechanismus der LuHNL existierte (Kapitel 1.2.5, [57]), galt es zunächst, dieses Modell durch Herstellung von Mutanten der putativen katalytisch aktiven Reste zu validieren. Im Anschluss sollte dann die eigentliche Erweiterung des aktiven Zentrums auf der Basis der Kristallstruktur der LuHNL [57] durch rationales Design erfolgen.

5.5.2.1 Validierung des katalytischen Mechanismus

Auf der Basis von Docking-Experimenten wurde für die LuHNL ein Modell des katalytischen Mechanismus entwickelt, bei dem die Aminosäuren Threonin-65, Lysin-162 und Glutamat-323 als aktive Reste postuliert wurden (Kapitel 1.2.5, Abb. 5.9). Bis auf die Position des Threonin, die in den der LuHNL homologen ADHs entweder durch Threonin oder Serin besetzt ist, kommen diese Reste in ADHs nicht vor. Um die Richtigkeit des postulierten Katalysemechanismus zu überprüfen, wurden Varianten der LuHNL erzeugt, bei denen jeweils ein potentiell katalytisch aktiver Rest gegen eine korrespondierende Aminosäure der ADH-Konsensussequenz oder eine sterisch ähnliche, aber unfunktionale Aminosäure ausgetauscht wurde (Tab. 5.5).

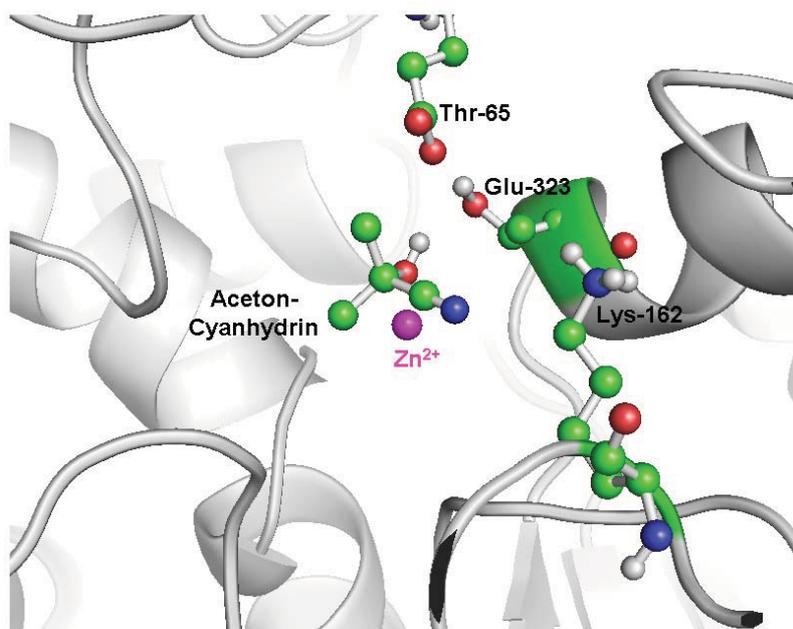


Abbildung 5.9: Das aktive Zentrum der LuHNL. Dargestellt sind die postulierten aktiven Reste Threonin-65, Lysin-162 und Glutamat-323 sowie das katalytisch aktive Zink-Ion. Im aktiven Zentrum befindet sich zudem das Substrat Acetoncyanhydrin [57].

Tabelle 5.5: Übersicht über die katalytisch aktiven Reste der LuHNL und die korrespondierenden Aminosäuren in ADHs [57].

Katalytisch aktive Aminosäurereste in der LuHNL	Korrespondierende Aminosäurereste in ADHs	Austausch
Threonin-65	Threonin oder Serin	Alanin
Lysin-162	Meistens Tyrosin oder Phenylalanin	Leucin
Glutamat-323	Valin	Valin

Da in der Konsensus-Sequenz der ADHs an der Position des Threonin-65 ebenfalls in der Regel ein nukleophiler Rest wie Threonin oder Serin vorhanden ist, wurde diese Aminosäure hier gegen Alanin ausgetauscht. Anstelle des Lysin-162 sind bei ADHs normalerweise große, aromatische Reste vorhanden, die jedoch bei einem Austausch eine Fehlfaltung der entsprechenden Variante verursachen könnten. Daher erfolgte ein Austausch des Lysins-162 hier gegen das sterisch ähnliche, aber unfunktionale Leucin. Im Falle des Glutamats-323 konnte das in ADHs vorhandene Valin entsprechend genutzt werden. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tab 5.6 dargestellt.

Tabelle 5.6: Aktivität der LuHNL-Varianten. Alle Aktivitäten sind in Relation zum Wildtyp-Enzym angegeben. Alle Varianten wurden mittels Quickchange-PCR auf der Basis des Plasmides pLuHNL erstellt, dem Wildtyp entsprechend in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und mittels IMAC aufgearbeitet. Die Überprüfung der Restaktivität erfolgte durch Cyanid-Nachweis, wobei als Substrat das natürliche Substrat der LuHNL, Acetoncyanhydrin, genutzt wurde.

Variante	T65A	K162L	E323V
Restaktivität (relativ zu Wt-LuHNL)	<2 %	<2 %	<2 %

Alle erzeugten Varianten zeigten eine starke Beeinträchtigung ihrer Aktivität, die in jedem Fall unterhalb von 2% der Wildtyp-Aktivität lag. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Richtigkeit des postulierten Modells des katalytischen Mechanismus der LuHNL.

5.5.2 Die Erweiterung des Substratspektrums der LuHNL

Auf der Basis dieser im vorgehenden Abschnitt beschriebenen Daten sowie anhand der Kristallstruktur der LuHNL wurde eine Enzymvariante geplant, die sterisch anspruchsvollere Substrate umzusetzen können sollte.

Um das aktive Zentrum des Enzyms entsprechend zu erweitern, wurde bereits von Horeis [57] postuliert, dass insgesamt drei verschiedene Aminosäuren auszutauschen seien.

Hierbei handelt es sich um Leucin-339, Phenylalanin-340 und Valin-348. Da das aktive Zentrum der LuHNL durch die Interaktion zweier Monomere gebildet wird (Kapitel 1.2.5), gehören jeweils Leucin-339 und Phenylalanin-340 zum einen Monomer und das Valin-348 zum jeweils anderen (Abb. 5.10). Auf der Basis dieser Voraussagen wurde eine Variante der LuHNL erzeugt, bei der alle drei genannten Aminosäuren jeweils gegen die sterisch wenig anspruchsvolle Aminosäure Alanin ausgetauscht wurden. Jedoch konnte bei dieser Variante auch in einer hohen Konzentrationen von 0,5 mg/ml weder Aktivität gegenüber dem natürlichen Substrat Acetoncyanhydrin noch gegenüber dem aromatischen Modell-Substrat Mandelonitril detektiert werden.

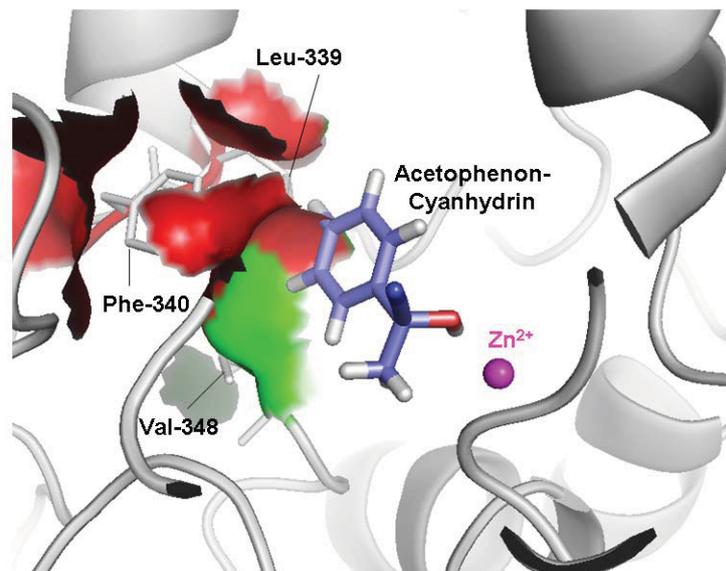


Abbildung 5.10: Aktives Zentrum der LuHNL. Die potentiell für die Substratspezifität relevanten Aminosäurereste Leu-339, Phe-340 und Val-348 sind hervorgehoben. Das aromatische Substrat Acetophenoncyanhydrin, das sich nur durch eine Methylgruppe vom Modellsubstrat Mandelonitril unterscheidet und ebenfalls von der LuHNL nicht umgesetzt wird, wurde in die bestehende Kristallstruktur der LuHNL hinein modelliert. Wie in der Abbildung ersichtlich ist, kollidiert das Substrat mit der Oberfläche der Aminosäuren 339, 340 und 348, die hier entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu einer Untereinheit entweder grün oder rot gekennzeichnet ist.

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte eine mehr oder weniger starke strukturelle Veränderung dieser LuHNL-Variante gegenüber dem Wildtyp-Enzym sein. Die in das Protein eingebrachten Aminosäureaustausche könnten zum einen eine Veränderung in der Anordnung der katalytisch aktiven Reste verursachen, was effektiv eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge hat. Andererseits könnten die eingebrachten Veränderungen auch eine globale strukturelle Veränderung, also eine Fehlfaltung des Enzyms, verursacht haben, die zum Aktivitätsverlust führt. Für eine solche Strukturänderung kann bereits ein einzelner Aminosäureaustausch ausreichend sein, wenn sich die betreffende Aminosäure an einer kritischen Position innerhalb des Proteins befindet [274]. Darüber hinaus kann durch die Veränderung der direkten Umgebung des in jeder Untereinheit der LuHNL befindlichen katalytischen Zinkions dessen Bindung an das Enzym beeinträchtigt worden sein. Jede Untereinheit der LuHNL enthält jeweils zwei Zink-Ionen sowie ein NAD^+ als Cofaktoren, von denen das eine Zink-Ion in den katalytischen Mechanismus eingebunden und somit absolut essenziell für die Funktion des Enzyms ist, während das andere wahrscheinlich eine strukturelle Funktion erfüllt.

Es kann davon ausgegangen werden, dass für die Änderung der Substratspezifität zusätzlich zu den bereits vorhergesagten Mutationen mehr als eine weitere Mutation in räumlicher Nachbarschaft notwendig ist. Dies erklärt auch, warum mittels gerichteter Evolution keine

Variante der *Lu*HNL mit erweitertem Substratspektrum erhalten werden konnte. Einerseits ist es bereits extrem unwahrscheinlich, dass sich mittels epPCR auch nur die drei Austausche an den Positionen 339, 340 und 348 bewerkstelligen lassen. Dies lässt sich durch eine Analyse mit dem Programm MAP (*mutagenesis assistant program*) [168] veranschaulichen, bei dem man die Wahrscheinlichkeit, mit der bestimmte Aminosäuren in einer Sequenz durch verschiedene Mutagenesemethoden, wie in diesem Fall die epPCR, gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden können, errechnen kann. Im Falle der Wildtyp-*Lu*HNL kann zwar das Valin-348 mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit gegen Alanin ausgetauscht werden, jedoch treten die Mutationen Leucin-339 → Alanin und Phenylalanin-340 → Alanin aufgrund der Redundanz des genetischen Codes nicht auf (Abb. 5.11). Erschwerend kommt hinzu, dass alle drei Aminosäuren in der Sequenz nah beieinander liegen.

Zusätzlich ist die Wahrscheinlichkeit, diese drei Austausche sowie die bislang unbekanntes weiteren Austausche mittels epPCR zu erreichen, ohne dabei wichtige andere Wechselwirkungen, wie die Zinkbindung, zu zerstören, äußerst gering.

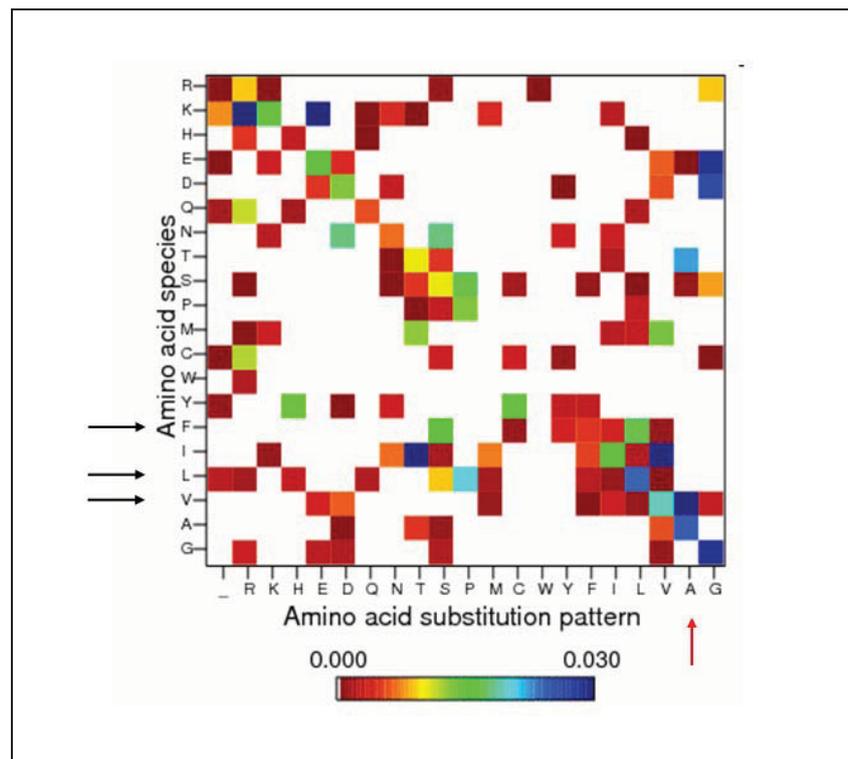


Abbildung 5.11: MAP-Analyse möglicher Austausche von Aminosäuren der Wt-*Lu*HNL-Sequenz durch epPCR. Auf der Y-Achse sind die in der Wt-Sequenz vorhandenen Aminosäuren aufgetragen, auf der X-Achse ist das Substitutionsmuster gezeigt. Der Farbbalken unter dem Diagramm gibt die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Aminosäure gegen eine andere ausgetauscht werden kann, an. Rot: niedrige Wahrscheinlichkeit, blau: hohe Wahrscheinlichkeit. Austausche, die nicht möglich sind, sind weiß gefärbt. Die drei auszutauschenden Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Valin sind jeweils mit einem schwarzen Pfeil markiert, die an den jeweiligen Positionen gewünschte Aminosäure Alanin mit einem roten Pfeil.

5.6 Die *LuHNL*: ein stabiles Enzym mit beschränktem Substratspektrum

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, inwieweit die *LuHNL* den Stabilitätsanforderungen eines technischen Prozesses genügt und wie aktiv das Enzym unter diesen Bedingungen wirklich ist; zusätzlich wurde sowohl durch gerichtete Evolution als auch durch rationales Design versucht, das auf aliphatische Substrate beschränkte Substratspektrum des Enzyms zu erweitern.

Hierfür wurde das kürzlich postulierte Modell des katalytischen Mechanismus verifiziert und auf der Basis der Kristallstruktur sowie des Modells des Katalysemechanismus versucht, eine Variante der *LuHNL* zu erzeugen, die auch das aromatische Substrat Mandelonitril umsetzen kann.

Ein Vorteil der *LuHNL* besteht darin, dass diese zumindest bei den hier getesteten Puffern keine signifikanten Aktivitätsunterschiede aufweist; eine Inhibition wie bei der *MeHNL* durch Acetat konnte hier nicht festgestellt werden (Kapitel 3.3 & 5.2).

Auch Stabilität und Aktivität bei pH 4,0 sind bei der *LuHNL* besser als bei der *AtHNL* (Kapitel 4.2.1 & 4.2.2), denn sie zeigt bei diesem pH immerhin ca. 20% ihrer maximalen Aktivität und ist in Citrat-Phosphat-Puffer ca. 1,3 Stunden stabil (Kapitel 5.3.1 & 5.3.2). Jedoch ist sie in diesem pH-Bereich nicht so aktiv und stabil wie die *MeHNL* (Kapitel 3.4.1 & 3.4.2).

Als problematischer könnte sich dagegen die verhältnismäßig hohe Aktivierungsenergie der *LuHNL* erweisen, die vermutlich eine niedrige Aktivität des Enzyms im Temperaturbereich zwischen 0°C und 10°C bedingt, auch wenn das Enzym bei diesen Temperaturen stabil gelagert werden kann (Kapitel 5.4.1 & 5.4.2).

Ein wesentlicher Nachteil dieses Enzyms ist jedoch die Tatsache, dass das Substratspektrum nicht nur auf aliphatische Substrate beschränkt ist, sondern offenbar auch nicht ohne größeren Aufwand in Richtung aromatischer Substrate erweitert werden kann, da die entsprechenden Punktmutationen hier eine komplette Inaktivierung der *LuHNL* zur Folge hatten. Somit ist das Enzym zwar bei niedrigen pH-Werten relativ aktiv und stabil, zeigt jedoch bei den für die Cyanhydrinproduktion notwendigen niedrigen Temperaturen wenig Aktivität und konnte zudem hinsichtlich seines im Bezug auf eigentliche Aromaten mit durchgehend konjugierten π -Bindungssystemen eingeschränkten Substratspektrums bislang nicht verbessert werden. Die durch Roberge *et al.* [73] gezeigte Akzeptanz von Substraten mit aromatischen Ringsystemen bei invertierter Enantioselektivität ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass durch die zwischen Carbonylfunktion und Ringsystem liegenden Methyl- oder Ethylgruppen eine Verlagerung des Ringsystems in den Substratkanal des Enzyms ermöglicht wird, wobei die jeweilige (*S*)-Konfiguration des Substrats bevorzugt umgesetzt wird [57].

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die HNLs aus *Manihot esculenta*, *Arabidopsis thaliana* und *Linum usitatissimum* im Hinblick auf einige für ihre biotechnologische Nutzung wichtige Aspekte charakterisiert. Eine Übersicht einiger wichtiger Charakteristika der drei untersuchten Enzyme ist in Tabelle 6.1 gegeben.

Auf einige Aspekte soll im Folgenden detaillierter eingegangen werden.

Tabelle 6.1: Übersicht über die technisch relevanten Charakteristika von MeHNL, AtHNL und LuHNL.
n.b.: nicht bestimmt.

	<i>MeHNL</i>	<i>AtHNL</i>	<i>LuHNL</i>
Expression in <i>E. coli</i>	Gut	Gut	Schlecht
Quartärstruktur	Tetramer	Dimer	Dimer
Pufferverträglichkeit	Inhibition durch Acetat	Keine Inhibition	Keine Inhibition
Aktivität bei pH 4 relativ zur maximalen Aktivität (%)	40	0	20
Stabilität bei pH 4 (Halbwertszeit (h))	2-14	0	1,33
Mechanismus der pH-abhängigen Inaktivierung	Partielle Entfaltung, gefolgt von Aggregation	Massiver Strukturverlust, begleitet von Aggregation	n.b.
Stabilisierung bei niedrigen pH-Werten	Zell-Lysate	Saccharose, Sorbitol	n.b.
Aktivität bei 0°- 10°C relativ zur maximalen Aktivität (%)	30	40	10
Aktivierungsenergie (kJ/mol)	24	15	107
Stabilität bei 37°C (Halbwertszeit (h))	64	6,6	15
Mechanismus der thermischen Inaktivierung	Massiver Strukturverlust, begleitet von Aggregation	Strukturverlust, begleitet von Aggregation	n.b.
Schmelztemperatur (°C)	69,3	57,0	n.b.
Substratspektrum	Aliphatische & aromatische Aldehyde und Ketone	Aliphatische & aromatische Aldehyde und Ketone	Aliphatische Aldehyde und Ketone, keine aromatischen Substrate mit konjugierten π -Bindungs-Systemen

Pufferverträglichkeit:

Alle drei HNLs wurden auf ihre Aktivität in verschiedenen Puffern untersucht. Im Gegensatz zu *At*HNL und *Lu*HNL, die in allen vier getesteten Puffern gute Aktivitätswerte zeigen, wird die *Me*HNL durch Acetatpuffer inhibiert. Erstaunlich ist in diesem Zusammenhang vor allem, dass sowohl *Me*HNL wie auch die ebenfalls zu den α/β -Hydrolase-HNLs zählende *Hb*HNL durch Acetat inhibiert werden, die strukturell verwandte *At*HNL jedoch nicht. Ursächlich hierfür ist vermutlich ein von *Me*HNL und *Hb*HNL abweichender Aufbau des aktiven Zentrums und, damit zusammenhängend, ein abweichender katalytischer Mechanismus, der auch für die invertierte Stereoselektivität der *At*HNL verantwortlich ist.

Aktivität & Stabilität im sauren pH-Bereich:

Da viele Hydrocyanierungsreaktionen vor allem im technischen Maßstab in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen durchgeführt werden, ist die Aktivität und Stabilität einer HNL bei niedrigen pH-Werten ein wichtiger Aspekt für deren Nutzbarkeit. Die drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten HNLs unterscheiden sich im Bezug auf diese Charakteristika deutlich voneinander.

Die *Me*HNL ist sowohl im Hinblick auf ihre Aktivität als auch auf ihre Stabilität im Sauren die von den drei Enzymen am besten für industrielle Prozesse geeignete. Auch die *Lu*HNL zeigt eine verhältnismäßig gute Aktivität und Stabilität im Bereich von pH 4, auch wenn sie dort nicht so stabil und aktiv ist wie die *Me*HNL. Für die *At*HNL hingegen erwies sich ein niedriger pH-Wert aufgrund ihrer niedrigen pH-Stabilität und der damit einhergehenden geringen Aktivität im Sauren als äußerst nachteilig, so dass dieses Enzym in seiner derzeitigen Form nicht unterhalb von pH 5,4 genutzt werden kann.

Im Falle der *Me*HNL und *At*HNL konnten zudem Möglichkeiten zur pH-Stabilisierung aufgezeigt werden. Eine Stabilisierung der *Me*HNL konnte vor allem durch ihre Nutzung in Form von Zell-Lysaten erfolgen, was vermutlich auf einen „*Molecular Crowding*“-Effekt zurückzuführen ist. Diese im Vergleich zum gereinigten Enzym stark erhöhte pH-Stabilität der *Me*HNL in Zell-Lysaten ist zudem auch ursächlich dafür, dass ein Hochdurchsatzscreening auf verbesserte pH-Stabilität zumindest im sauren pH-Bereich nicht möglich ist.

Die *At*HNL konnte durch den Zusatz von Saccharose oder Sorbitol bei moderat sauren pH-Werten erheblich stabilisiert werden.

Im Falle von *Me*HNL und *At*HNL gelang es zudem, durch den Einsatz verschiedener spektroskopischer Methoden ein detailliertes Bild der jeweiligen pH-abhängigen Inaktivierungspro-

zesse zu bekommen. Bei einer Verringerung des pH-Wertes der Umgebung reagiert die *MeHNL* mit einer schnellen, aber nur partiellen Entfaltung α -helikaler Strukturen, der eine weitere, ebenfalls nur partiell verlaufende Entfaltung des Enzyms folgt. Mit einer zeitlichen Verzögerung von zwei Stunden kommt es außerdem zu einer Aggregation des Enzyms.

Anders reagiert die *AtHNL* auf eine Verringerung des pH-Wertes: hier konnte eine kontinuierlich verlaufende Entfaltung α -helikaler Strukturen beobachtet werden, die mit einer schnell verlaufenden Aggregation des Proteins einhergeht.

Anders als bei den beiden anderen Enzymen ging die pH-Inaktivierung der *LuHNL* nicht mit einem Aggregationsprozess einher; eine detaillierte Analyse des pH-abhängigen Inaktivierungsprozesses muss jedoch noch erfolgen.

Abhängigkeit der Aktivität & Stabilität von der Temperatur:

Neben einem niedrigen pH-Wert sind Temperaturen unterhalb von 10°C ein weiteres Kennzeichen technischer Hydrocyanierungsprozesse. In diesem Temperaturbereich ist von den drei untersuchten HNLs die *AtHNL* das Enzym mit der höchsten Aktivität, gefolgt von der *MeHNL*. Aufgrund ihrer hohen Aktivierungsenergie ist die Aktivität der *LuHNL* in diesem Bereich eher niedrig.

Obwohl auch niedrige Temperaturen zur Inaktivierung eines Enzyms beitragen können, sind alle drei getesteten HNLs im Bereich zwischen 0°C und 10°C über mehrere Tage stabil. Unterschiede hinsichtlich der Thermostabilität treten erst bei höheren Temperaturen (>30°C) auf, wobei sich die *MeHNL* auch hier als stabilste der drei HNLs erwies.

Substratspektrum:

Während *MeHNL* und *AtHNL* bezüglich ihres Substratspektrums sehr vielseitige Enzyme sind, die eine große Bandbreite aliphatischer und aromatischer Aldehyde und Ketone umzusetzen vermögen, ist die *LuHNL* vor allem auf aliphatische Substrate beschränkt.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es jedoch weder durch gerichtete Evolution noch durch rationales Design, das Substratspektrum der *LuHNL* in Richtung des aromatischen Substrats Mandelonitril zu erweitern. Eine weitere Möglichkeit, dieses Ziel zu erreichen, könnte in der Nutzung eines semi-rationalen Ansatzes wie dem CASTing bestehen, wobei auf der Basis der dreidimensionalen Struktur eines Enzyms kleine Mutantenbanken im Bereich von Aminosäureresten nahe beim aktiven Zentrum erstellt und gescreent werden [176, 177].

7. Summary

In this work the HNLs from *Manihot esculenta*, *Arabidopsis thaliana* and *Linum usitatissimum* were characterized with respect to several biotechnological relevant aspects.

An overview over some important characteristics of the three enzymes is given in Table 7.1.

Some of these aspects are addressed in a more detailed way in the following.

Table 7.1: Overview over the technical relevant aspects of *Me*HNL, *At*HNL and *Lu*HNL. n.d.: not determined.

	<i>Me</i> HNL	<i>At</i> HNL	<i>Lu</i> HNL
Overexpression in <i>E. coli</i>	Good	Good	Bad
Quarternary Structure	Tetramer	Dimer	Dimer
Buffer tolerance	Inhibition by acetate	No inhibition	No inhibition
Activity at pH 4 relative to maximal activity (%)	40	0	20
Stability at pH 4 (Halflifetime (h))	2-14	0	1,33
Mechanism of the pH-dependent inactivation	Partial unfolding, followed by aggregation	Massive loss of structure, paralleled by aggregation	n.d.
Stabilization at low pH-values	Crude cell extracts	Saccharose, Sorbitol	n.d.
Activity at 0°- 10°C relative to maximal activity (%)	30	40	10
Activation energy (kJ/mol)	24	15	107
Stability at 37°C (Halflifetime (h))	64	6,6	15
Mechanism of thermal inactivation	Massive loss of structure, paralleled by aggregation	Loss of structure, paralleled by aggregation	n.d.
Melting temperature (°C)	69,3	57,0	n.d.
Substratespectrum	Aliphatic & aromatic aldehydes und ketones	Aliphatic & aromatic aldehydes und ketones	Aliphatic aldehydes and ketones; no aromatic substrates with conjugated π -binding-systems

Buffer Tolerance:

All three HNLs were examined with respect to their activity in different buffers. Unlike the *At*HNL and the *Lu*HNL, both showing good activity in all tested buffers, *Me*HNL is inhibited by acetate. Even more astonishing is the fact that *Me*HNL and *Hb*HNL, both belonging to the structural group of α/β -hydrolase-HNLs, show inhibition upon contact to acetate, whereas the structural related *At*HNL is not inhibited. These differences are presumably caused by a different active site architecture which results in a diverging catalytic mechanism, being also responsible for the inverted enantioselectivity of the *At*HNL.

Activity & Stability at low pH-values

Since most hydrocyanation reactions in technical scale are usually carried out in aqueous-organic two-phase systems, the activity and stability of any given HNL at low pH-values is an important aspect for its usability.

All three tested HNLs differ concerning their pH-dependent activity and stability profiles.

From the three HNLs, the *Me*HNL is the one being best suited for technical use, regarding both activity and stability in the acidic pH-range. Stability and activity of the *Lu*HNL are slightly worse as for the *Me*HNL. On the contrary, the *At*HNL is much less stable at low pH-values, which also affects the enzyme's activity in this range. In its actual form this enzyme can not be used at pH-values lying beneath pH 5.4.

It was possible to stabilize both the *Me*HNL and the *At*HNL at low pH-values. The *Me*HNL could be stabilized by using the enzyme in crude cell extracts. In this case the stabilization is possibly due to a molecular crowding effect. This molecular crowding effect is also the reason that the highthroughput-screening experiments towards an improved pH-stability of the *Me*HNL failed.

The *At*HNL can be stabilized toward moderate acidic pH-values by adding the compatible solutes saccharose or sorbitol.

For both enzymes the pH-dependent inactivation processes were studied in detail using a variety of spectroscopic methods.

The *Me*HNL's reaction upon a reduction of the pH-value is a fast but only partial unfolding of the α -helical structure followed by a further partial unfolding process. With a time delay of two hours this unfolding process leads to an aggregation of the enzyme.

In contrary, the *At*HNL shows a massive loss of secondary structure when incubated at pH 5.4, which is paralleled by a fast aggregation of the protein.

Unlike the two other HNLs, the *Lu*HNL does not show any aggregation during the inactivation process; yet a detailed analysis of the inactivation process still has to be performed.

Temperature Dependency of the Activity and the Stability

In addition to a low pH-value, technical hydrocyanation processes are characterized by temperatures below 10°C. In this temperature range the *At*HNL shows the best activity of the three tested HNLs, followed by the *Me*HNL. Due to its high activation energy the *Lu*HNL's activity is quite low in this temperature range.

Despite the fact that also low temperatures can cause an enzyme inactivation, all of the tested HNLs are stable for several days between 0°C and 10°C. Differences of the thermal stability occur from 30°C upwards, whereas the *Me*HNL is the most stable enzyme at elevated temperatures among the three.

Substrate spectrum

While *Me*HNL and *At*HNL are versatile enzymes accepting broad spectra of aliphatic and aromatic aldehydes and ketones, the *Lu*HNL is primarily restricted to aliphatic substrates.

This narrow substrate range could not be broadened towards the acceptance of the aromatic substrate mandelonitrile, neither using directed evolution nor rational design.

It could be possible to reach this goal by a semi-rational approach like CASTing, where on the basis of the three-dimensional structure of an enzyme small libraries are created focussing on a few amino acid residues at the active site [176, 177].

8. Literatur

1. Ulber R, Soyoz K: **5000 Jahre Biotechnologie**. *Chemie Unserer Zeit* 2004, **38**:172-180.
2. Pasteur L: **Memoire sur la fermentation de l'acide tartarique**. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris)* 1858, **46**:615-618.
3. Buchner E: **Alkoholische Gärung ohne Hefezellen**. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 1897, **30**:117-124.
4. Hubbuch J, Kula MR: **Isolation and purification of biotechnological products**. *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics* 2007, **32**(2):99-127.
5. Stürmer R, Breuer M: **Chemie und Biologie Hand in Hand**. *Chemie Unserer Zeit* 2006, **40**:104-111.
6. Baneyx F: **Recombinant protein expression in Escherichia coli**. *Current Opinion in Biotechnology* 1999, **10**(5):411-421.
7. Bommarius AS, Riebel BR: **Biocatalysis**, vol. 1. Weinheim: Wiley-VCH; 2004.
8. Sheldon RA: **Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art**. *Green Chemistry* 2005, **7**(5):267-278.
9. Klibanov AM: **Improving enzymes by using them in organic solvents**. *Nature* 2001, **409**(6817):241-246.
10. Yang Z, Pan WB: **Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis**. *Enzyme and Microbial Technology* 2005, **37**(1):19-28.
11. Yazbeck DR, Martinez CA, Hu SH, Tao JH: **Challenges in the development of an efficient enzymatic process in the pharmaceutical industry**. *Tetrahedron-Asymmetry* 2004, **15**(18):2757-2763.
12. Purkarthofer T, Skranc W, Schuster C, Griengl H: **Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007, **76**(2):309-320.
13. Sharma M, Sharma NN, Bhalla TC: **Hydroxynitrile lyases: At the interface of biology and chemistry**. *Enzyme and Microbial Technology* 2005, **37**(3):279-294.
14. Conn EE: **Cyanogenic Compounds**. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1980, **31**:433-451.
15. Knowles CJ, Bunch AW: **Microbial cyanide metabolism**. *Advances in Microbial Physiology* 1986, **27**:73-111.
16. Zagrobelny M, Bak S, Moller BL: **Cyanogenesis in plants and arthropods**. *Phytochemistry* 2008, **69**(7):1457-1468.
17. Hickel A, Hasslacher M, Griengl H: **Hydroxynitrile lyases: Functions and properties**. *Physiologia Plantarum* 1996, **98**(4):891-898.
18. Nahrstedt A: **Cyanogenic Compounds as Protecting Agents for Organisms**. *Plant Systematics and Evolution* 1985, **150**(1-2):35-47.
19. Poulton JE: **Cyanogenesis in Plants**. *Plant Physiology* 1990, **94**(2):401-405.
20. Kakes P: **Properties and Functions of the Cyanogenic System in Higher Plants**. *Euphytica* 1990, **48**(1):25-43.
21. Conn EE: **Cyanogenic Glycosides**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1969, **17**(3):519-526.
22. Way JL: **Cyanide Intoxication and Its Mechanism of and Its Mechanism of Antagonism**. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1984, **24**:451-481.
23. Jorgensen K, Bak S, Busk PK, Sorensen C, Olsen CE, Puonti-Kaerlas J, Moller BL: **Cassava plants with a depleted cyanogenic glucoside content in leaves and tubers. Distribution of cyanogenic glucosides, their site of synthesis and transport, and**

- blockage of the biosynthesis by RNA interference technology. *Plant Physiology* 2005, **139**(1):363-374.**
24. Andersen MD, Busk PK, Svendsen I, Moller BL: **Cytochromes P-450 from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin - Cloning, functional expression in *Pichia pastoris*, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes.** *Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**(3):1966-1975.
 25. Siritunga D, Sayre R: **Engineering cyanogen synthesis and turnover in cassava (*Manihot esculenta*).** *Plant Molecular Biology* 2004, **56**:661-669.
 26. Bak S, Olsen CE, Halkier BA, Moller BL: **Transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants expressing the two multifunctional *Sorghum* cytochrome P450 enzymes, CYP79A1 and CYP71E1, are cyanogenic and accumulate metabolites derived from intermediates in dhurrin biosynthesis.** *Plant Physiology* 2000, **123**(4):1437-1448.
 27. Bokanga M, Halkier B, Moller B: **Studies on the biosynthesis of cyanogenic glycosides in cassava.** In: *Proceedings of the first international scientific meeting of the Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Columbia, 25-28 August 1992.* Edited by Roca WM, Thro AM; 1993.
 28. McMahon JM, White WLB, Sayre RT: **Cyanogenesis in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz).** *Journal of Experimental Botany* 1995, **46**(288):731-741.
 29. White WLB, McMahon JM, Sayre RT: **Regulation of cyanogenesis in cassava.** *Acta Horticulturae* 1994, **375**:69-78.
 30. Mkpogon OE, Yan H, Chism G, Sayre RT: **Purification, Characterization, and Localization of Linamarase in Cassava.** *Plant Physiology* 1990, **93**(1):176-181.
 31. Cholod MS: **Cyanohydrins.** In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.* Edited by Company RaH, vol. 7: John Wiley & Sons Inc.; 1993: 821-834.
 32. Nambisan B, Sundaresan S: **Distribution of Linamarin and Its Metabolizing Enzymes in Cassava Tissues.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1994, **66**(4):503-507.
 33. Elias M, Nambisan B, Sudhakaran PR: **Catabolism of linamarin in cassava (*Manihot esculenta* Crantz).** *Plant Science* 1997, **126**(2):155-162.
 34. Andexer J, von Langermann J, Mell A, Bocola M, Kragl U, Eggert T, Pohl M: **An R-selective Hydroxynitrile Lyase from *Arabidopsis thaliana* with an α/β -Hydrolase Fold.** *Angewandte Chemie International Edition* 2007, **46**(45):8679 - 8681.
 35. Glieder A, Weis R, Skranc W, Poechlauer P, Dreveny I, Majer S, Wubbolts M, Schwab H, Gruber K: **Comprehensive step-by-step engineering of an (R)-hydroxynitrile lyase for large-scale asymmetric synthesis.** *Angewandte Chemie-International Edition* 2003, **42**(39):4815-4818.
 36. Dreveny I, Gruber K, Glieder A, Thompson A, Kratky C: **The hydroxynitrile lyase from almond: A lyase that looks like an oxidoreductase.** *Structure* 2001, **9**(9):803-815.
 37. Lauble H, Miehllich B, Forster S, Wajant H, Effenberger F: **Crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor* in complex with the inhibitor benzoic acid: A novel cyanogenic enzyme.** *Biochemistry* 2002, **41**(40):12043-12050.
 38. Wajant H, Mundry KW: **Hydroxynitrile Lyase from *Sorghum bicolor* - a Glycoprotein Heterotetramer.** *Plant Science* 1993, **89**(2):127-133.
 39. Wagner UG, Hasslacher M, Griengl H, Schwab H, Kratky C: **Mechanism of cyanogenesis: The crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*.** *Structure* 1996, **4**(7):811-822.

40. Gartler G, Kratky C, Gruber K: **Structural determinants of the enantioselectivity of the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis***. *Journal of Biotechnology* 2007, **129**(1):87-97.
41. Solis A, Luna C, Perez HI, Manjarrez N: **Evaluation of guanabana (*Annona muricata*) seed meal as a source of (S)-oxynitrilase**. *Tetrahedron-Asymmetry* 2003, **14**(16):2351-2353.
42. Wajant H, Effenberger F: **Hydroxynitrile lyases of higher plants**. *Biological Chemistry* 1996, **377**(10):611-617.
43. Hickel A: **Screening, kinetic and stabilization of the enzyme hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis***. 1996.
44. Pohl M, Breithaupt H, Fröhlich B, Heim P, Iding H, Juchem P, Siegert P, Kula MR: **Enzymes for carboligation - 2-ketoacid decarboxylases and hydroxynitrile lyases**. In: *Asymmetric Synthesis with Chemical and Biological Methods*. Edited by Enders D, Jaeger KE: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2007: 327-340.
45. Xu LL, Singh BK, Conn EE: **Purification and Characterization of Mandelonitrile Lyase from *Prunus lyonii***. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1986, **250**(2):322-328.
46. Gerstner E, Matzke V, Pfeil E: **On the chemical and biological systematics of rosaceae. Study of the flavin system D-oxynitrilase**. *Naturwissenschaften* 1968, **55**(12):561-563.
47. Gerstner E, Pfeil E: **Flavoenzyme Hydroxynitril Lyase (D-Oxynitrilase)**. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 1972, **353**(3):271-273.
48. Kiess M, Hecht HJ, Kalisz HM: **Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense* - Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases**. *European Journal of Biochemistry* 1998, **252**(1):90-99.
49. Jorns MS: **Mechanism of Catalysis by the Flavoenzyme Oxynitrilase**. *Journal of Biological Chemistry* 1979, **254**(23):2145-2152.
50. Barwald KR, Jaenicke L: **D-Hydroxynitrile Lyase - Involvement of Prosthetic Flavin Adenine-Dinucleotide in Enzyme-Activity**. *Febs Letters* 1978, **90**(2):255-260.
51. Cheng IP, Poulton JE: **Cloning of cDNA of *Prunus-Serotina* (R)-(+)-Mandelonitrile Lyase and Identification of a Putative Fad-Binding Site**. *Plant and Cell Physiology* 1993, **34**(7):1139-1143.
52. Becker W, Eschenhof E, Pfeil E, Benthin U: **Zur Kenntnis der Cyanhydrinsynthese. II. Reindarstellung und Eigenschaften der Oxynitrilase aus Bitteren Mandeln (*Prunus communis* Stokes)**. *Biochemische Zeitschrift* 1963, **337**(2):156-159.
53. Dreveny I, Kratky C, Gruber K: **The active site of hydroxynitrile lyase from *Prunus amygdalus*: Modeling studies provide new insights into the mechanism of cyanogenesis**. *Protein Science* 2002, **11**(2):292-300.
54. Ueatrongchit T, Kayo A, Komeda H, Asano Y, H-Kittikun A: **Purification and characterization of a novel (R)-hydroxynitrile lyase from *Eriobotrya japonica* (loquat)**. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2008, **72**(6):1513-1522.
55. Yemm RS, Poulton JE: **Isolation and Characterization of Multiple Forms of Mandelonitrile Lyase from Mature Black-Cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) Seeds**. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1986, **247**(2):440-445.
56. Andexer J: **Die erste R-selektive Hydroxynitril-Lyase mit α/β -Hydrolasefaltung**. Jülich: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2007.
57. Horeis G: **The hydroxynitrile lyase from flax**. Graz: Karl-Franzens-Universität 2007.
58. Lauble H, Forster S, Miehlisch B, Wajant H, Effenberger F: **Structure of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in complex with substrates acetone and chloroacetone: implications for the mechanism of cyanogenesis**. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 2001, **57**:194-200.

59. Lauble H, Miehllich B, Forster S, Wajant H, Effenberger F: **Mechanistic aspects of cyanogenesis from active-site mutant Ser80Ala of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in complex with acetone cyanohydrin.** *Protein Science* 2001, **10**(5):1015-1022.
60. Carvalho JPCC: **Studies on the aliphatic ketone cyanohydrin hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* Crantz.** University of California; 1981.
61. Siritunga D, Arias-Garzon D, W. W, Sayre RT: **Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification.** *Plant Biotechnology Journal* 2004, **2**:37 - 42.
62. Hughes J, Carvalho JPC, Hughes MA: **Purification, Characterization, and Cloning of Alpha-Hydroxynitrile Lyase from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz).** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1994, **311**(2):496-502.
63. Chueskul S, Chulavatnatol M: **Properties of alpha-hydroxynitrile lyase from the petiole of cassava (*Manihot esculenta* Crantz).** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1996, **334**(2):401-405.
64. Wajant H, Foerster S, Boettinger H, Effenberger F, Pfizenmaier K: **Acetone cyanohydrin lyase from *Manihot esculenta* (cassava) is serologically distinct from other hydroxynitrile lyases.** *Plant Science* 1995, **108**:1 -11.
65. Guterl JK, Andexer J, Sehl T, von Langermann J, Frindi-Wosch I, Rosenkranz T, Fitter J, Gruber K, Kragl U, Eggert T *et al*: **Uneven twins: comparison of two hydroxynitrile lyases with α/β -hydrolase fold.** *Submitted for publication* 2008.
66. Gruber K, Gartler G, Krammer B, Schwab H, Kratky C: **Reaction mechanism of hydroxynitrile lyases of the alpha/beta-hydrolase superfamily - The three-dimensional structure of the transient enzyme-substrate complex certifies the crucial role of LYS236.** *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(19):20501-20510.
67. Forster S, Roos J, Effenberger F, Wajant H, Sprauer A: **The first recombinant hydroxynitrile lyase and its application in the synthesis of (S)-cyanohydrins.** *Angewandte Chemie-International Edition in English* 1996, **35**(4):437-439.
68. Buhler H, Effenberger F, Forster S, Roos J, Wajant H: **Substrate specificity of mutants of the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta*.** *ChemBiochem* 2003, **4**(2-3):211-216.
69. Lauble H, Miehllich B, Foerster S, Kobler C, Wajant H, Effenberger F: **Structure determinants of substrate specificity of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta*.** *Protein Science* 2002, **11**:65 - 71.
70. Breithaupt H, Pohl M, Bonigk W, Heim P, Schimz KL, Kula MR: **Cloning and expression of (R)-hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum* (flax).** *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 1999, **6**(3):315-332.
71. Trummler K, Roos J, Schwaneberg U, Effenberger F, Forster S, Pfizenmaier K, Wajant H: **Expression of the Zn²⁺-containing hydroxynitrile lyase from flax (*Linum usitatissimum*) in *Pichia pastoris* - utilization of the recombinant enzyme for enzymatic analysis and site-directed mutagenesis.** *Plant Science* 1998, **139**(1):19-27.
72. Albrecht J, Jansen I, Kula MR: **Improved Purification of an (R)-Oxynitrilase from *Linum usitatissimum* (Flax) and Investigation of the Substrate Range.** *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1993, **17**:191-203.
73. Roberge C, Fleitz F, Pollard D, Devine P: **Synthesis of optically active cyanohydrins from aromatic ketones: evidence of an increased substrate range and inverted stereoselectivity for the hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum*.** *Tetrahedron-Asymmetry* 2007, **18**(2):208-214.
74. Wöhler F, Liebig J: **Über die Bildung des Bittermandelöls.** *Annalen der Pharmacie* 1837, **22**:1-24.

75. Rosenthaler L: **Enzyme effected asymmetrical synthesis.** *Biochemische Zeitschrift* 1908, **14**:238-253.
76. Kriebel VK, Wieland WA: **The properties of oxynitrilase.** *Journal of the American Chemical Society* 1921, **43**:164-175.
77. Albers H, Hamann K: **The synthetic effect of emulsion - Note I on information regarding oxynitrilase of emulsion.** *Biochemische Zeitschrift* 1932, **255**:44-65.
78. Albers H, Hamann K: **The kinetics of the synthesis of mandelic acid nitrile accelerated by (+) emulsin - II announcement on the information of the oxynitrilase of the emulsin.** *Biochemische Zeitschrift* 1934, **269**:14-25.
79. Becker W, Pfeil E: **Über Das Flavinenzym D-Oxynitrilase.** *Biochemische Zeitschrift* 1966, **346**(4):301-&.
80. Kragl U, Niedermeyer U, Kula MR, Wandrey C: **Engineering Aspects of Enzyme Engineering - Continuous Asymmetric C-C Bond Formation in an Enzyme-Membrane-Reactor.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1990, **613**:167-175.
81. Niedermeyer U, Kula MR: **Enzyme-Catalyzed Synthesis of (S)-Cyanohydrins.** *Angewandte Chemie-International Edition in English* 1990, **29**(4):386-387.
82. Chen FX, Feng XM: **Asymmetric synthesis of cyanohydrins.** *Current Organic Synthesis* 2006, **3**(1):77-97.
83. Poechlauer P, Skranc W, Wubbolts M: **The large-scale biocatalytic synthesis of enantiopure cyanohydrins.** In: *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions.* Edited by Blaser HU, Schmidt E: Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2004: 327-340.
84. Daussmann T, Rosen TC, Dunkelmann P: **Oxidoreductases and hydroxynitrilase lyases: Complementary enzymatic technologies for chiral alcohols.** *Engineering in Life Sciences* 2006, **6**(2):125-129.
85. Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bona R, Rumbold K, Luckl J, Griengl H, Kohlwein SD, Schwab H: **High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts.** *Protein Expression and Purification* 1997, **11**(1):61-71.
86. Von Langermann J: **Medium-Engineering für enzymatische Reaktionen am Beispiel von Hydroxynitril-Lyasen und Alkohol-Dehydrogenasen.** Universität Rostock; 2008.
87. Heim P: **Die Hydroxynitril-Lyasen aus *Linum usitatissimum* und *Sorghum bicolor* - Untersuchungen zur rekombinanten Expression und phylogenetischen Verwandtschaft.** Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2002.
88. Purkarthofer T, Skranc W, Schuster C, Griengl H: **Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007, **76**(2):309-320.
89. Schmidt M, Griengl H: **Oxynitrilases: From cyanogenesis to asymmetric synthesis.** *Biocatalysis - from Discovery to Application* 1999, **200**:193-226.
90. Kobayashi Y, Takemoto Y, Ito Y, Terashima S: **A Novel Synthesis of the (2r,3s)-3-Amino-2-Hydroxycarboxylic and (2s,3r)-3-Amino-2-Hydroxycarboxylic Acid-Derivatives, the Key Components of a Renin Inhibitor and Bestatin, from Methyl (R)-Mandelate and (S)-Mandelate.** *Tetrahedron Letters* 1990, **31**(21):3031-3034.
91. Hayashi M, Yoshiga T, Nakatani K, Ono K, Oguni N: **Reduction of Alpha-Trialkylsiloxy Nitriles with Diisobutylaluminium Hydride (Dibah) - a Facile Preparation of Alpha-Trialkylsiloxy Aldehydes and Their Derivatives.** *Tetrahedron* 1994, **50**(9):2821-2830.
92. Willeman WF, Hanefeld U, Straathof AJJ, Heijnen JJ: **Estimation of kinetic parameters by progress curve analysis for the synthesis of (R)-mandelonitrile by *Prunus***

- amygdalus hydroxynitrile lyase.** *Enzyme and Microbial Technology* 2000, **27**(6):423-433.
93. Effenberger F, Ziegler T, Forster S: **Enzyme-Catalyzed Cyanohydrin Synthesis in Organic-Solvents.** *Angewandte Chemie-International Edition in English* 1987, **26**(5):458-460.
94. Ziegler T, Horsch B, Effenberger F: **A Convenient Route to (R)-Alpha-Hydroxy Carboxylic-Acids and (2r)-1-Amino-2-Alkanols from (R)-Cyanohydrins.** *Synthesis-Stuttgart* 1990(7):575-578.
95. Effenberger F: **Synthesis and Reactions of Optically-Active Cyanohydrins.** *Angewandte Chemie-International Edition in English* 1994, **33**(15-16):1555-1564.
96. Costes D, Wehtje E, Adlercreutz P: **Cross-linked crystals of hydroxynitrile lyase as catalyst for the synthesis of optically active cyanohydrins.** *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 2001, **11**(4-6):607-612.
97. Chmura A, van der Kraan GM, Kielar F, van Langen LM, van Rantwijk F, Sheldon RA: **Cross-linked aggregates of the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta*: Highly active and robust biocatalysts.** *Advanced Synthesis & Catalysis* 2006, **348**(12-13):1655-1661.
98. Veum L, Hanefeld U, Pierre A: **The first encapsulation of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* in a sol-gel matrix.** *Tetrahedron* 2004, **60**(46):10419-10425.
99. Wehtje E, Adlercreutz P, Mattiasson B: **Formation of C-C Bonds by Mandelonitrile Lyase in Organic-Solvents.** *Biotechnology and Bioengineering* 1990, **36**(1):39-46.
100. Gerrits PJ, Willeman WF, Straathof AJJ, Heijnen JJ, Brussee J, van der Gen A: **Mass transfer limitation as a tool to enhance the enantiomeric excess in the enzymatic synthesis of chiral cyanohydrins.** *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 2001, **15**(4-6):111-121.
101. Poechlauer P: **Synthesis of homochiral cyanohydrins in an industrial environment: hydroxynitrile lyases offer new options.** *Chimica Oggi - Chemistry Today* 1998, **16**:15-19.
102. Duy C, Fitter J: **How aggregation and conformational scrambling of unfolded states govern fluorescence emission spectra.** *Biophysical Journal* 2006, **90**(10):3704-3711.
103. Vieille C, Zeikus GJ: **Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2001, **65**(1):1-43.
104. Konermann L: **Protein unfolding and denaturants.** In: *Encyclopedia of life sciences.* John Wiley & Sons; 2004.
105. Jaenicke R: **Stability and stabilization of globular proteins in solution.** *Journal of Biotechnology* 2000, **79**(3):193-203.
106. Volkin DB, Klibanov AM: **Minimizing protein inactivation.** In: *Protein function: a practical approach.* Edited by Creighton TE. Oxford: IRL Press; 1989: 1-24.
107. Polizzi KM, Bommarius AS, Broering JM, Chaparro-Riggers JF: **Stability of biocatalysts.** *Current Opinion in Chemical Biology* 2007, **11**(2):220-225.
108. Eijsink VGH, Gaseidnes S, Borchert TV, van den Burg B: **Directed evolution of enzyme stability.** *Biomolecular Engineering* 2005, **22**(1-3):21-30.
109. Kelch BA, Eagen KP, Erciyas FP, Humphris EL, Thomason AR, Mitsuiki S, Agard DA: **Structural and mechanistic exploration of acid resistance: Kinetic stability facilitates evolution of extremophilic behavior.** *Journal of Molecular Biology* 2007, **368**(3):870-883.
110. Jaswal SS, Sohl JL, Davis JH, Agard DA: **Energetic landscape of alpha-lytic protease optimizes longevity through kinetic stability.** *Nature* 2002, **415**(6869):343-346.

111. Truhlar SME, Cunningham EL, Agard DA: **The folding landscape of *Streptomyces griseus* protease B reveals the energetic costs and benefits associated with evolving kinetic stability.** *Protein Science* 2004, **13**(2):381-390.
112. Cunningham EL, Jaswal SS, Sohl JL, Agard DA: **Kinetic stability as a mechanism for protease longevity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(20):11008-11014.
113. Eijsink VGH, Bjork A, Gaseidnes S, Sirevag R, Synstad B, van den Burg B, Vriend G: **Rational engineering of enzyme stability.** *Journal of Biotechnology* 2004, **113**(1-3):105-120.
114. Hardy F, Vriend G, Veltman OR, Vandervinne B, Venema G, Eijsink VGH: **Stabilization of *Bacillus stearothermophilus* Neutral Protease by Introduction of Prolines.** *Febs Letters* 1993, **317**(1-2):89-92.
115. Mansfeld J, Vriend G, Dijkstra BW, Veltman OR, Van den Burg B, Venema G, Ulbrich-Hofmann R, Eijsink VGH: **Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond.** *Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**(17):11152-11156.
116. Mozhaev VV: **Mechanism-Based Strategies for Protein Thermostabilization.** *Trends in Biotechnology* 1993, **11**(3):88-95.
117. Roberts CJ: **Nonnative protein aggregation.** In: *Misbehaving Proteins: protein (mis) folding, aggregation and stability.* Edited by Murphy RM, Tsai AM: Springer 2006: 17-47.
118. Fink AL: **Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid.** *Folding & Design* 1998, **3**(1):R9-R23.
119. Finke JM, Roy M, Zimm BH, Jennings PA: **Aggregation events occur prior to stable intermediate formation during refolding of interleukin 1 beta.** *Biochemistry* 2000, **39**(3):575-583.
120. Roberts CJ, Darrington RT, Whitley MB: **Irreversible aggregation of recombinant bovine Granulocyte-Colony Stimulating Factor (bG-CSF) and implications for predicting protein shelf life.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003, **92**(5):1095-1111.
121. Wright HT: **Nonenzymatic Deamidation of Asparaginyl and Glutaminyl Residues in Proteins.** *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 1991, **26**(1):1-52.
122. Volkin DB, Middaugh CR: **The effect of temperature on protein structure.** In: *Stability of protein pharmaceuticals Chemical and physical pathways of protein degradation.* Edited by Ahern TJ, Manning MC. New York: Plenum Press; 1992.
123. Bhatnagar BS, Bogner RH, Pikal MJ: **Protein stability during freezing: Separation of stresses and mechanisms of protein stabilization.** *Pharmaceutical Development and Technology* 2007, **12**(5):505-523.
124. Nelson DL, Cox MM: **Lehninger - Principles of Biochemistry (4th Edition):** W.H. Freeman & Co.; 2004.
125. Southall NT, Dill KA, Haymet ADJ: **A view of the hydrophobic effect.** *Journal of Physical Chemistry B* 2002, **106**(3):521-533.
126. Thurlkill RL, Grimsley GR, Scholtz JM, Pace CN: **pK values of the ionizable groups of proteins.** *Protein Science* 2006, **15**(5):1214-1218.
127. Tollinger M, Crowhurst KA, Kay LE, Forman-Kay JD: **Site-specific contributions to the pH dependence of protein stability.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(8):4545-4550.
128. Laurents DV, Huyghues-Despointes BMP, Bruix M, Thurlkill RL, Schell D, Newsom S, Grimsley GR, Shaw KL, Trevino S, Rico M *et al*: **Charge-charge interactions are key determinants of the pK values of ionizable groups in ribonuclease Sa (pI=3.5)**

- and a basic variant (pI=10.2).** *Journal of Molecular Biology* 2003, **325**(5):1077-1092.
129. Schutz CN, Warshel A: **What are the dielectric "constants" of proteins and how to validate electrostatic models?** *Proteins* 2001, **44**(4):400-417.
130. Fitch CA, Karp DA, Lee KK, Stites WE, Lattman EE, Garcia-Moreno B: **Experimental pK(a) values of buried residues: Analysis with continuum methods and role of water penetration.** *Biophysical Journal* 2002, **82**(6):3289-3304.
131. Georgescu RE, Alexov EG, Gunner MR: **Combining conformational flexibility and continuum electrostatics for calculating pK(a)s in proteins.** *Biophysical Journal* 2002, **83**(4):1731-1748.
132. Bowler BE: **Thermodynamics of protein denatured states.** *Molecular Biosystems* 2007, **3**(2):88-99.
133. Yang AS, Honig B: **On the pH-Dependence of Protein Stability.** *Journal of Molecular Biology* 1993, **231**(2):459-474.
134. Yang AS, Honig B: **Structural Origins of pH and Ionic-Strength Effects on Protein Stability - Acid Denaturation of Sperm Whale Apomyoglobin.** *Journal of Molecular Biology* 1994, **237**(5):602-614.
135. Tanford C: **Protein denaturation.** *Advances in Protein Chemistry* 1968, **23**:121-282.
136. Goto Y, Takahashi N, Fink AL: **Mechanism of Acid-Induced Folding of Proteins.** *Biochemistry* 1990, **29**(14):3480-3488.
137. Goto Y, Nishikiori S: **Role of Electrostatic Repulsion in the Acidic Molten Globule of Cytochrome-C.** *Journal of Molecular Biology* 1991, **222**(3):679-686.
138. Chen HM, You JL, Markin VS, Tsong TY: **Kinetic-Analysis of the Acid and the Alkaline Unfolded States of Staphylococcal Nuclease.** *Journal of Molecular Biology* 1991, **220**(3):771-778.
139. Ionescu RM, Eftink MR: **Global analysis of the acid-induced and urea-induced unfolding of staphylococcal nuclease and two of its variants.** *Biochemistry* 1997, **36**(5):1129-1140.
140. Geierstanger B, Jamin M, Volkman BF, Baldwin RL: **Protonation behavior of histidine 24 and histidine 119 in forming the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin.** *Biochemistry* 1998, **37**(12):4254-4265.
141. Barrick D, Baldwin RL: **Three-state analysis of sperm whale apomyoglobin folding.** *Biochemistry* 1993, **32**(14):3790-3796.
142. Horng JC, Cho JH, Raleigh DP: **Analysis of the pH-dependent folding and stability of histidine point mutants allows characterization of the denatured state and transition state for protein folding.** *Journal of Molecular Biology* 2005, **345**(1):163-173.
143. Barrick D, Hughson FM, Baldwin RL: **Molecular Mechanisms of Acid Denaturation - the Role of Histidine-Residues in the Partial Unfolding of Apomyoglobin.** *Journal of Molecular Biology* 1994, **237**(5):588-601.
144. Grey MJ, Tang YF, Alexov E, McKnight CJ, Raleigh DP, Palmer AG: **Characterizing a partially folded intermediate of the villin headpiece domain under non-denaturing conditions: Contribution of His41 to the pH-dependent stability of the N-terminal subdomain.** *Journal of Molecular Biology* 2006, **355**(5):1078-1094.
145. Kay MS, Baldwin RL: **Alternative models for describing the acid unfolding of the apomyoglobin folding intermediate.** *Biochemistry* 1998, **37**(21):7859-7868.
146. Jamin M, Geierstanger B, Baldwin RL: **The pK(a) of His-24 in the folding transition state of apomyoglobin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(11):6127-6131.

147. Fink AL, Calciano LJ, Goto Y, Kurotsu T, Palleros DR: **Classification of Acid Denaturation of Proteins - Intermediates and Unfolded States.** *Biochemistry* 1994, **33**(41):12504-12511.
148. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: **Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase.** *Science* 1988, **239**(4839):487-491.
149. Gocke D, Walter L, Gauchenova E, Kolter G, Knoll M, Berthold CL, Schneider G, Pleiss J, Muller M, Pohl M: **Rational protein design of ThDP-Dependent enzymes-engineering stereoselectivity.** *Chembiochem* 2008, **9**(3):406-412.
150. Clarke J, Fersht AR: **Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation.** *Biochemistry* 1993, **32**(16):4322-4329.
151. Matsumura M, Signor G, Matthews BW: **Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds.** *Nature* 1989, **342**(6247):291-293.
152. Matthews BW, Nicholson H, Bechtel WJ: **Enhanced Protein Thermostability from Site-Directed Mutations That Decrease the Entropy of Unfolding.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, **84**(19):6663-6667.
153. Shoemaker KR, Kim PS, Brems DN, Marqusee S, York EJ, Chaiken IM, Stewart JM, Baldwin RL: **Nature of the Charged-Group Effect on the Stability of the C-Peptide Helix.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985, **82**(8):2349-2353.
154. Schwehm JM, Fitch CA, Dang BN, Garcia-Moreno EB, Stites WE: **Changes in stability upon charge reversal and neutralization substitution in staphylococcal nuclease are dominated by favorable electrostatic effects.** *Biochemistry* 2003, **42**(4):1118-1128.
155. Makhatadze GI, Loladze VV, Ermolenko DN, Chen XF, Thomas ST: **Contribution of surface salt bridges to protein stability: Guidelines for protein engineering.** *Journal of Molecular Biology* 2003, **327**(5):1135-1148.
156. Pace CN, Alston RW, Shaw KL: **Charge-charge interactions influence the denatured state ensemble and contribute to protein stability.** *Protein Science* 2000, **9**(7):1395-1398.
157. Martin A, Sieber V, Schmid FX: **In-vitro selection of highly stabilized protein variants with optimized surface.** *Journal of Molecular Biology* 2001, **309**(3):717-726.
158. Maeda N, Kanai T, Atomi H, Imanaka T: **The unique pentagonal structure of an archaeal Rubisco is essential for its high thermostability.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(35):31656-31662.
159. Villeret V, Clantin B, Tricot C, Legrain C, Roovers M, Stalon V, Glansdorff N, Van Beeumen J: **The crystal structure of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyl-transferase reveals a key role for oligomerization in enzyme stability at extremely high temperatures.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(6):2801-2806.
160. Walden H, Bell GS, Russell RJM, Siebers B, Hensel R, Taylor GL: **Tiny TIM: A small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase.** *Journal of Molecular Biology* 2001, **306**(4):745-757.
161. McNutt M, Mullins LS, Raushel FM, Pace CN: **Contribution of histidine residues to the conformational stability of ribonuclease T1 and mutant Glu-58-Ala.** *Biochemistry* 1990, **29**(33):7572-7576.
162. Bellapadrona G, Chiaraluce R, Consalvi V, Ilari A, Stefanini S, Chiancone E: **The mutations Lys 114 -> Gln and Asp 126 -> Asn disrupt an intersubunit salt bridge and convert *Listeria innocua* Dps into its natural mutant *Listeria monocytogenes***

- Dps. effects on protein stability at low pH.** *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 2007, **66**(4):975-983.
163. Boersma YL, Droge MJ, Quax WJ: **Selection strategies for improved biocatalysts.** *Febs Journal* 2007, **274**(9):2181-2195.
164. Wong TS, Tee KL, Hauer B, Schwaneberg U: **Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution.** *Nucleic Acids Research* 2004, **32**(3):-.
165. Tindall KR, Kunkel TA: **Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase.** *Biochemistry* 1988, **27**(16):6008-6013.
166. Eckert KA, Kunkel TA: **High Fidelity DNA-Synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase.** *Nucleic Acids Research* 1990, **18**(13):3739-3744.
167. Wong TS, Zhurina D, Schwaneberg U: **The diversity challenge in directed protein evolution.** *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2006, **9**(4):271-288.
168. Wong TS, Roccatano D, Zacharias M, Schwaneberg U: **A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution.** *Journal of Molecular Biology* 2006, **355**(4):858-871.
169. Stemmer WP: **Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling.** *Nature* 1994, **370**(6488):389-391.
170. Stemmer WPC: **DNA Shuffling by Random Fragmentation and Reassembly - in-Vitro Recombination for Molecular Evolution.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(22):10747-10751.
171. Ostermeier M, Shim JH, Benkovic SJ: **A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology.** *Nature Biotechnology* 1999, **17**(12):1205-1209.
172. Sieber V, Martinez CA, Arnold FH: **Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences.** *Nature Biotechnology* 2001, **19**(5):456-460.
173. Hiraga K, Arnold FH: **General method for sequence-independent site-directed chimeragenesis.** *Journal of Molecular Biology* 2003, **330**(2):287-296.
174. Chaparro-Riggers JF, Polizzi KM, Bommarius AS: **Better library design: data-driven protein engineering.** *Biotechnology Journal* 2007, **2**(2):180-191.
175. Chica RA, Doucet N, Pelletier JN: **Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design.** *Current Opinion in Biotechnology* 2005, **16**(4):378-384.
176. Reetz MT, Bocola M, Carballeira JD, Zha DX, Vogel A: **Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: Combinatorial active-site saturation test.** *Angewandte Chemie-International Edition* 2005, **44**(27):4192-4196.
177. Reetz MT, Carballeira JD, Peyralans J, Hobenreich H, Maichele A, Vogel A: **Expanding the substrate scope of enzymes: Combining mutations obtained by CASTing.** *Chemistry-a European Journal* 2006, **12**(23):6031-6038.
178. Reetz MT, Carballeira JD, Vogel A: **Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability.** *Angewandte Chemie-International Edition* 2006, **45**(46):7745-7751.
179. Minshull J, Ness JE, Gustafsson C, Govindarajan S: **Predicting enzyme function from protein sequence.** *Current Opinion in Chemical Biology* 2005, **9**(2):202-209.
180. Lehmann M, Loch C, Middendorf A, Studer D, Lassen SF, Pasamontes L, van Loon APGM, Wyss M: **The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept.** *Protein Engineering* 2002, **15**(5):403-411.
181. Lingen B, Grotzinger J, Kolter D, Kula MR, Pohl M: **Improving the carboligase activity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by a combina-**

- tion of directed evolution and site-directed mutagenesis. *Protein Engineering* 2002, **15**(7):585-593.
182. Reetz MT: **Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: Practical and theoretical ramifications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(16):5716-5722.
183. Reymond JL, Babiak P: **Screening systems.** *White Biotechnology* 2007, **105**:31-58.
184. Kouker G, Jaeger KE: **Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases.** *Applied and Environmental Microbiology* 1987, **53**(1):211-213.
185. Charbonneau V, Ogilvie WW: **High throughput screening methods for asymmetric synthesis.** *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 2005, **2**(4):313-332.
186. Bornscheuer UT: **High-throughput-screening systems for hydrolases.** *Engineering in Life Sciences* 2004, **4**(6):539-542.
187. Goddard JP, Reymond JL: **Enzyme assays for high-throughput screening.** *Current Opinion in Biotechnology* 2004, **15**(4):314-322.
188. Krammer B, Rumbold K, Tschemmernegg M, Pochlauer P, Schwab H: **A novel screening assay for hydroxynitrile lyases suitable for high-throughput screening.** *Journal of Biotechnology* 2007, **129**(1):151-161.
189. Fu AY, Spence C, Scherer A, Arnold FH, Quake SR: **A microfabricated fluorescence-activated cell sorter.** *Nature Biotechnology* 1999, **17**(11):1109-1111.
190. Aharoni A, Griffiths AD, Tawfik DS: **High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes.** *Current Opinion in Chemical Biology* 2005, **9**(2):210-216.
191. Olsen MJ, Stephens D, Griffiths D, Daugherty P, Georgiou G, Iverson BL: **Function-based isolation of novel enzymes from a large library.** *Nature Biotechnology* 2000, **18**(10):1071-1074.
192. Konarzycka-Bessler M, Jaeger KE: **Select the best: novel biocatalysts for industrial applications.** *Trends in Biotechnology* 2006, **24**(6):248-250.
193. Otten LG, Quax WJ: **Directed evolution: selecting today's biocatalysts.** *Biomolecular Engineering* 2005, **22**(1-3):1-9.
194. Griffiths JS, Cheriyan M, Corbell JB, Pocivavsek L, Fierke CA, Toone EJ: **A bacterial selection for the directed evolution of pyruvate aldolases.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2004, **12**(15):4067-4074.
195. Cipolla L: **Combinatorial libraries of biocatalysts: Application and screening.** *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2004, **7**(2):101-114.
196. Delagrave S, Murphy DJ: **In vitro evolution of proteins for drug development.** *Assay and Drug Development Technologies* 2003, **1**(1):187-198.
197. Taylor SV, Kast P, Hilvert D: **Investigating and engineering enzymes by genetic selection.** *Angewandte Chemie-International Edition* 2001, **40**(18):3310-3335.
198. Firestine SM, Salinas F, Nixon AE, Baker SJ, Benkovic SJ: **Using an AraC-based three-hybrid system to detect biocatalysts in vivo.** *Nature Biotechnology* 2000, **18**(5):544-547.
199. Bommarius AS, Broering JM, Chaparro-Riggers JF, Polizzi KM: **High-throughput screening for enhanced protein stability.** *Current Opinion in Biotechnology* 2006, **17**(6):606-610.
200. Shaw A, Bott R, Day AG: **Protein engineering of alpha-amylase for low pH performance.** *Current Opinion in Biotechnology* 1999, **10**(4):349-352.
201. Baik SH, Ide T, Yoshida H, Kagami O, Harayama S: **Significantly enhanced stability of glucose dehydrogenase by directed evolution.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003, **61**(4):329-335.
202. Liu ZQ, Sun ZH, Leng Y: **Directed evolution and characterization of a novel D-pantono-hydrolase from *Fusarium moniliforme*.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, **54**(16):5823-5830.

203. Jones A, Lamsa M, Frandsen TP, Spendler T, Harris P, Sloma A, Xu F, Nielsen JB, Cherry JR: **Directed evolution of a maltogenic alpha-amylase from *Bacillus* sp TS-25.** *Journal of Biotechnology* 2008, **134**(3-4):325-333.
204. Wang Q, Xia T: **Enhancement of the activity and alkaline pH stability of *Thermobifida fusca* xylanase A by directed evolution.** *Biotechnology Letters* 2008, **30**(5):937-944.
205. Timasheff SN: **Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: The simplicity of the complicated.** *Advances in Protein Chemistry* 1998, **51**:355-432.
206. Arakawa T, Ejima D, Tsumoto K, Obeyama N, Tanaka Y, Kita Y, Timasheff SN: **Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects.** *Biophysical Chemistry* 2007, **127**(1-2):1-8.
207. Arakawa T, Timasheff SN: **Stabilization of Protein-Structure by Sugars.** *Biochemistry* 1982, **21**(25):6536-6544.
208. Lin TY, Timasheff SN: **On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins.** *Protein Science* 1996, **5**(2):372-381.
209. Lee JC, Frigon RP, Timasheff SN: **Structural Stability of Calf Brain Microtubule Protein.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1975, **253**(Jun30):284-291.
210. Xie GF, Timasheff SN: **The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose.** *Biophysical Chemistry* 1997, **64**(1-3):25-43.
211. Gekko K, Timasheff SN: **Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol - Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures.** *Biochemistry* 1981, **20**(16):4667-4676.
212. Gekko K, Morikawa T: **Thermodynamics of Polyol-Induced Thermal Stabilization of Chymotrypsinogen.** *Journal of Biochemistry* 1981, **90**(1):51-60.
213. Von Hippel PH, Schleich T. In: *Structure and Stability of Macromolecules* Edited by Timasheff SN, Fasman GD. New York: Marcel Dekker; 1969: 417-574.
214. Arakawa T, Timasheff SN: **Preferential Interactions of Proteins with Solvent Components in Aqueous Amino-Acid Solutions.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1983, **224**(1):169-177.
215. Sheldon RA, Schoevaart R, Van Langen LM: **Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review).** *Biocatalysis and Biotransformation* 2005, **23**(3-4):141-147.
216. Sheldon RA: **Enzyme immobilization: The quest for optimum performance.** *Advanced Synthesis & Catalysis* 2007, **349**(8-9):1289-1307.
217. Bornscheuer UT: **Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts.** *Angewandte Chemie-International Edition* 2003, **42**(29):3336-3337.
218. Katchalski-Katzir E, Kraemer DM: **Eupergit (R) C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential.** *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 2000, **10**(1-3):157-176.
219. Krajewska B: **Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review.** *Enzyme and Microbial Technology* 2004, **35**(2-3):126-139.
220. Jekel M, Buhr A, Willke T, Vorlop KD: **Immobilization of biocatalysts in Lenti-Kats.** *Chemical Engineering & Technology* 1998, **21**(3):275-278.
221. Kirk O, Christensen MW: **Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin.** *Organic Process Research & Development* 2002, **6**(4):446-451.
222. Roy I, Gupta MN: **Smart polymeric materials: Emerging biochemical applications.** *Chemistry & Biology* 2003, **10**(12):1161-1171.
223. Gonzalez-Saiz JM, Pizarro C: **Polyacrylamide gels as support for enzyme immobilization by entrapment. Effect of polyelectrolyte carrier, pH and temperature on**

- enzyme action and kinetics parameters.** *European Polymer Journal* 2001, **37**(3):435-444.
224. Quicho FA, Richards FM: **Enzymic Behavior of Carboxypeptidase-a in Solid State.** *Biochemistry* 1966, **5**(12):4062-&.
225. Margolin AL, Navia MA: **Protein crystals as novel catalytic materials.** *Angewandte Chemie-International Edition* 2001, **40**(12):2205-2222.
226. Sheldon RA: **Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts.** 7th international conference on protein stabilization 2007: 1583-1587
227. St. Clair NL, Navia MA: **Cross-Linked Enzyme Crystals as Robust Biocatalysts.** *Journal of the American Chemical Society* 1992, **114**(18):7314-7316.
228. Cao LQ, van Langen L, Sheldon RA: **Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?** *Current Opinion in Biotechnology* 2003, **14**(4):387-394.
229. Tischer W, Kasche V: **Immobilized enzymes: crystals or carriers?** *Trends in Biotechnology* 1999, **17**(8):326-335.
230. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Research* 1997, **25**(17):3389-3402.
231. Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, Schodl T, Heitzer M, Hegemann P: **Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene.** *Plant Molecular Biology* 2004, **55**(6):869-881.
232. Koradi R, Billeter M, Wuthrich K: **MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures.** *Journal of Molecular Graphics* 1996, **14**(1):51-&.
233. Tynan-Connolly BM, Nielsen JE: **Redesigning protein pK(a) values.** *Protein Science* 2007, **16**(2):239-249.
234. Studier FW, Moffatt BA: **Use of Bacteriophage-T7 Rna-Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes.** *Journal of Molecular Biology* 1986, **189**(1):113-130.
235. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J: **Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.** *Gene* 1985, **33**(1):103-119.
236. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual,** 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
237. Schrimpf G: **Gentechnische Methoden,** 3 edn: Spektrum Verlag; 2002.
238. Studier FW: **Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures.** *Protein Expression and Purification* 2005, **41**(1):207-234.
239. Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD: **Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*.** *Journal of Biotechnology* 1995, **39**(1):59-65.
240. Jaeger KE, Eggert T, Eipper A, Reetz MT: **Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001, **55**(5):519-530.
241. Laemmli UK: **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
242. Kang DH, Gho YS, Suh MK, Kang CH: **Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.** *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2002, **23**(11):1511-1512.
243. Bradford MM: **Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry* 1976, **72**:248-254.

244. Hanefeld U, Straathof AJJ, Heijnen JJ: **Study of the (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*: mechanistic implications.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1999, **1432**(2):185-193.
245. Andexer J, Guterl J, Pohl M, Eggert T: **A high-throughput screening assay for hydroxynitrile lyase activity.** *Chemical Communications* 2006(40):4201-4203.
246. Walpole GS: **Hydrogen potentials of mixtures of acetic acid and sodium acetate.** *Journal of the Chemical Society* 1914, **105**:2501-2521.
247. McIlvaine TC: **A buffer solution for colorimetric comparison.** *Journal of Biological Chemistry* 1921, **49**(1):183-186.
248. Sorensen SPL: **Enzyme studies - Note II - The measurement and the significance of hydrogenic concentrate in enzymatic processes.** *Biochemische Zeitschrift* 1909, **21**:131-304.
249. Yan GH, Cheng SH, Zhao GG, Wu S, Liu YB, Sun WR: **A single residual replacement improves the folding and stability of recombinant cassava hydroxynitrile lyase in *E. coli*.** *Biotechnology Letters* 2003, **25**(13):1041-1047.
250. Guo L, Han AD, Bates DL, Cao J, Chen L: **Crystal structure of a conserved N-terminal domain of histone deacetylase 4 reveals functional insights into glutamine-rich domains.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(11):4297-4302.
251. Hejtmancik JF, Wingfield PT, Sergeev YV: **Beta-crystallin association.** *Experimental Eye Research* 2004, **79**(6):377-383.
252. Waheed A, Figura K: **Rapid Equilibrium between Monomeric, Dimeric and Tetrameric Forms of the 46-Kda Mannose 6-Phosphate Receptor at 37-Degrees-C - Possible Relation to the Function of the Receptor.** *European Journal of Biochemistry* 1990, **193**(1):47-54.
253. Hickel A, Graupner M, Lehner D, Hermetter A, Glatter O, Griengl H: **Stability of the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*: a fluorescence and dynamic light scattering study.** *Enzyme and Microbial Technology* 1997, **21**(5):361-366.
254. Hanefeld U, Stranzl G, Straathof AJJ, Heijnen JJ, Bergmann A, Mittelbach R, Glatter O, Kratky C: **Electrospray ionization mass spectrometry, circular dichroism and SAXS studies of the (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 2001, **1544**(1-2):133-142.
255. Schall M: **Isolation and characterization of a (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*** Graz: Karl-Franzens-Universität 1996.
256. Lauble H, Wagner U, Kratky C, Miehllich B, Wajant H, Forster S, Effenberger F: **Crystal Structure of a Hydroxynitrile Lyase from *Manihot esculenta* at 2.2 Angstrom Resolution.**; 2000.
257. Wajant H, Pfizenmaier K: **Identification of potential active-site residues in the hydroxynitrile Lyase from *Manihot esculenta* by site-directed mutagenesis.** *Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**(42):25830-25834.
258. Hasslacher M, Kratky C, Griengl H, Schwab H, Kohlwein SD: **Hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*: Molecular characterization and mechanism of enzyme catalysis.** *Proteins-Structure Function and Genetics* 1997, **27**(3):438-449.
259. Holliday GL, Almonacid DE, Mitchell JB, Thornton JM: **The chemistry of protein catalysis.** *Journal of Molecular Biology* 2007, **372**(5):1261-1277.
260. Hughes J, Lakey JH, Hughes MA: **Production and characterization of a plant alpha-hydroxynitrile lyase in *Escherichia coli*.** *Biotechnology and Bioengineering* 1997, **53**(3):332-338.

261. Bauer M, Geyer R, Boy M, Griengl H, Steiner W: **Stability of the enzyme (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis***. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 1998, **5**(1-4):343-347.
262. Kelly SM, Jess TJ, Price NC: **How to study proteins by circular dichroism**. *Biochimica Et Biophysica Acta* 2005, **1751**(2):119-139.
263. Schmid FX: **Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes**. In: *Protein structure: a practical approach*. Edited by Creighton TE. Oxford: IRL Press; 1990.
264. Duy C, Fitter J: **Thermostability of irreversible unfolding alpha-amylases analyzed by unfolding kinetics**. *Journal of Biological Chemistry* 2005, **280**(45):37360-37365.
265. Kensy F, Zimmermann HF, Knabben I, Anderlei T, Trauthwein H, Dingerdissen U, Buchs J: **Oxygen transfer phenomena in 48-well microtiter plates: determination by optical monitoring of sulfite oxidation and verification by real-time measurement during microbial growth**. *Biotechnology and Bioengineering* 2005, **89**(6):698-708.
266. Puls M: **Evolutionäre Optimierung von Lipasen aus *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas aeruginosa***. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2007.
267. Sehl T: **Charakterisierung von Hydroxynitril-Lyasen**. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2007.
268. Despa F, Orgill DP, Lee RC: **Effects of crowding on the thermal stability of heterogeneous protein solutions**. *Annals of Biomedical Engineering* 2005, **33**(8):1125-1131.
269. Koch K, van den Berg RJF, Nieuwland PJ, Wijtmans R, Wubbolts MG, Schoemaker HE, Ritjes FPJT, van Hest JCM: **Enzymatic synthesis of optically pure cyanohydrins in microchannels using a crude cell lysate**. *Chemical Engineering Journal* 2008, **135S**:S-89-S92.
270. Bove C, Conn EE: **Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants .2. Purification and Properties of Oxynitrilase of *Sorghum vulgare***. *Journal of Biological Chemistry* 1961, **236**(1):207-&.
271. Xu LL, Singh BK, Conn EE: **Purification and characterization of acetone cyanohydrin lyase from *Linum usitatissimum***. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1988, **263**(2):256-263.
272. Selmar D, Carvalho FJP, Conn EE: **A Colorimetric Assay for alpha-Hydroxynitrile-Lyases**. *Analytical Biochemistry* 1987, **166**:208-211.
273. Trummler K, Wajant H: **Molecular cloning of acetone cyanohydrin lyase from flax (*Linum usitatissimum*) - Definition of a novel class of hydroxynitrile lyases**. *Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**(8):4770-4774.
274. Zhou R, Eleftheriou M, Royyuru AK, Berne BJ: **Destruction of long-range interactions by a single mutation in lysozyme**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(14):5824-5829.

9. Anhang

9.1 Sequenzen der verwendeten Enzyme

a)
1 <u>atggtaactg</u> cacat ttt gtg tctgattcat accat ttg cc atggtgcatg gatt tg gcat aagctcaaac cagcccttga gagagctggc cacaaa gtc a
101 ctgcactgga catggcagcc agt ggcattg acccaaggca aattgagcag attaat t cat ttgatgaata ctctga acc ttattgactt tcttggagaa
201 actccctcaa ggggaaaagg tcatcattgt tggtagagc tgtgcagg gc tca atattgc tattgctgct gatagatac g ttgacaaa t tgcagctggt
301 gttttccaca attccttatt gccagacacc gttcatagcc catcttacac tgtg g aaaag cttttggagt cgtttcctga ctggagagac acagagtatt
401 ttacgttcac taatattcact ggagagacaa ttacaacaat gaagctgggc ttcgtacttc tgagg g aaa tttatttacc aaatgcactg atggggaata
501 tgaactggca aaaatggtaa tgaggaaggg atcactgttt caaaatg ttt tggctcagag accgaag ttc <u>act</u> gaaaaag gttacggatc aattaagaaa
601 gtttatattt ggaccgatca agacaaaata tttttaccag actttcaacg ctggc aaata gcaaaactaca aaccgacaaa gg ttt atcag gttcaagg tg
701 gagatcataa gctccagcct acaaaaaactg agggaggtagc tcatattctc caagaggtgg ctgat g ctta tgcttgataa
b)
1 MVTAHFVLIH TICHGAMIWH KLKPALERAG HKVTALDMAA SGIDPRQIEQ INSFDEYSEP LLTFLEKLPQ GEKVIIVGES CAGLNIAIAA DRYVDKIAAG
101 VFHNSLLPDT VHSPSYTVEK LLESPDWRD TEYFTFTNIT GETITTMKLG FVLLRENLFY KCTDGEYELA KHVHRKGS LF QNVLAQRPKF TEKGYGSIKK
201 VYIWTDDQKI FLPDFQRWQI ANYKPKRVYQ VQGGDHKLQL TKTEEV AHIL QEVADAYA

Abbildung 9.1: Nukleotidsequenz (a) und Aminosäuresequenz (b) der *MeHNL*. Start- und Stopcodon sind unterstrichen, die gegenüber der Wildtypsequenz (Genbank-Nr. Z29091) abweichenden Triplets sind fett gedruckt.

a)
1 <u>atggcgctctc</u> ttcctgttag ctttgctaaa cccgacaaga atggagctcat cacttgcaag gcgattatgc tgaaggaggc gaagttgcca ggaatgtcat
101 acgctgatac cgtccagata atagacatcc aagtggaccc gccgcaaaat gtcgagctta gggtaagat gttgtgtgca agtgtgtgccc gcacc gatat
201 tttaaaccatt gaaggcttca tggccccgac tcaattccct aaaatcaatg ggcataaagg tgttgggata atcgagagca tgggccccga cacgaagaac
301 tccaagtgg gtgacgtcat cgtggctccg acgttaggag agtgccaggt ctgcagcagc tgcaggtccg gccgaaccaa cttctgccag aactacgggg
401 ccaatgaatc ggcgctcgaa ccggatggta cctcgagatt ctctgacatc gattcggacg gtaagaagaa gctcctttac tacaag ctgg gatgctccac
501 gttgacgcag tacatgggtg tgcactccaa ctacgccacc aagctcaacg agatcgcacc ggagctccct ccgccacatg gcagcatcct ctcatgtgct
601 tttgccactg gatacgggtc tgtatggctc gacgccgccc tccaggaagg cgactccgct gccatttttg gagtcggctc cgtcggcata tctgctgtga
701 ttgctgccaa agagctgaaa gcgaagcaga taatagtagt ggacaggaac gagtacaagc tgaaaatggc catggaactg ggggccacc cactgcatcaa
801 ctccgagaaa ctaccggagg gggtcacccc ttcgcaagcg gttaggaaac tcacccccaa ggaagtccga gtcgatgca gcatcgaatc ctccggctac
901 gacgtcttca tgaacgaagc catgaaagcc gccatccacg ggaagcccaa gaccgtgatt accggag aa g gaatttacga aaacgacaga atcttcttcg
1001 atttcaagga cttcctgttc ggcgggaacg tagtcggaaa cgtcacgggt cgggttagaa tccatagcga tttcccaggg ttgctgagaa aggcctcaaga
1101 accggtaatc agagctggaa tggataaaaat cttgggttac gatcggcga ctatgaagtg caagtacgag gtcgacatc gtgagggtac tctgcatta
1201 ctgaaagcat tggaaagagt ggagaatgtg gattgcgtca aactcgtgat caagttgaac gattat taa
b)
1 MASLPVFAK PDKNGVITCK AIMLKEAKLP GMSYADTVQI IDIQVDPPQN VELRVKMLCA SVCRTDILTI EGFMAPTQFP KINGHEGVGI IESMGPDTKN
101 FKVGDVIVAP TLGECQVCSS CRSGRTNFCQ NYGANESALE PDGTSRFSYI DSDGKKLLY YK LGCSWTQ YMVVDSNYAT KLNIEAPELP PPHGSILSCA
201 FATGYGAVWL DAAVQEGDSV AIFGVGSVGI SAVIAAKELK AKQIIIVDRN EYKLMAMEL GATHCINSEK LPEGVTPSQA VRKLTPEKVG VDASIESSGY
301 DVFMNEAMKA AIHGKAKTVI TGE G IYENDR IFFDFKDFLF GGNVGVNVTG RVRHSDFFP LRRKAQEPVI RAGHDKILGY DAATMKCKYE VDIREGTPAL
401 LKALEEVENV DCVKLVIKLN DY

Abbildung 9.2: Nukleotidsequenz (a) und Aminosäuresequenz (b) der *LuHNL* (Genbank-Nr. Y09084). Start- und Stopcodon sind unterstrichen, die katalytischen Reste bzw. die für sie codierenden Triplets sind fett gedruckt und unterstrichen.

a)

```

1 atggcgctctc ttcctgtag ctttgctaaa cccgacaaga atggagtcac cacttgcaag gcgattatgc tgaaggaggc gaagttgcca ggaatgcat
101 acgctgatac cgtccagata atagacatcc aagtggacc cccgcaaaa gtcgagctta gggtaaatg gttgtgtgca agtgtgtgcc gcaccgatat
201 ttttaaccatt gaaggcttca tggccccgac tcaattccct aaaatcaatg ggcataaagg tgttgggata atcgagagca tgggccccga cacgaagaac
301 ttcaaagtgg gtgacgtcat cgtggctccg acgttaggag agtgccaggt ctgcagcagc tgcaggctccg gccgaaccaa cttctgccag aactacgggg
401 ccaatgaatc ggcgctcgaa ccggatggta cctcgagatt ctctgtacatc gattcggacg gtaagaagaa gctcctttac tacaagctgg gatgctccac
501 gtggacgcag tacatggtgg tcgactccaa ctacgccacc aagctcaacg agatcgacc ggagctccct ccgccacatg gcagcatcct ctcatgtgct
601 tttgccactg gatacgggtc tgtatggctc gacgccgccc tccaggaagg cgactccgtc gccatttttg gactcggctc cgtcggcata tctgctgtga
701 ttgctgccaa agagctgaaa gcgaagcaga taatagtagt ggacaggaac gactacaagc tgaaaatggc catggaactg ggggccacc actgcatcaa
801 ctccgagaaa ctaccgagg gggtcacccc ttcgcaagcg gttaggaaac tcaccccaa ggaagtcgga gtcgatgca gcacgaatc ctctggctac
901 gacgtcttca tgaacgaagc catgaaagcc gccatccacg ggaagccaa gaccgtgatt accggagaag gaatttacga aaacgacaga atcttcttcg
1001 atttcaagga ctccgcccg ggcgggaacg tagtcggaaa cgcgacgggt cgggttagaa tccatagcga tttcccaggg ttgctgagaa aggctcaaga
1101 accggtaatc agagctgaaa tggataaaat cttggggatc gatcgggcaa ctatgaagtg caagtacgag gtcgacatc gtgagggtac tctgcatca
1201 ctgaaagcat tggaaagagt ggagaatgtg gattgcgta aactcgtgat caagttgaac gattattaa

```

b)

```

1 MASLPVSFAK PDKNGVITCK AMLKKEAKLP GMSYADTVQI IDIQVDPPQN VELRVKMLCA SVCRTDILTI EGFMAPTQFP KINGHEGVGI IESMGPDTRK
101 FKVGDVIVAP TLGECQVCSS CRSGRTNFCQ NYGANESALE PDGTSRFSYI DSDGKKLLY YKLGCSWTWQ YMVVDSNYAT KLNIEIPELP PPHGSILSCA
201 FATGYGAVWL DAAVQEGDSV AIFGVGSGVI SAVIAAKELK AKQIIIVDRN EYRLKMAMEL GATHCINSEK LPEGVTPSQV VRKLTPEKVG VDASIESSGY
301 DVFMNEAMKA AIHGKAKTVI TGEGIYENDR IFFDFKDFAA GGNVVGNA TG RVRIHSDFPG LLRKAQEPVI RAGMDKILGY DAATMKCKYE VDIREGTPAL
401 LKALEEVENV DCVKLVIKLN DY

```

Abbildung 9.3: Nukleotidsequenz (a) und Aminosäuresequenz (b) der LuHNL-Active-Site-Variante. Start- und Stopcodon sind unterstrichen, die gegenüber der Wildtypsequenz veränderten Reste bzw. die für sie codierenden Triplets sind fett gedruckt und unterstrichen.

9.2 Verwendete Vektoren

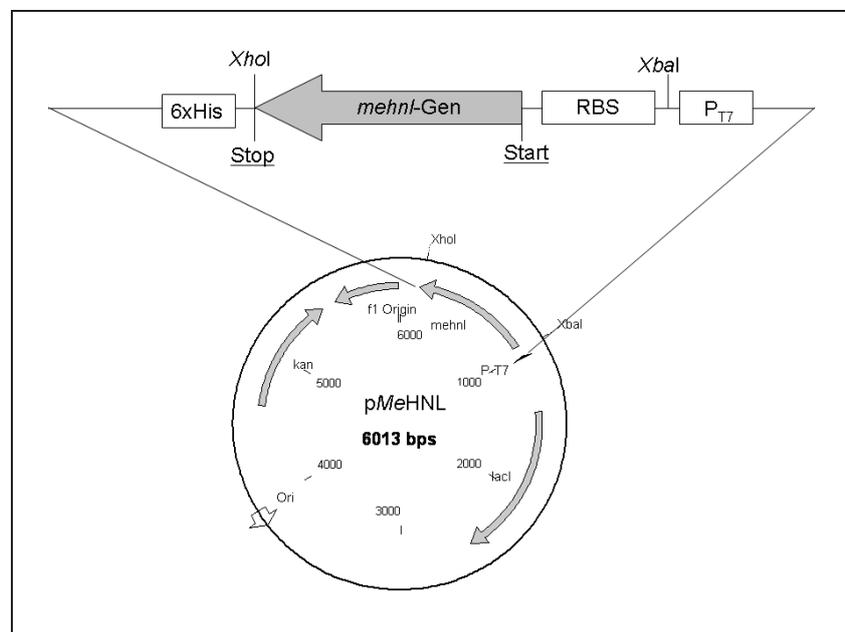


Abbildung 9.4: Vektorkarte des rekombinanten Plasmids pMeHNL. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: P_{T7}: T7-Promotor; RBS: Ribosomenbindungsstelle; Start: Start-Codon; Stop: Stop-Codon; 6xHis: Hexahistidin-Tag- codierender Bereich.

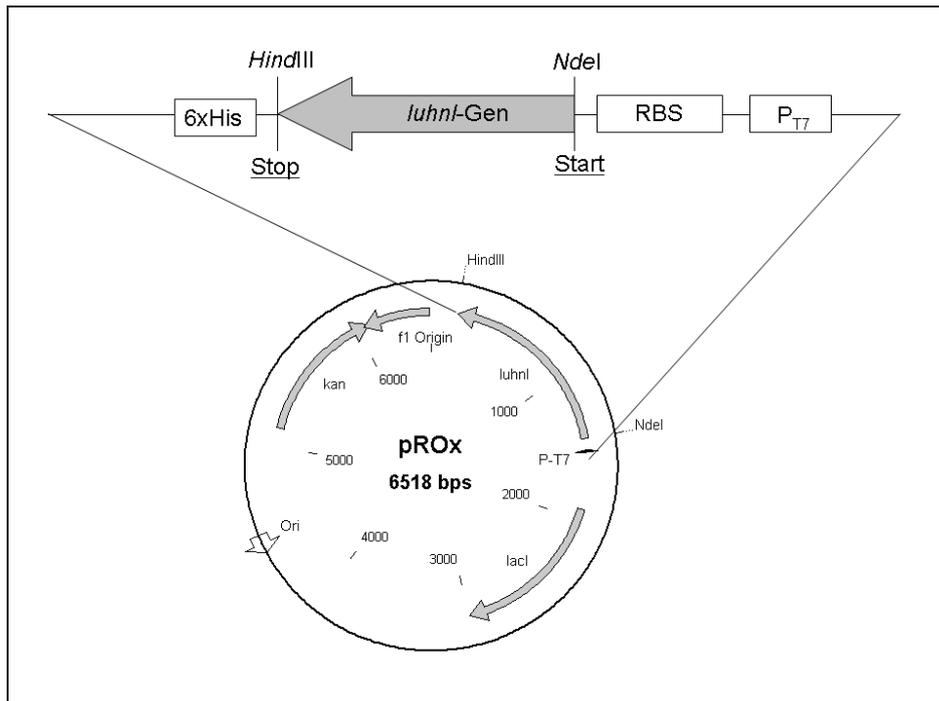


Abbildung 9.5: Vektorkarte des rekombinanten Plasmids pROx (Codexis/JCS). Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: P_{T7}: T7-Promotor; RBS: Ribosomenbindungsstelle; Start: Start-Codon; Stop: Stop-Codon; 6xHis: Hexahistidin-Tag- codierender Bereich.

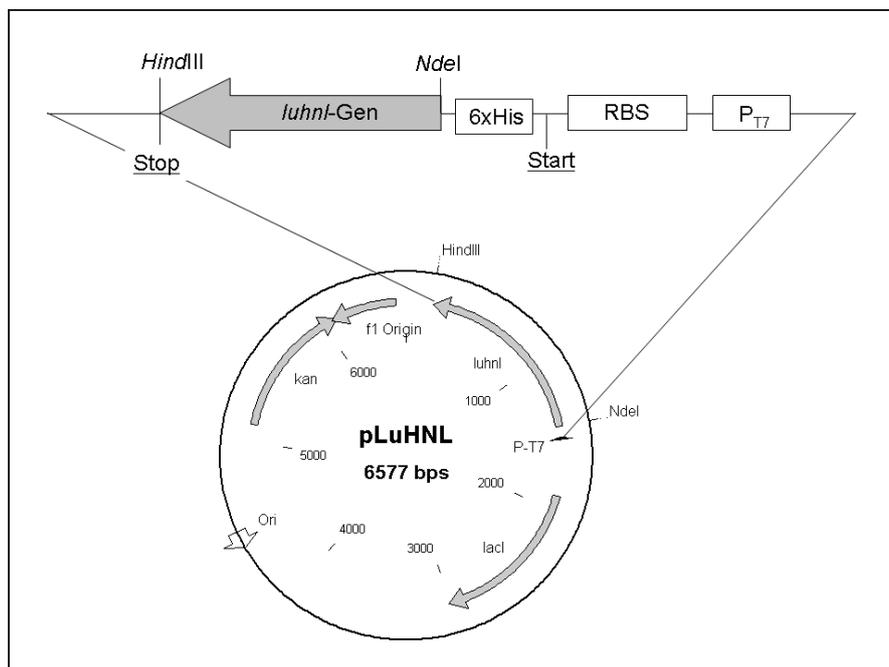


Abbildung 9.6: Vektorkarte des rekombinanten Plasmids pLuHNL. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: P_{T7}: T7-Promotor; RBS: Ribosomenbindungsstelle; Start: Start-Codon; Stop: Stop-Codon; 6xHis: Hexahistidin-Tag- codierender Bereich.

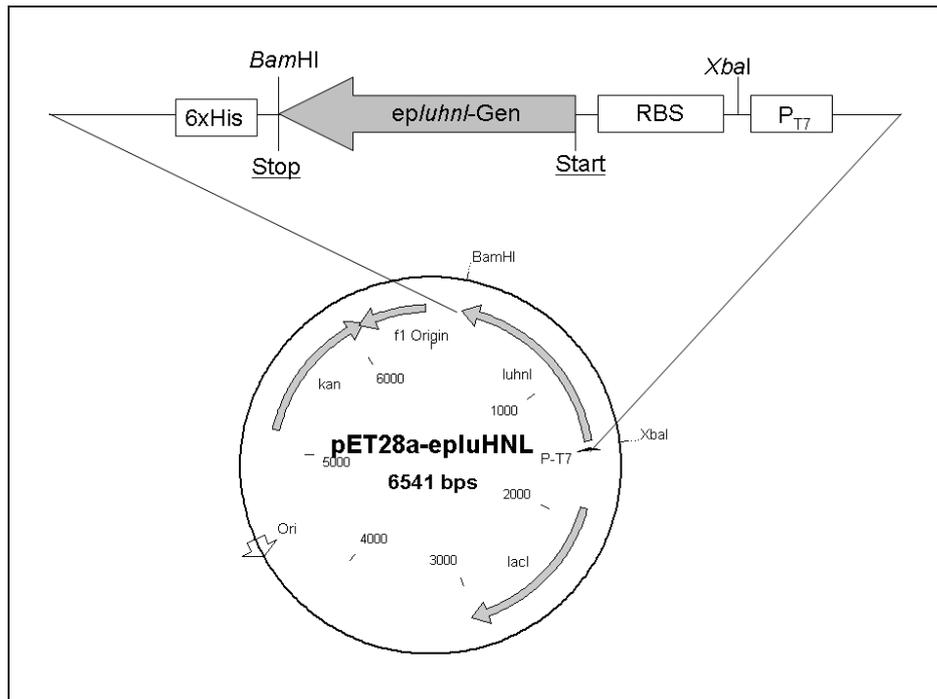


Abbildung 9.7: Vektorkarte des rekombinanten Plasmids pET28a-epluHNL. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: P_{T7}: T7-Promotor; RBS: Ribosomenbindungsstelle; Start: Start-Codon; Stop: Stop-Codon; 6xHis: Hexahistidin-Tag- codierender Bereich.

Danksagung

Viele haben mir während der Erstellung dieser Arbeit geholfen. Bei einigen davon möchte ich mich an dieser Stelle bedanken:

Mein erster Dank gilt Frau PD Dr. Martina Pohl für die Überlassung des interessanten Themas, die Freiheit bei der Ausgestaltung dieser Arbeit, ungezählte Tipps & Tricks rund um das Thema Enzyme sowie ein stets offenes Ohr bei allen auftretenden Problemen.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Bott bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Christoph Kratky, Herrn Dr. Karl Gruber und Frau Dr. Gabriela Horeis vom Institut für Strukturbiologie der KFU Graz danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Institut, das Überlassen der Kristallstruktur der *LμHNL* und die Hilfe bei der Planung der Varianten.

Bei Herrn Prof. Dr. Udo Kragl und Herrn Dr. Jan von Langermann vom Institut für Technische Chemie der Universität Rostock möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des BMBF-Projektes BioHydroForm, die Synthese vieler Cyanhydrin-Substrate und viele gute Tipps zu den beiden unfolgsamen Enzymen bedanken.

Bei Herrn PD Dr. Jörg Fitter und Herrn Dipl.-Biol. Tobias Rosenkranz vom Institute of Neurosciences and Biophysics (INB-2) des FZ Jülich bedanke ich mich für die gute Kooperation und die Hilfe rund ums Thema Spektroskopie sowie die Geduld, es auch dem Molekularbiologen zu erklären.

Ein großes Dankeschön geht auch an Herrn Dr. Thomas Daußmann, Herrn Dr. Pascal Dunkelmann, Frau Dr. Melanie Schürmann, Herrn Dr. Jörg Hennemann und Herrn Marius Althaus von Codexis (vormals Jülich Chiral Solutions) für die gute Kooperation im Rahmen des BMBF-Projektes BioHydroForm, viele gute Ideen und die Überlassung verschiedener Enzyme.

Herrn Dr. Richard Wisdom und Herrn Dr. Matthias Helms von Archimica (vormals Clariant) danke ich für die gute Kooperation im Rahmen des BMBF-Projektes BioHydroForm sowie die Synthese der Substrate.

Bei Herrn Prof. Dr. Harald Wajant vom Institut für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des BMBF-Projektes BioHydroForm.

Besonderer Dank gilt allen aktuellen, ehemaligen und adoptierten Mitgliedern der AG Applied Enzyme Technology für das allzeit gute Arbeitsklima. Besonders möchte ich Frau Dr. Jennifer Andexer für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die spitzenmäßige Zusammenarbeit danken, meinem Bachelor-Kandidaten Torsten Sehl für seine großartige Unterstützung und die vielen gute Ideen (die ich beim Pokern teuer bezahlen musste), Frau Ilona Frindl-Wosch und Frau Sabine Kruschinski für ihre Hilfe im Labor.

Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern des IMET, allen voran Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger, für das gute Arbeitsklima und die Hilfe bei allen praktischen und theoretischen Problemen sowie den einen oder anderen schönen Abend im IMET-Kino danken.

„Last, but not least“ bedanke ich mich bei meiner und Steffis Familie, vor allem aber bei Steffi und meinem Vater, ohne deren liebevolle Unterstützung ich all das nicht geschafft hätte. Es ist vollbracht!



Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.
Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen
Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Essen, 13.10.2008